

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
École Doctorale Science de la Santé, de la Vie et de l'Environnement
Faculté de Sciences et Techniques

Année : 2015

N° d'ordre : 164



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Écologie et Gestion des écosystèmes

Présentée par : **Larson Amédée BOUNDENGA**

Les *Plasmodium spp* de primates au Gabon : Diversité, transferts inter-espèces et virulence

Le 16 Novembre 2015 devant le jury composé de :

Président : M. Papa Mbacké SEMBENE - Professeur Titulaire, **FST/UCAD (Sénégal)**

Rapporteurs : M. Brice Augustin SINSIN - Professeur Titulaire, **UAC (Bénin)**

Mme. Constance AGBOGBA - Maitre de Conférence, **FST/UCAD (Sénégal)**

Mme. Jill D Pruetz - Professeur associée, **IOWA State University (USA)**

Examineurs : M. Papa Ibnou NDIAYE - Maitre-assistant, **FST/UCAD (Sénégal)**

M. Souleye NDIAYE - Colonel, **Directeur des Parcs Nationaux du Sénégal**

Directeurs de thèse : M. Franck PRUGNOLLE - Directeur de Recherche, **CIRMF/CNRS/IRD**

M. Cheikh Tidiane BA - Professeur Titulaire, **FST/UCAD (Sénégal)**

*“Les parasites sont des composantes ubiquistes,
quoiqu’habituellement invisibles, des communautés
naturelles. L’écologiste ne l’a que trop ignoré.”*

Robert Barbault, 1994



Avant-propos

Cette thèse de l'école doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement (ED-SEV) de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar a été réalisée au laboratoire de l'Unité de Biodiversité, Évolution et Écologie de Parasites (UBEEP) du CIRMF. Elle a été co-financée par le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF, Gabon), le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant ORIGIN JCJC 012) et l'Agence Nationale de Bourses du Gabon (ANBG).

Dédicaces

A mon épouse Miriame Bouanga, cette thèse est aussi la tienne, pour les sacrifices et le soutien inconditionnel qui m'ont permis d'avancer sereinement dans mon travail de thèse.

Celui qui a trouvé une femme a trouvé le bonheur, puisse notre Dieu te bénir.

A ma famille, particulièrement Mme Bipety Angele, Mme Mbata Pierrette et Mme Malombi Thérèse, merci pour votre amour, votre soutien. Vous pouviez continuer à bénir Dieu car il fait toutes choses bonnes en son temps.

La primeur revient à celui qui fait au-delà de ce que je peux imaginer, mon compagnon de tous les jours, l'admirable conseiller. Celui par qui je puis tous car son Esprit me fortifie.
A Jésus-Christ soit la gloire, l'honneur et la louange Amen.

Yalla baxna, douma bayi

Remerciements

Je remercie infiniment mes directeurs de thèse le Docteur Franck PRUGNOLLE et le Professeur Cheikh Tidiane Bâ d'avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce voyage.

Merci M. Cheikh Tidiane Bâ pour vos conseils et vos encouragements, vous qui m'aviez toujours soutenu dès le début. C'est un honneur pour moi de vous avoir comme directeur de thèse.

Au Docteur Franck PRUGNOLLE, bien que te remercier ne soit pas suffisant pour moi, mais je tiens à te le dire, je te remercie infiniment Franck pour m'avoir fait découvrir l'univers des *Plasmodium* chez les grands singes en m'offrant un sujet de thèse. Tu m'as soutenu, encouragé à des moments où je déprimais, merci pour m'avoir fait confiance tout au long de ce travail. Ta simplicité, ton humilité, ta rigueur et ta patience ont été une source de motivation pour moi.

Je remercie infiniment le Professeur titulaire Brice Augustin SINSIN, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie infiniment le Professeur Constance AGBOGBA, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie infiniment le Professeur associé Jill D Pruetz, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie infiniment Monsieur Papa Ibnou NDIAYE (Maitre-assistant), d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie infiniment Monsieur Souleye NDIAYE, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie infiniment le Professeur titulaire Papa Mbacké SEMBENE, d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie infiniment le Docteur Eric LEROY, Directeur Générale du CIRMF, et à travers lui toute l'institution, pour m'avoir permis de faire cette thèse.

Je remercie infiniment le Docteur Benjamin OLLOMO, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biodiversité, Évolution et Écologie de Parasites (UBEEP). Je vous remercie également pour vos conseils.

Je remercie infiniment le Docteur François RENAUD pour ses conseils et encouragements dans la rédaction des articles, merci à vous Docteur.

Merci, Docteur Barthélemy NGOUBANGOYE, pour m'avoir mis en contact avec mon encadrant Franck Prugnotte et pour ses nombreux conseils.

Merci au Docteur Augustin MOUINGA-ONDEME, Docteur Gaël MAGANGA et au Pr LEKANA-DOUKI, pour leurs conseils et soutiens.

Merci, M Illich MOMBO mon binôme, pour son aide dans l'initiation à la phylogénie et pour toutes les discussions autour d'un plat de désossé à la marmite “*Livingou*”. Une collaboration est née et se poursuivra, nous avons été plus qu'un parasite faisant chemin avec un virus.

Merci spécial, à Céline ARNATHAU et Patrick DURAND pour l'aide énorme qu'ils m'ont apporté, dans le suivi du travail du séquençage.

Merci, à Pamela, Huguette, Andy, Anthony, Dr Thierry-Audrey, Céleste, Brigitte, Dr Statiana MBOUI, Sidney, Irène, M. Aubin KOUMBA et au Dr Sheila MAKIALA, Dr N'DILIMABAKA, Dr Sonia Lekana-Douki.

Je remercie tous les membres de l'Unité Biodiversité, Évolution et Écologie des Parasites du Centre International de Recherche Médicales de Franceville (CIRMF) : Dr Bertrand MVE-ONDE, Nancy DIAMELLA MOUKODOUM, Dr DELICAT-LOEMBET Lucrèce, Dr Virginie ROUGERON, Lauriane YACKA-MOUELE, Éloïse SUQUET, Alain-Prince OKOUGA

Et toute l'équipe d'Entomologie Boris MAKANGA, Dr Diego AYALA, Dr Christophe PAUPY, Nil RAHOLA, Judicaël OBAME NKOGHE, Billy TENE,

Je remercie tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE : SCIENCES ET TECHNIQUES
THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Écologie et Gestion des écosystèmes

Nom et prénom du candidat : BOUNDENGA Larson Amédée

Titre de la thèse : Les *Plasmodium* de Primates du Gabon : Diversité, Transferts Inter-espèces et Virulence

Date et lieu de soutenance : 16 Novembre 2015 à l'UCAD (Grand amphi de l'ESP)

Résumé : L'émergence des maladies infectieuses est liée à l'anthropisation croissante et la conquête par l'homme du milieu forestier. Les activités humaines augmentent les interactions entre l'Homme et la faune sauvage ce qui a pour conséquences des échanges de pathogènes. Il devient ainsi crucial et urgent de recueillir des données précises sur la diversité des agents pathogènes circulant dans la faune sauvage et en particulier chez les primates non humains (PNHs). Les parasites du genre *Plasmodium*, agent du paludisme chez l'homme, sont des parasites dont l'histoire passé et présente montre qu'ils sont capables d'infecter une large gamme d'hôtes lorsque l'opportunité se présente. Ce travail de thèse a pour but de comprendre les risques d'émergences de nouveaux agents du paludisme au Gabon. Nous nous sommes intéressés à étudier (i) la diversité plasmodiale chez les primates non humains, (ii) d'estimer la possibilité de transfert inter-espèces et (iii) d'évaluer la virulence de ces pathogènes sur la santé de primates. Ces questions ont été abordées à travers différentes approches réunissant des méthodes non-invasives et invasives pour la collecte d'échantillons, des outils de biologie moléculaire ainsi que des analyses phylogénétiques. Les résultats obtenus montrent l'existence de 11 espèces de *Plasmodium* qui circulent chez les PNHs du Gabon : *Plasmodium gaboni*, *Plasmodium reichenowi*, *Plasmodium billcollinsi*, *Plasmodium adleri*, *Plasmodium blackloci*, *Plasmodium Praefalciparum*, *Plasmodium ovale-like*, *Plasmodium vivax-like*, *Plasmodium malariae-like*, *Plasmodium gonderi* et *Plasmodium sp DAJ*. Cette thèse a aussi permis de démontrer pour la première fois que la barrière génétique qui détermine la spécificité d'hôte apparente des *Laverania* (sous-genre de parasites infectant les grands singes africains) n'est pas complètement imperméable, et que des échanges de parasites entre gorilles et chimpanzés sont possibles dans des environnement confinés. Elle montre également que l'Homme peut transmettre *P. falciparum* aux chimpanzés et aux mandrills. Aucun transfert de *P. falciparum* vers les gorilles n'a été documenté. En outre, aucune souche simienne n'a été retrouvée dans la population humaine. L'analyse des parasites circulant dans la faune sauvage au Gabon nous a permis de mettre en évidence trois nouvelles lignées qui circulent chez les céphalophes et de montrer que celles-ci, d'un point vue écologique, ne sont pas uniquement spécifiques aux antilopes. Le suivi de santé des primates, nous a également permis de montrer que ces parasites peuvent avoir des effets délétères sur grands singes. L'ensemble de nos résultats démontrent que les grands singes du Gabon sont naturellement infectés par une large diversité de *Plasmodium* qui peuvent provoquer la maladie chez les primates et soulignent le fait que ces échanges des pathogènes entre Homme et primates non-humains pourraient avoir des implications pour la conservation et la santé publique.

Mots clés : Diversité, *Plasmodium*, spécificité hôte, Transferts inter-espèces, Virulence, phylogénie, Primate non-humain, Homme, Céphalophes et outils moléculaires.

Liste de Figures

Figure 1: Classification partielle des <i>Plasmodium spp</i>	8
Figure 2: Relation entre parasites et vecteurs	9
Figure 3: Faciès de distribution du paludisme en Afrique	12
Figure 4: Classification partielle des anophèles	16
Figure 5: Principale étape du cycle biologique des anophèles.....	17
Figure 6: Cycle biologique des anophèles.....	18
Figure 7: Circulation de <i>Plasmodium</i> entre Homme et PNH.....	19
Figure 8 : Système d'interaction entre les différents intervenants dans cycle du <i>Plasmodium</i> ..	20
Figure 9 : Les grandes étapes de la vie du <i>Plasmodium</i> au sein des hôtes.....	22
Figure 10 : Phylogénie simplifiée des <i>Plasmodium</i> connus avant 2009	25
Figure 11 : Diversité plasmodiale en circulation chez PNH	28
Figure 12: Distribution des primates non-humains dans le monde.....	31
Figure 13 : Classification de l'Ordre des primates	31
Figure 14: Les différentes familles des primates	32
Figure 15: Carte topographiques du Gabon	35
Figure 16 : Variation mensuelle de la pluviométrie en zone de forêt en 2009.....	37
Figure 17: Les différents types de forêts du Gabon	38
Figure 18: Deux espèces de galagos observées dans la forêt gabonaise.....	40
Figure 19: <i>Perodicticus potto</i> et distribution géographique.....	40
Figure 20: Quelques espèces de la famille des <i>Cercopithecinae</i> du Gabon.....	42
Figure 21: Distribution des mandrills au Gabon	43
Figure 22: Les différentes espèces de colobes du Gabon.....	44
Figure 23 : Distribution des Gorilles d'Afrique de l'Ouest au Gabon	45
Figure 24: Un jeune chimpanzé orphelin	46
Figure 25 : Distribution des espèces chimpanzés.....	47
Figure 26: Réservoir parasitaire des PNH.....	49
Figure 27 : Collecte de fèces en milieu naturel	57
Figure 28: Les différentes étapes du protocole d'extraction d'ADN	59
Figure 29: Organisation de l'ADN mitochondrial des Mammifères	60
Figure 30: Représentation du génome mitochondrial d'un <i>Plasmodium</i>	61
Figure 31: Les différents couples d'amorces utilisées	62
Figure 32: Principe de la PCR nichée. Deux PCR successives.....	63

Figure 33: Illustration d'une phase de séquençage	63
Figure 34: Schéma retraçant les transferts observés durant l'étude.....	148

Liste de tableaux

Article 1

Table 1 List of collection sites, abbreviations and geographical coordinates in Gabon.....	74
Table 2 Percentage of mixed infections detected.....	74
Table 3 Accession numbers of the sequences of reference used in the phylogenetic tree.....	75
Table 4 Results of the logistic regression	77

Article 2

Table 1: Date of sampling and number of samples collected in each site.....	100
Table 2: Distribution of infection (expected and unexpected) by host species.....	100
Table 3 Parasites diversity and hosts species.....	101

Article 3

Table 1 Wonga serum chemistry results.....	109
Table 2 Wonga hematological results.....	109

Article 3

Table 1 Host species screened for the presence of <i>Haemosporidian</i> parasites, number of samples screened and of infected animals obtained, associated parasite and vector species	140
---	-----

Liste des abréviations

CIRMF: Centre International de Recherche Médicale de Franceville

Cpz : Chimpanzé

Cf: abréviation de l'expression latine confer qui signifie “ se référer à”

Gor: Gorille

PNH : Primates non-humains

MARA: Mapping Malaria Risk in Africa

SNP: Polymorphism d'un seul nucleotide (Sing-nucleotide polymorphism)

PCR: Polymérisation en réaction de chaîne

UICN : Union Internationale pour la conservation de la nature

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ADNmt: AND mitochondrial

Cyt-B: Cytochrome B

PPG : “Programme de protection des gorilles

LEK : Parc de la Lékédi

CDP : Centre de Primatologie

°C: degré Celsius

Sommaire

Introduction Générale.....	1
PREMIERE PARTIE : GÉNÉRALITES	5
CHAPITRE 1 LE PALUDISME CHEZ LES PRIMATES NON HUMAINS	6
Introduction	6
I. Les parasites <i>Plasmodium</i>	8
1. Taxonomie du genre <i>Plasmodium</i>	8
2. Les <i>Plasmodiums</i> humains	10
3. Distribution géographique du paludisme en Afrique subsaharienne	11
4. Origine de <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i>	13
II. Les vecteurs	15
1. Systématique des Anophèles.....	15
2. Bio-écologie de l'hôte anophèles.	16
3. Les vecteurs de forêt et leur rôle potentiel dans le transfert inter-espèces.....	19
III. Relation hôte-parasite entre le <i>Plasmodium</i> et ses hôtes	20
1. Cycle de vie chez l'Homme	21
2. Cycle de vie chez le vecteur.....	23
IV. <i>Plasmodium</i> chez Les primates non humains africains.....	24
1. Aperçu historique sur les <i>Plasmodium</i> des PNHs africains.....	24
2. État actuel des <i>Plasmodiums</i> des primates non humains	26
CHAPITRE 2 LES PRIMATES NON HUMAINS DU GABON	29
I. Généralités sur les primates non humains.....	30
1. Le sous ordre des <i>Strepsirrhini</i> (Prosimiens).....	32

2. Le sous ordre des <i>Haplorhini</i>	33
II. Présentation de la zone d'étude et aperçu des PNHs du Gabon	35
1. Présentation de la zone de l'étude	35
2. Aperçu sur les primates non humains du Gabon	39
III. Primates non humains source de maladies infectieuses	47
DEUXIEME PARTIE : APPROCHE METHODOLOGIQUE	50
I.PRÉSENTATION DU SUJET DE THÈSE	51
1. Problématique	51
2. Objectifs de la these	54
II. MATERIELS ET METHODES	55
1. Populations d'étude	55
2. Collecte d'échantillons.....	56
3. Études moléculaires.....	58
4. Analyses statistiques	65
TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....	66
CHAPITRE 1 DIVERSITÉ PLASMODIALE CHEZ LES GRANDS SINGES DU GABON..	69
Résumé.....	70
Article-1 Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon.....	71
CHAPITRE 2 TRANSFERT INTER-ESPÈCES ENTRE PRIMATES NON HUMAINS ET HOMME	80
Résumé.....	81
Article-2 Ape malaria host specificity can be broken in confined environments	82
CHAPITRE 3 INFECTION NATURELLE D'UN CHIMPANZE A <i>P. REICHENOWI</i>	102

Résumé.....	103
Article-3 Malaria-like symptoms associated with a natural <i>Plasmodium reichenowi</i> infection in a chimpanzee	104
CHAPITRE 4 CARACTERISATION DES <i>PLASMODIUM</i> CIRCULANT DANS LA FAUNE SAUVAGE COEXISTANT AVEC PRIMATES NON-HUMAINS AU GABON ..	113
Résumé.....	114
Article-4 Haemosporidian parasites of antelopes and other vertebrate from Gabon, Central Africa.....	115
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION	144
DISCUSSION GENERALE	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	154
REFERENCES.....	156

Introduction

Générale

Les rôles que jouent les organismes pathogènes¹ sur l'écologie et l'évolution du monde du vivant restent au centre des débats (Guégan et *al.*, 2005). L'écosystème est un grand réseau complexe d'interactions où interagissent les organismes vivants et le milieu au sein duquel ils vivent. Tout facteur capable de modifier ces éléments fondamentaux peut entraîner une modification du complexe (Ricklefs and Miller, 2005, Bauda and Monfort, 2004). Pendant longtemps, les parasites ont été laissés aux seules mains des parasitologues mais cette époque est belle et bien révolue. En effet, l'influence du parasitisme sur l'évolution du vivant est pour certains écologues un thème de recherches majeur et incontournable sachant que tous les organismes vivants sont concernés par le parasitisme (Thomas et *al.*, 2005).

Depuis le début des années 80, la parasitologie est devenue un thème principal en écologie évolutive (Combes, 2001, Anderson and May, 1982). De par leur position centrale au sein des écosystèmes, il est intéressant aujourd'hui, de comprendre leurs rôles et leurs impacts sur les communautés naturelles (Hudson et *al.*, 2006, Dobson, 2004). Aujourd'hui, le parasitisme est étudié sous bien des aspects (médecine, écologie évolutive, écologie comportementale, immunologie, etc.). Cette multidisciplinarité permet d'obtenir une vision et compréhension globale du parasitisme, de leur fonctionnement et de leur évolution, autant d'aspects qui sont fondamentaux pour la compréhension globale des maladies infectieuses et notamment pour prédire l'émergence et la réémergence de maladies (Harvell, 2004, Grenfell and Dobson, 1995).

Les maladies émergentes et réémergentes sont des maladies qui sont apparues récemment dans une population, ou qui ont déjà existé mais dont l'incidence et la répartition géographique augmente rapidement (Morse, 2004, Morse, 1993). Chez l'Homme, près de 75% des émergences sont des zoonoses² et la plupart ont pour origine la faune sauvage, en particulier les primates non-humains (Wolfe et *al.*, 2007, Chapman et *al.*, 2005). L'apparition de ces maladies infectieuses chez l'Homme est le plus souvent due à l'anthropisation (Morse, 2004, Epstein, 1995). En effet, l'Homme a largement contribué à la modification de la biosphère³, et son impact sur l'écosystème a commencé dès le début de son aventure en milieu forestier à la recherche des ressources nécessaires à sa survie (McMichael, 2001). Cependant, l'étendue réelle et les conséquences des actions de l'Homme sur les écosystèmes n'ont pas cessé de croître (Martens and McMichael, 2002).

¹ Pathogène : agent infectieux ayant des effets délétère sur l'organisme hôte, il est souvent à l'origine des maladies

² Zoonose : infection ou infestation naturellement transmissible de l'animal à l'Homme et vice versa

³ Biosphère : système planétaire incluant l'ensemble des organismes vivants et des milieux où ils vivent.

L'anthropisation favorise le contact entre l'Homme et la faune sauvage et en particulier les primates non-humains (Haurez et *al.*, 2013). Ces interactions ont augmenté notamment du fait que l'exploitation forestière est de plus en plus intense. L'abattage commercial des arbres représente en effet une activité économique importante dans des nombreux pays tropicaux conduisant à l'installation de populations humaines de plus ne plus denses dans les zones forestières les plus reculées. Ces changements socio-économiques et démographiques ont entraîné une augmentation de l'exposition humaine à la faune sauvage ainsi que la mise en place de conditions sociales et environnementales plus favorables à l'émergence de nouvelles infections zoonotiques (Wolfe et *al.*, 2005).

Dans ce contexte d'augmentation des interactions entre l'Homme et la faune sauvage, il devient donc crucial et urgent de recueillir des données précises sur la diversité et l'écologie des agents pathogènes circulant dans la faune, notamment chez les primates, afin de pouvoir évaluer les risques de transfert (Wolfe et *al.*, 2005, Wolfe et *al.*, 1998). Nos connaissances actuelles sur les agents pathogènes des primates sauvages est encore minime et biaisée (Gillespie et *al.*, 2008). Les données de référence sur les maladies infectieuses circulant dans les populations de primates sauvages sont donc essentielles pour commencer à évaluer et à gérer le risque de transmission de nouvelles maladies à l'Homme (Wolfe 2005), mais aussi aux primates, beaucoup d'entre eux étant actuellement en danger d'extinction (Gillespie et *al.*, 2008). Les récentes épidémies de SIDA (Salomon and Murray, 2001, Dehne et *al.*, 1999), de grippe (Webster et *al.*, 2006, Cameron et *al.*, 2000) ou d'Ebola démontrent l'impact que peuvent avoir ces nouvelles maladies infectieuses sur les populations humaines et ce à très court terme (Leroy et *al.*, 2014, Walsh et *al.*, 2007, Leroy et *al.*, 2004, Walsh et *al.*, 2003). La proximité phylogénétique entre Hommes et primates non humains (PNH) (Young et *al.*, 2010, Templeton, 1983) est un facteur important dans le franchissement de barrière d'espèces par les pathogènes (Cooper et *al.*, 2012, Pedersen and Davies, 2009).

Dans le cadre du présent travail de thèse, nous nous concentrerons sur un groupe bien particulier de protozoaires pathogènes responsables du paludisme dont l'histoire évolutive (passée et présente) montre le risque que ce groupe peut faire courir sur la santé humaine. Les maladies vectorielles sont responsables d'un tiers des maladies infectieuses émergentes et le genre *Plasmodium* a d'ores et déjà montré qu'il pouvait être à l'origine de nouvelles maladies infectieuses chez l'Homme. En effet, de nombreux exemples de transferts, spécialement entre les primates non humains et l'Homme, ont été documentés chez ce genre. Récemment un parasite infectant naturellement les macaques en Asie du sud-est, *Plasmodium knowlesi*, a été

montré comme étant dorénavant responsable d'environ 70% des cas de paludisme chez l'Homme dans certaines régions (Cox-Singh and Culleton, 2015, Cox-Singh et *al.*, 2008, Singh et *al.*, 2004). Ces transferts sont le résultat des contacts accrus entre primates non-humains et Homme qui favorisent l'apparition de nouvelles maladies infectieuses chez l'Homme. Les *Plasmodium* sont des protozoaires dont la population à risque d'infection à ce pathogène est estimée à 2,5 milliards (Manguin et *al.*, 2008). Des études sur la compréhension de l'histoire évolutive de ces parasites ont montré que les grands singes africains sont naturellement infectés par une large diversité de *Plasmodium* (Rayner et *al.*, 2011, Liu et *al.*, 2010, Prugnolle et *al.*, 2010) et que certains de ces parasites sont susceptibles d'être transmis à l'Homme et vice versa (Prugnolle et *al.*, 2013, Duval et *al.*, 2010, Krief et *al.*, 2010). D'où la question de savoir si les grands singes pourraient constituer des réservoirs de *Plasmodium spp* pour les humains. Y'a-t-il des transferts qui se déroulent entre populations humaines et primates non-humains ou vice versa au Gabon actuellement ?

Dans le contexte du Gabon, il est plus qu'un important de déterminer les espèces de *Plasmodium* en circulation chez les primates non-humains, car le Gabon est une zone importante dans la distribution des grands singes africains (*Gorilla g. gorilla* et *Pan t. troglodytes*) (Gautier-Hion et *al.*, 1999). Le pays est situé en plein zone endémique de transmission du paludisme (Mawili-Mboumba et *al.*, 2012). Alors, il est nécessaire d'évaluer le risque d'émergence de nouvelles souches dont l'Homme pourrait jouer le rôle de possible catalyseur. C'est la raison pour laquelle, il nous est apparu important de pouvoir apporter une contribution scientifique dans le domaine de la connaissance des *Plasmodium spp* des PNH dans ce pays, où les activités anthropiques ne cessent d'accroître le contact entre Homme et faune sauvage. Il nous semble important de : (i) déterminer la diversité plasmodiale chez les PNH, (ii) d'estimer la possibilité de transfert inter-espèces et enfin (iii) d'évaluer la virulence de ces pathogènes sur la santé de primates.

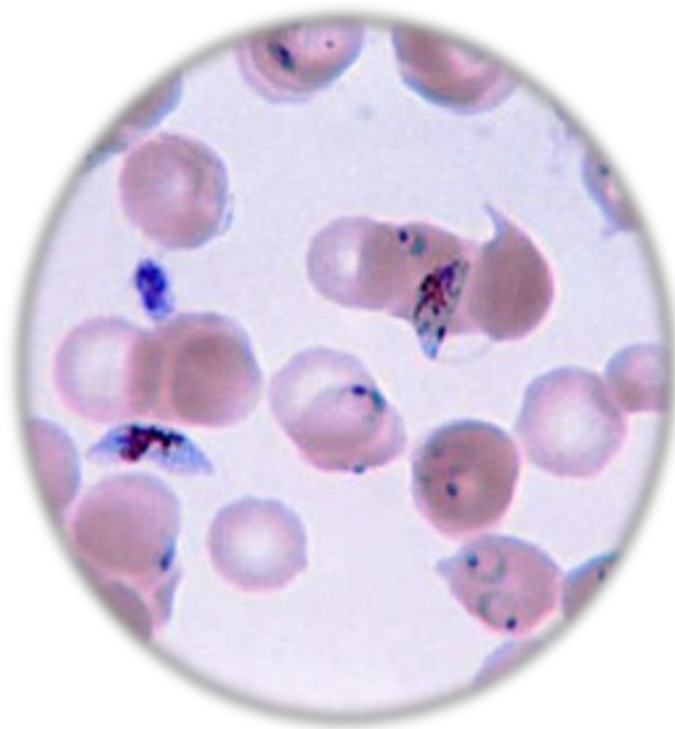
Mais avant tout, nous allons dans un premier temps vous présenter les modèles biologiques sur lesquels nous avons travaillé à savoir les pathogènes du genre *Plasmodium* et les primates non-humains du Gabon et ce que nous connaissons aujourd'hui de leurs interactions.

PREMIERE PARTIE

GÉNÉRALITES

Chapitre 1

Le paludisme chez les primates non-humains



Introduction

Le paludisme est une maladie infectieuse due à un parasite hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'hôte vertébré par la piqure d'un moustique anophèle (Schaer et *al.*, 2013). C'est l'une des maladies les plus importantes de l'Homme à travers son histoire et, qui continue d'être une préoccupation majeure en santé publique (Perkins, 2014). Cinq espèces sont connues pour infecter l'Homme, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* (Ménard et *al.*, 2010, Cox-Singh et *al.*, 2008). *P. knowlesi* est une espèce qui, à l'origine, infectait uniquement les primates des forêts asiatiques, notamment les macaques (Luchavez et *al.*, 2008, Singh et *al.*, 2004), toutefois, le contact entre l'Homme et ces primates a permis le passage de ce *Plasmodium* des singes à l'Homme.

P. falciparum est de loin la plus virulente des cinq espèces qui infectent l'Homme (Volkman et *al.*, 2001), car il est responsable de plus de 91% des décès chaque année dont 98% en Afrique subsaharienne constitués des enfants en bas âge et les femmes au cours de leurs premières grossesses (WHO, 2015). Près de 208 millions de cas cliniques sont recensés chaque année (WHO, 2015) et les estimations des populations exposées au risque sont de l'ordre du milliard (Manguin et *al.*, 2008). *P. falciparum* sévit toute l'année dans les pays équatoriaux où il peut présenter des recrudescences saisonnières. C'est l'espèce prédominante en Afrique tropicale, en Asie orientale, en Océanie et dans la région amazonienne (Martiny et *al.*, 2012, Mouchet, 1996).

Depuis la description initiale des *Plasmodiums* par Alphonse Laveran, plus de deux cents espèces ont été décrites chez les mammifères, les oiseaux et les reptiles (Schaer et *al.*, 2013, Snounou et *al.*, 2011). Dès les années 1920, des études décrivaient des *Plasmodiums* chez les grands singes africains notamment chimpanzés et gorilles. Certains chercheurs avaient noté une ressemblance entre les *Plasmodiums* humains et ceux observés chez les singes africains (Snounou et *al.*, 2011). Des années durant, il a été admis que les espèces qui infectent l'Homme lui étaient spécifiques. Cependant, des études récentes sur l'origine de *P. falciparum* ont révélé que ces espèces que nous pensions être spécifiques de l'Homme ont une origine simienne (Prugnolle et *al.*, 2011a, Prugnolle et *al.*, 2011c, Kaiser et *al.*, 2010, Prugnolle et *al.*, 2010). Ces résultats ont complètement changé notre compréhension de l'histoire évolutive du genre *Plasmodium* et des liens que les différentes espèces connues (notamment chez les primates) entretenaient les unes avec les autres (Prugnolle et *al.*, 2013).

I. Les parasites *Plasmodium*

1. Taxonomie du genre *Plasmodium*

Les agents responsables du paludisme sont des protozoaires appartenant à la classe des sporozoaires du genre *Plasmodium* (Figure 1). Ces organismes unicellulaires ont un cycle qui débute toujours par un germe vermiforme et mobile, appelé sporozoïte. Ils appartiennent à l'ordre des *Haemosporida* qui est caractérisé par des micros et macrogamétocytes se développant indépendamment. Ils sont regroupés dans le sous-ordre des *Haemosporidae*. Ce sous-ordre est subdivisé en trois familles à savoir *Plasmodidae*, *Haemoproteidae* et *Leucocytozoonidae*. Toutes ces familles présentent des sporogonies qui chez les vertébrés sont transmises par des insectes hématophages. Les *Leucocytozoonidae* sont transmis par les insectes du genre *Simulium*, les *Haemoproteidae* sont transmises par les *Culicoides*, les *Stomoxys* et les *Hippoboscidae* (Manguin et al., 2008, Mesnil, 1903) (Figure 1).

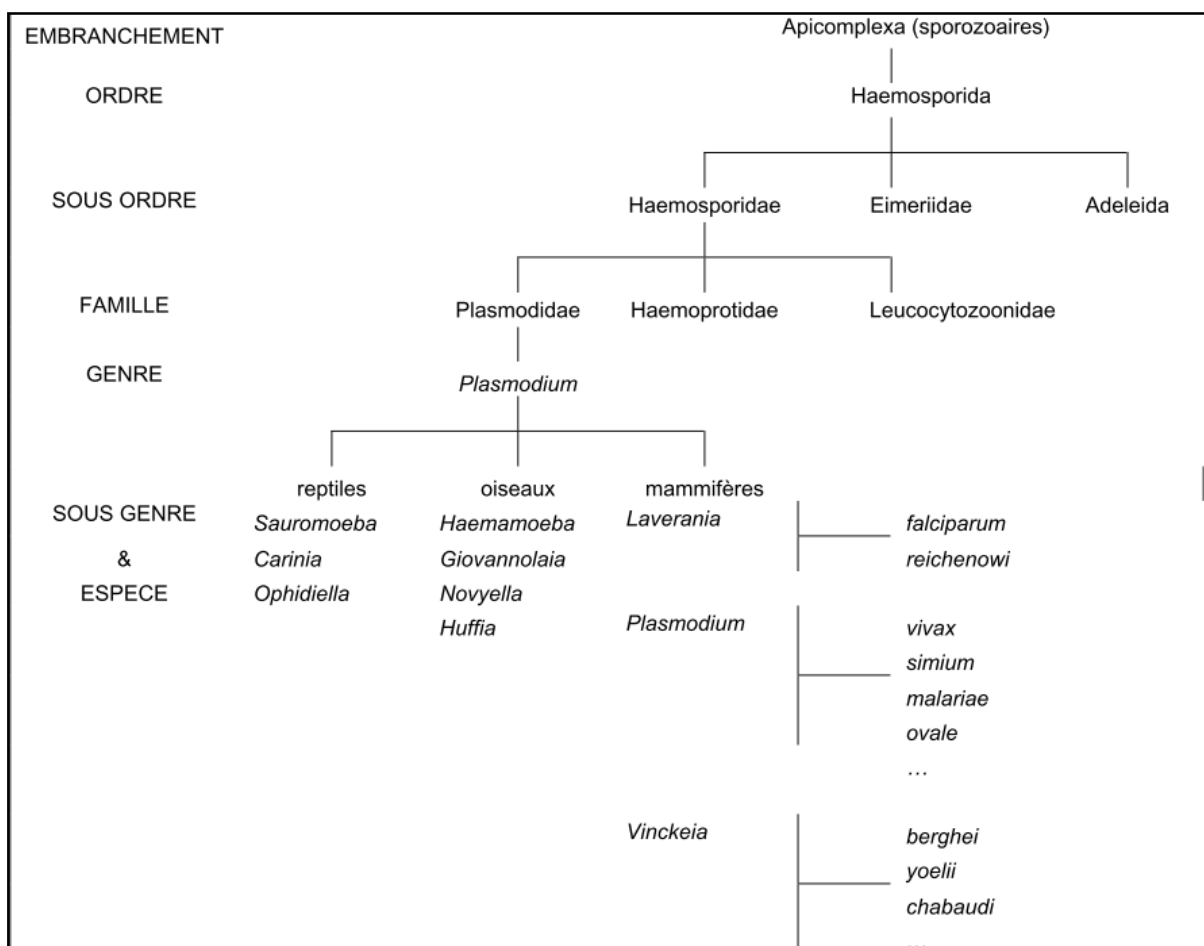


Figure 1: Classification partielle des *Plasmodium* spp (Bruce-Chwatt, 1980)

Les *Plasmodidae* qui sont transmises par les *Anophelinae* et les *Culicinae* (Figure 2) comprennent au moins entre 66 à 80 espèces (Manguin et al., 2008). Cette famille infecte plusieurs groupes d'hôtes qui vont des mammifères, aux oiseaux et reptiles (Grassé, 1953). Au sein de cette famille, le genre *Plasmodium* qui est un protozoaire parasite transmis par un vecteur a une large répartition géographique. Ce genre compte environ 200 espèces et, chez les primates, est divisé en deux sous-genres : celui des *Laveranias* qui jusqu'à 2009 comptaient uniquement *P. reichenowi* et *P. falciparum* et le sous genre des *Plasmodiums* (*non-Laverania*) qui comprend toutes les autres espèces infectant les primates (Figure 1) (Duval, 2012, Manguin et al., 2008).

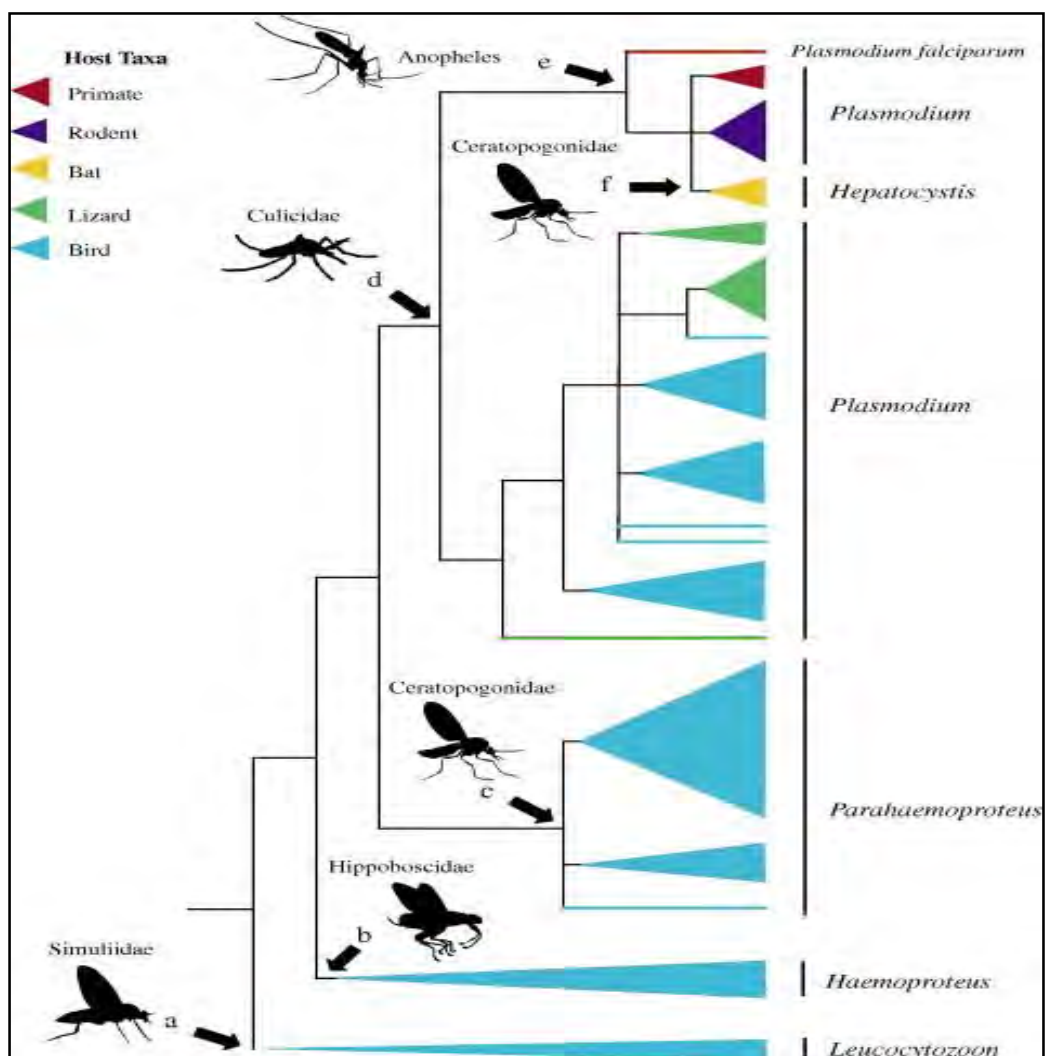


Figure 2: Relation entre parasites et vecteurs (Martinsen et al., 2008).

Les taxons d'hôtes sont indiqués par des couleurs.

Les familles de vecteurs sont indiquées sur la figure.

L'existence de nombreuses espèces de *Plasmodium* et du grand nombre d'hôtes qu'infectent ces parasites donnent autant d'arguments qui en font un bon modèle animal dans la recherche pour l'écologie évolutive, l'adaptation et bien d'autres domaines.

2. Les *Plasmodium spp* humains

Sur les quelques 200 espèces que compte la famille des *Plasmodiidae*, cinq espèces uniquement sont connues pour infecter l'Homme et être responsable du paludisme chez ce dernier. Nous présentons simplement celles infectant l'Homme, à savoir : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*.

P. falciparum (Welch, 1887) est responsable de la fièvre tierce maligne. Il est la plus fréquente en Afrique sub-saharienne où 90% des cas de décès lui sont associés. Il est plus redoutable car pouvant être à l'origine des formes graves (WHO, 2015). Dans les régions équatoriales, il est transmis toute l'année avec cependant des recrudescences saisonnières. Dans les régions Sub-tropicales, il ne survient qu'en période chaude et humide. Sa transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. Des études récentes montrent qu'il est capable d'infecter aussi les grands singes africains (Duval et *al.*, 2010, Krief et *al.*, 2010).

P. vivax (Grassi, 1890) est responsable de fièvres tierces bénignes. Il est aussi très répandu dans le monde et évolue avec des rechutes à long terme. Il est rare en Afrique mais plus fréquente en Asie, Océanie, Amérique du Sud et Centrale (Guerra et *al.*, 2010). Son absence en Afrique noire est due au fait que les populations ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. En effet, les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif ne possèdent pas ces récepteurs (del Portillo et *al.*, 2001). Il a été démontré que les grands singes africains sont des réservoirs potentiels de *P. vivax* (Liu et *al.*, 2014, Prugnolle et *al.*, 2013).

P. ovale (Stephens, 1922) est aussi l'agent d'une fièvre tierce bénigne. Il est très proche de *P. vivax* avec lequel il a été très longtemps confondu (Collins and Jeffery, 2005). Il est rare et se rencontre presque exclusivement en Afrique de l'Ouest et Asie. Considéré comme peu pathogène, son évolution est bénigne mais on peut observer, comme avec *P. vivax*, des rechutes tardives. Schématiquement, on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où cette dernière espèce est absente (Snow et *al.*, 2005, Lysenko and Beljaev, 1969, Lacan, 1963).

P. malariae (Laveran, 1881) est responsable d'une fièvre quarte et de troubles rénaux. Il est responsable d'environ 1% des cas de paludisme seulement. Il est présent sur les trois continents mais se rencontre surtout en Amérique du Sud où elle est très fréquente dans certaines tribus amérindiennes (Andrade et *al.*, 2010).

P. knowlesi est un *Plasmodium* proche génétiquement de *P. vivax*, et morphologiquement proche de *P. malariae*. Il a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie (mais était connu antérieurement chez le singe). Il a une répartition qui est étroitement liée à la distribution des singes macaques (hôte naturel) et à celle de son vecteur connu pour piquer l'Homme et le singe (Cox-Singh et *al.*, 2008, Singh et *al.*, 2004). Il apparaît claire aujourd'hui que la déforestation et le contact fréquent entre l'Homme et les primates ont fortement contribué à l'émergence de ce parasites dans la population humaine (Cox-Singh and Culleton, 2015, Wilcox and Ellis, 2006).

3. Distribution géographique du paludisme en Afrique subsaharienne

Au-delà de la classification du paludisme basée sur l'observation parasitologique de la présence du parasite dans le sang, il a été possible de proposer une autre classification du paludisme intégrant plusieurs facteurs environnementaux intervenant dans les relations hôte / vecteur / parasite, facteurs qui sont variables selon les conditions écologiques.

La notion de faciès prend en compte l'écosystème, avec ses composantes écologiques et épidémiologiques. Elle intègre les dynamiques de la transmission en fonction de la variabilité des facteurs abiotiques et biotiques des écosystèmes. Un faciès pourrait ainsi être défini comme un ensemble de lieux dans lesquels le paludisme présente les mêmes caractéristiques de transmission, de développement de l'immunité et de manifestations pathologiques (Carnevale et *al.*, 2009). En Afrique Sub-Saharienne, il existe 4 grands types de faciès que nous présentons de manière brève selon (Carnevale et *al.*, 2009, Mouchet et *al.*, 1993, Carnevale et *al.*, 1984) (Figure 3):

✓ Le faciès de transmission permanente qui correspond au paludisme endémique avec une transmission intense et permanente. Il existe de variation saisonnière au niveau de l'intensité de la transmission, mais pas d'interruption, même brève. La transmission est assurée par *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. Il est présent en Afrique centrale.

✓ Le facies à transmission saisonnière longue caractéristique d'un paludisme endémique avec une transmission régulière saisonnière longue pendant la saison de pluies (+ ou – 6 mois). La transmission est faite par *An. gambiae* et *Anopheles arabiensis* pendant la saison de pluie et *An. funestus* au début de la saison sèche. Il sévit dans les zones de savane (Burkina Faso, Nigeria).

✓ Le facies de transmission saisonnière courte caractéristique d'un paludisme à transmission annuelle épisodique très courte (2 mois) concentrée pendant la courte saison de pluies et pratiquement interrompue (ou ne se poursuivant qu'à très faible bruit) pendant la longue saison sèche. Transmission est généralement assurée par *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. funestus*. Ce type de paludisme instable à transmission épisodique sévit dans les zones de Sahel et de moyenne altitude.

✓ Le facies à transmission sporadique caractérisé avec un paludisme instable à transmission sporadique intervenant uniquement à la suite de circonstances particulières (pluies inhabituelles, crues, modifications de l'environnement) dans des zones où il ne sévit habituellement pas (plateaux de haute altitude) ou plus. Le vecteur le plus fréquent est *An. arabiensis*. Mais, *An. gambiae* peut aussi être impliqué.

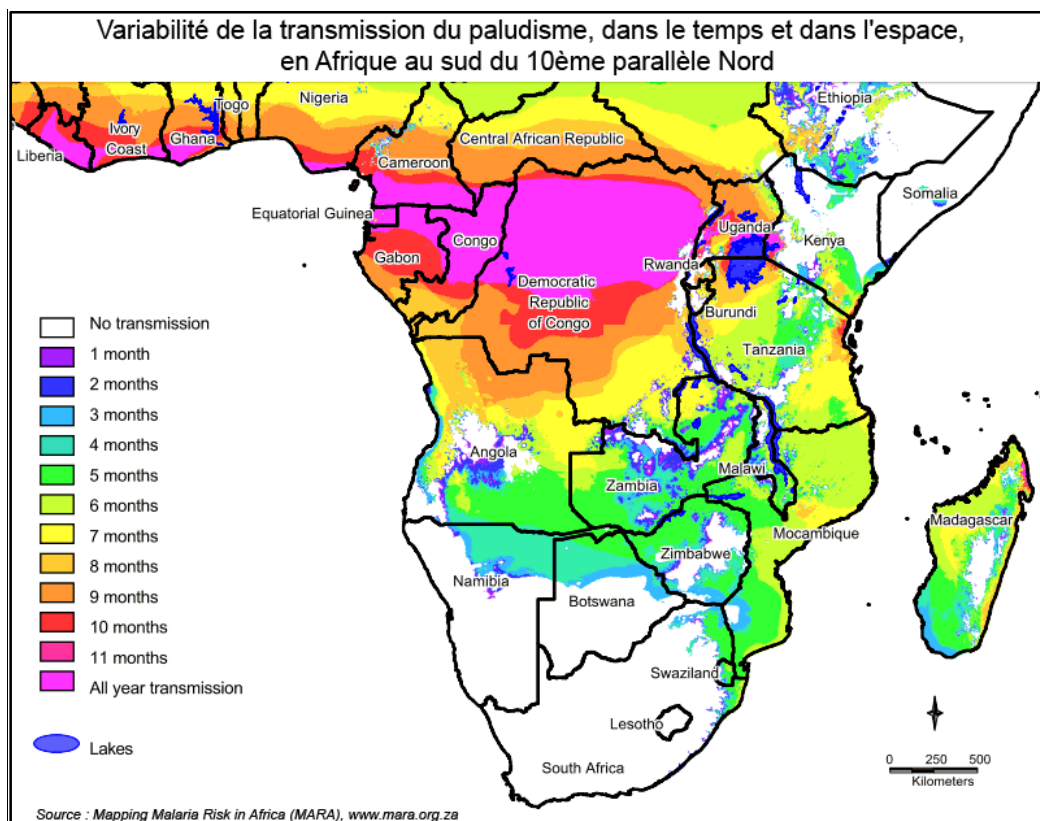


Figure 3: Faciès de distribution du paludisme en Afrique (MARA)

4. Origine de *P. falciparum* et *P. vivax*

Les histoires évolutives du genre *Plasmodium* ont fait l'objet de nombreuses études qui ont été basées sur la morphologie, la biologie et l'affiliation des parasites à leurs hôtes (Cserti and Dzik, 2007). L'apport de plusieurs nouvelles séquences d'autres espèces va préciser le débat dont font l'objet les nombreuses théories élaborées sur le sujet (Das et al., 2007).

Plusieurs de ces parasites se seraient retrouvés associés à l'Homme par transfert latéral à partir d'autres espèces d'hôtes vertébrés (Garnham, 1966a, Garnham, 1966b). Avant 2009, *Plasmodium reichenowi* un parasite de chimpanzés était le seul proche parent connu de *P. falciparum*. Ces deux espèces à cause de leur ressemblance ont été regroupées dans le sous-genre *Laverania* (Cormier, 2013, Snounou et al., 2011). Nous allons parler dans les développements suivants de l'origine probable des deux *Plasmodium spp* les plus répandus.

4.1 Origine de *P. falciparum*

Le débat sur l'origine de *P. falciparum* a été ouvert avec l'étude de Waters et ses collaborateurs qui proposa une origine aviaire de ce parasite c'est-à-dire que l'Homme aurait acquis récemment ce parasite d'un transfert des oiseaux vers l'Homme (Waters et al., 1991). En effet, les analyses phylogénétiques basées sur l'étude des séquences de sous-unités d'ARN ribosomale (ARNr) montrèrent que *P. falciparum* formait un groupe monophylétique⁴ avec les *Plasmodium spp* d'oiseaux d'où la conclusion des auteurs.

Trois années après la première hypothèse sur l'origine de *P. falciparum*, Escalante et Ayala (1994), dans leur étude basée également sur l'ARN 18S, prennent en compte pour la première fois *P. reichenowi*, un parasite isolé chez un chimpanzé africain. Ils vont montrer ainsi que ce parasite est le plus proche parent de *P. falciparum* et que, par conséquent, celui-ci ne provient pas d'un transfert latéral récent des oiseaux vers l'Homme (Escalante and Ayala, 1995, Escalante and Ayala, 1994). Dans cette étude, *P. falciparum* et *P. reichenowi* forment un grand groupe avec les parasites de primates du sous-genre *Plasmodium (non-Laverania)*, rongeurs et les oiseaux (Perkins and Schall, 2002, Escalante et al., 1998, Escalante and Ayala, 1994). Ce qui va d'avantage alimenter le débat sur l'origine de *P. falciparum*.

Les contestations qui se font autour de l'origine probable de *P. falciparum*, soit qu'il provient des oiseaux ou des rongeurs feront rage. Nous pensons que les problèmes ou faiblesses des études reposaient sur deux points essentiels : premièrement le faible nombre d'espèces

⁴ Monophylétique est d'un groupe ou taxon qui regroupe une espèce et tous ses descendants

plasmodiales intégrées dans les analyses et deuxièmement le nombre limité de marqueurs moléculaires utilisés pour l'élaboration des phylogénies. Malgré toute cette controverse *P. falciparum* sera considérée comme ayant une origine africaine (Pearce-Duvet, 2006, Joy et al., 2003, Conway et al., 2000).

L'année 2009 va complètement changer notre compréhension de l'histoire évolutive de *P. falciparum*, car avant cette année une seule espèce (*P. reichenowi*) était connue pour être plus proche de ce parasite. Après la découverte de *Plasmodium gaboni* parasite qui infecte le chimpanzés (Ollomo et al., 2009), plusieurs autres séquences provenant des grands singes africains vont permettre de répondre définitivement à la question sur l'origine de ce parasites.

C'est ainsi que Prugnolle et al. (2010) vont mettre en évidence pour la première fois un *P. falciparum*-like chez les gorilles et plusieurs autres lignées. Ces études vont prouver que le groupe de *Laverania* qui comprend *P. falciparum* possède une grande diversité d'espèces qui circulent chez les primates africains (Boundenga et al., 2015, Prugnolle et al., 2010). Ce qui va permettre de montrer que l'origine de *P. falciparum* ne se trouve pas chez les oiseaux ou les rongeurs mais chez les gorilles qui l'auraient transmis récemment aux hommes via un moustique anophèle anthrozoophilique (Paupy et al., 2013, Rayner et al., 2011, Liu et al., 2010, Prugnolle et al., 2010). Le *P. falciparum*-like de gorilles sera nommé *P. praefalciparum* pour le distinguer de celui qui infecte l'Homme (Gonzalez et al., 2013, Sharp et al., 2013, Prugnolle et al., 2011d).

En 2011, l'hypothèse d'une origine gorille de *P. falciparum* est fragilisée par la découverte d'un *P. praefalciparum* chez un petit singe Africain (*Cercopithecus nictitans*) (Prugnolle et al., 2011d). Cette étude met par ailleurs en évidence l'existence d'au moins deux types de *P. praefalciparum* : 1 et 2. Le *P. praefalciparum* 1 infecte les gorilles et les petits singes (*C. nictitans*) et le *P. praefalciparum* 2 infecte uniquement les gorilles (Gonzalez et al., 2013). D'autres études s'intéresseront par la suite aux petits singes africains mais ne trouveront pas de *P. praefalciparum* (Ayoub et al. 2012). Le débat reste aujourd'hui ouvert concernant la présence potentielle de *P. praefalciparum* chez les petits singes.

4.2 Origine de *P. vivax*

Les premières hypothèses sur l'origine de *P. vivax* avaient suggéré qu'il serait originaire de l'Asie du Sud-Est. Ces hypothèses reposèrent sur le fait que *P. vivax* partage des traits morphologiques et biologiques avec plusieurs parasites de macaques et que, dans cette région

asiatique, les espèces de *Plasmodium* simiens y sont abondants (Garnham, 1966b). Cette hypothèse fut conforter par les analyses phylogénétiques qui placèrent *P. vivax* parmi les *Plasmodium spp* des singes d'Asie (Perkins and Schall, 2002).

La présence du groupe sanguin Duffy négatif dans les populations d'Afrique centrale et de l'Ouest était corrélée à l'absence du *P. vivax*. En effet, ce caractère leurs confère une résistance à l'infection à *P. vivax* (Miller et al. 1976), car le l'antigène Duffy est la seul récepteur d'entrée du parasite à la surface de globule rouge. Il a ainsi été proposé que *P. vivax* aurait co-évolué avec les populations africaines pendant plus longtemps qu'avec les autres populations humaines (Martinsen et al., 2008, Cornejo and Escalante, 2006, Escalante et al., 2005, Carter and Mendis, 2002). Ce qui laissait supposer ainsi une origine africaine de *P. vivax*.

Au cours de ces dernières années, cette hypothèse a été renforcée par des études qui ont révélé la présence de *P. vivax*-like chez les grands singes africains (Liu et al., 2014, Prugnolle et al., 2013, Kaiser et al., 2010). Les *P. vivax*-like des grands singes forment un groupe génétique distinct et bien plus diversifié que celui des parasites de l'Homme (Prugnolle et al., 2013). Ces résultats relevèrent ainsi une origine plus ancienne de la lignée simienne africaine, aussi que les grands singes africains seraient les réservoirs potentiels de *P. vivax*, car jusqu'aujourd'hui des transferts seraient possibles (Prugnolle et al., 2013). Cependant l'origine africaine reste débattue aujourd'hui (Prugnolle et al., 2013).

II. Les vecteurs

Le parasite du paludisme (*Plasmodium*) est transmis d'Homme à Homme par l'intermédiaire d'un vecteur, un moustique du genre *Anopheles* (Carnevale et al., 2009). Seulement une soixantaine d'espèces assurent plus ou moins avec efficacité la transmission des *Plasmodium* sur les 484 espèces que compte ce genre (Carnevale et al., 2009, Guindo, 2007, Gazin, 2001).

1. Systématique des Anophèles

Les vecteurs des parasites du paludisme des mammifères, y compris les humains appartiennent tous au genre *Anophèles* qui occupe une position taxonomique bien précise (Carnevale et al., 2009). Ces moustiques de l'ordre des *Diptera* (insectes possédant deux ailes) appartiennent tous à la famille des *Culicidae* (Rueda, 2008) et à la sous famille des *Anophelidae*

(Anopheles) qui comprend trois genres *Bironella*, *Chagasia* et *Anopheles* (Carnevale et al., 2009).

La transmission de *Plasmodium* est assurée par le genre *Anophèles* qui comprend 6 sous genres (Figure 4). Une soixantaine d'espèces environ sont des vecteurs, dont une trentaine sont des bons vecteurs. Leur distribution et leur efficacité varient selon les régions géographiques. En Afrique sub-saharienne, on considère qu'il existe quelques 150 espèces d'anophèles, dont une douzaine sont d'excellents vecteurs de *Plasmodium* humains et certains parmi les meilleurs vecteurs mondiaux, comme *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili*, *An. moucheti* (Carnevale et al., 2009).

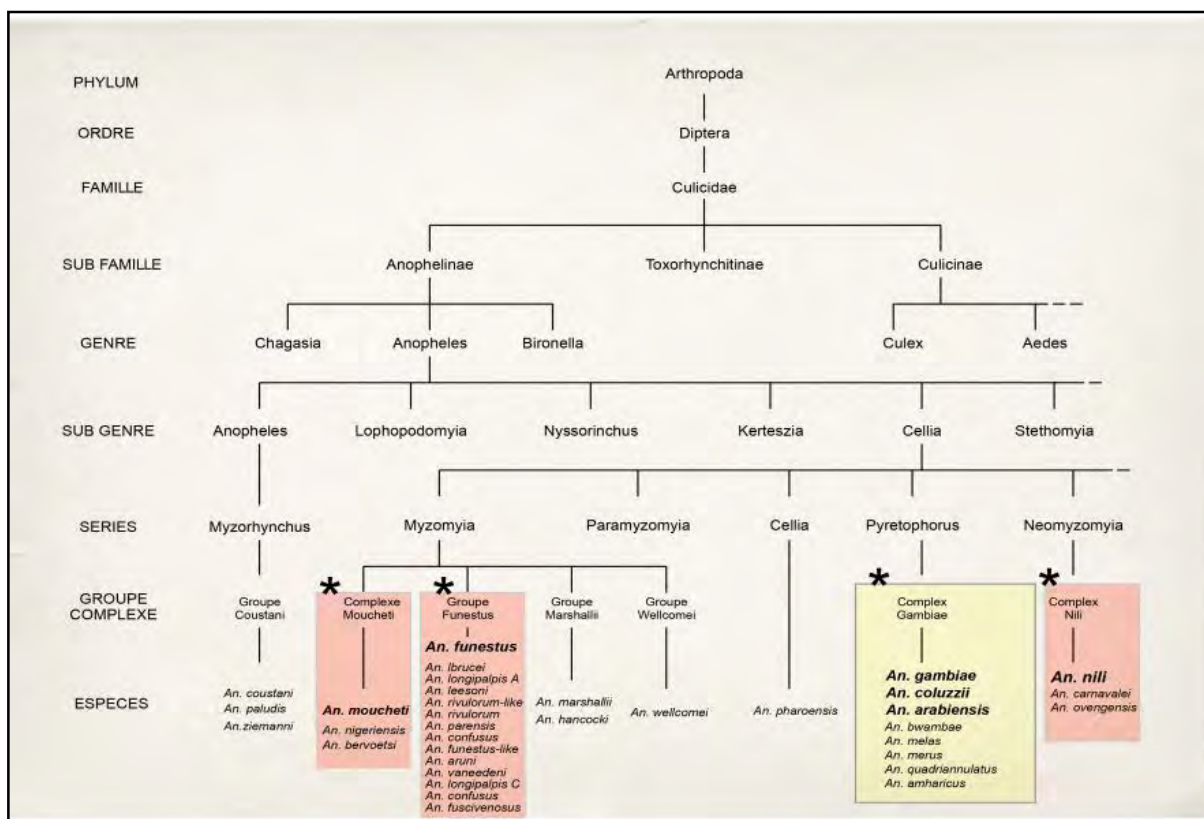


Figure 4: Classification partielle des anophèles (Harbach 2004)

2. Bio-écologie de l'hôte anophèles.

Les anophèles sont des insectes à métamorphose complète (holométaboles) dont le cycle de développement est commun à tous les *Culicidae*. Leur cycle de vie comporte plusieurs stades

immatures (œuf, larve, nymphe) tous aquatiques et un stade adulte aérien (Oijedraogo, 2008, Dausset, 1998). Elles ont une bio-écologie particulière comme vu dans (Figure 5).

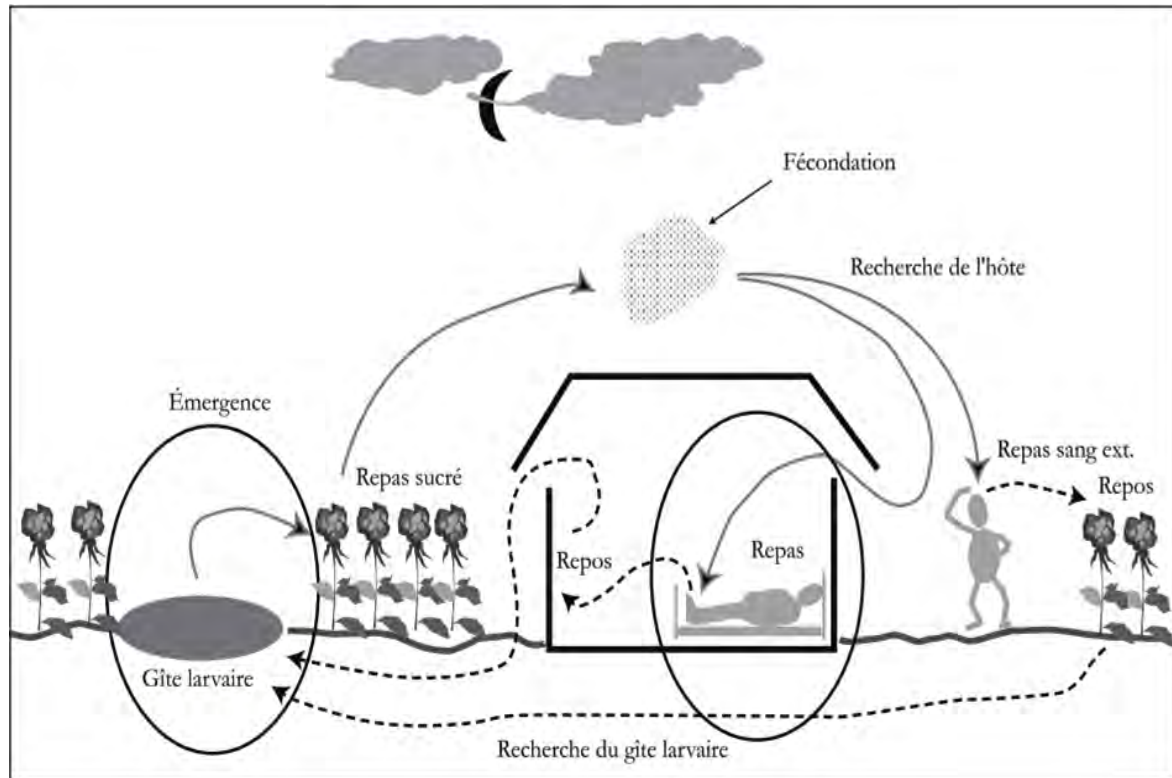


Figure 5: Principale étape du cycle biologique des anophèles (Carnevale et *al.*, 2009)

2.1 Phase aquatique

Pour ce qui est des œufs, ils sont déposés par la femelle dans des gîtes larvaires d'où éclosent les larves (Figure 6, 1-2). Les larves d'anophèles vont se développer dans les collections d'eau où elles procèdent par mues au cours de 4 stades larvaires successifs (3). Au bout de 6 à 10 jours ou plus, selon la température de l'eau et la disponibilité en nourriture, la 4ème mue donne naissance à une nymphe. C'est le stade correspondant à la métamorphose qui dure environ 48 heures. La nymphe est mobile et respire à la surface, mais ne s'alimente pas (4).

Ensuite vient l'émergence, qui est un stade qui dure entre 3 et 4 minutes ; C'est le moment le plus fascinant à observer de la vie du moustique. La nymphe s'immobilise à la surface de l'eau; le dos du thorax se fend et s'ouvre tandis qu'une sorte de cire empêche l'eau de pénétrer, et le moustique adulte (imago) s'élève lentement(5) (Carnevale et *al.*, 2009, Rageau and Vervent, 1959).

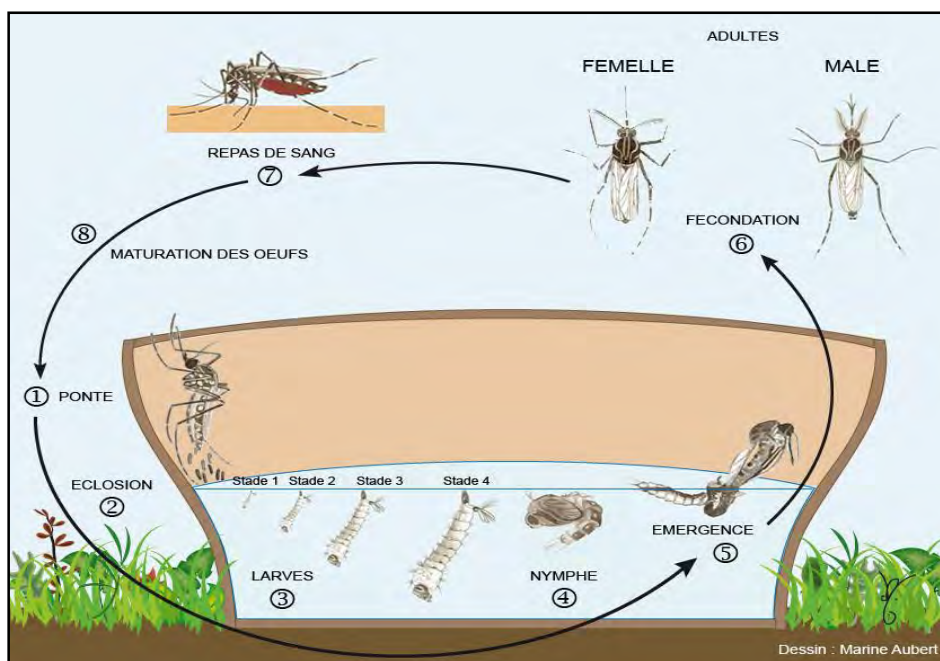


Figure 6: Cycle biologique des anophèles (www.institutpasteur.nc)

De façon générale, les larves d'anophèles se développent dans des eaux relativement propres contrairement aux larves de *Culex* qui peuvent se développer dans des eaux souillées de matières organiques et se retrouvent alors abondamment dans les zones urbaines où l'hygiène n'est pas assurée. Cependant, des larves d'*An. gambiae* ont pu être récoltées dans des drains pollués en zones urbaines (Abidjan, Dakar, Brazzaville, Yaoundé, etc.), mais cela reste peu fréquent. Le même biotope peut abriter plusieurs espèces anophéliennes (Carnevale et al., 2009).

2.2 Phase aérienne

La biologie de l'adulte est caractérisée par deux comportements principaux : l'alimentation (7) et la reproduction (6) (Figure 6) qui, chez la femelle, s'accompagnent de la dispersion à la recherche successive de l'hôte vertébré, du site de repos et du gîte de ponte. L'ensemble de ces comportements s'inscrit dans le cycle gonotrophique⁵ qui ne concerne évidemment que la femelle (Carnevale et al., 2009, Vercruysse, 1984) puisque le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés et n'est pas hématophage (Oliva, 2012).

Les moustiques vecteurs ne piquent qu'à partir du coucher du soleil avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures (Haddow, 1954). C'est la raison pour laquelle il est utile d'utiliser des moustiquaires qui est le moyen de prévention le plus efficace pour lutter contre

⁵ Cycle gonotrophique : la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique entre deux repas de sang successifs

cette maladie. Toutefois, les anophèles ont une biologie adaptée aux modifications de l'environnement, c'est-à-dire que les modifications engendrées par l'activité humaine vont jouer un rôle dans sa propagation.

3. Les vecteurs de forêt et leur rôle potentiel dans le transfert inter-espèces

Très peu d'informations sont connues sur les moustiques de forêt car la majeure partie des études se sont portées sur les anophèles anthropophiles (Figure 7) et la caractérisation des espèces zoophiles est donc loin d'être complète (Délicat-Loembet et *al.*, 2015, Rahola et *al.*, 2014).

Malgré l'intérêt considérable dans le décryptage de l'évolution et la diversité de *Plasmodium* parasites de singes africains et de parvenir à une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les parasites sont échangés entre singes et Hommes (Prugnolle et *al.*, 2013), seules deux espèces d'anophèles sont à l'heure actuelle connues pour assurer la transmission et la circulation des *Plasmodium* simiens en milieu naturel. Il s'agit d'*Anopheles mouchetii* et *Anopheles vinvkei* qui auraient pu jouer un rôle de pont entre les singes et l'Homme (Paupy et *al.*, 2013). En effet, *An mouchetii* est considérée comme une espèce forestière et souvent signalée pour être un vecteur majeur du paludisme humain dans les zones de forêt tropicale d'Afrique (Verhulst et *al.*, 2012, Fontenille et *al.*, 2003, Ollomo et *al.*, 1997).

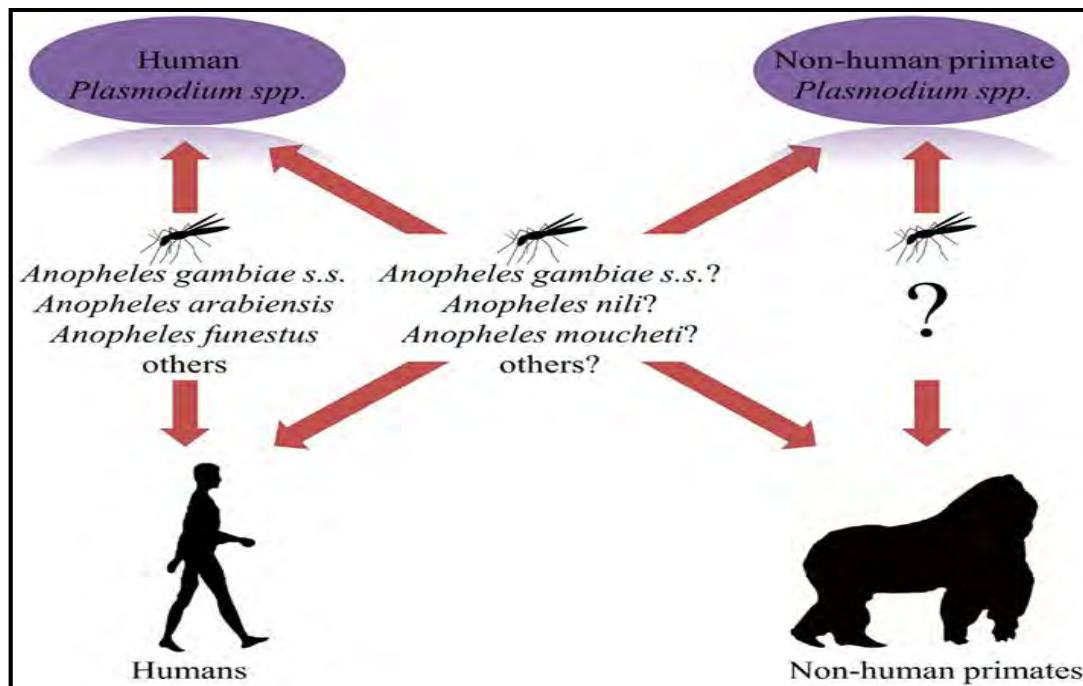


Figure 7: Circulation de *Plasmodium* entre Homme et PNHs (Verhulst et *al.*, 2012)

Récemment une nouvelle espèce sylvestre a été décrite au Gabon, *Anopheles gabonensis* (Rahola et al., 2014) qui serait toute comme *Anopheles millecampsi* dans la transmission naturelle de *Plasmodium* chez les rongeurs (Rahola et al., 2014, Bafort, 1969, Bray and Garnham, 1964). D'autres études seraient nécessaires afin de mieux connaître l'écologie et la distribution des espèces anophèles en circulation dans les forêts africaines et leur rôle dans la transmission de certaines zoonoses.

III. Relation hôte-parasite entre le *Plasmodium* et ses hôtes

Dans le but d'atteindre son développement le parasite du paludisme (*Plasmodium*) a besoin de deux hôtes (Vlachou et al., 2006, Escalante and Ayala, 1995). Ainsi, *Plasmodium*, moustique et Homme sont les trois éléments dans une relation d'interactions réciproques durables, dont le bon déroulement nécessite des conditions environnementales, climatiques et écologiques particulières aux diverses espèces hôtes et parasites (Rodhain, 1956).

Le *Plasmodium* est un organisme avec un cycle de vie hétéroxène qui se déroule chez deux hôtes (Malloch, 1995) (Figure 9). Alors, son développement nécessite un passage alterné par un hôte vertébré (hôte intermédiaire) et un moustique anophèle qui est son hôte définitif (lieu de la reproduction sexuée du parasite) (Prudêncio et al., 2006, Mota and Rodriguez, 2002, Vincke, 1966).

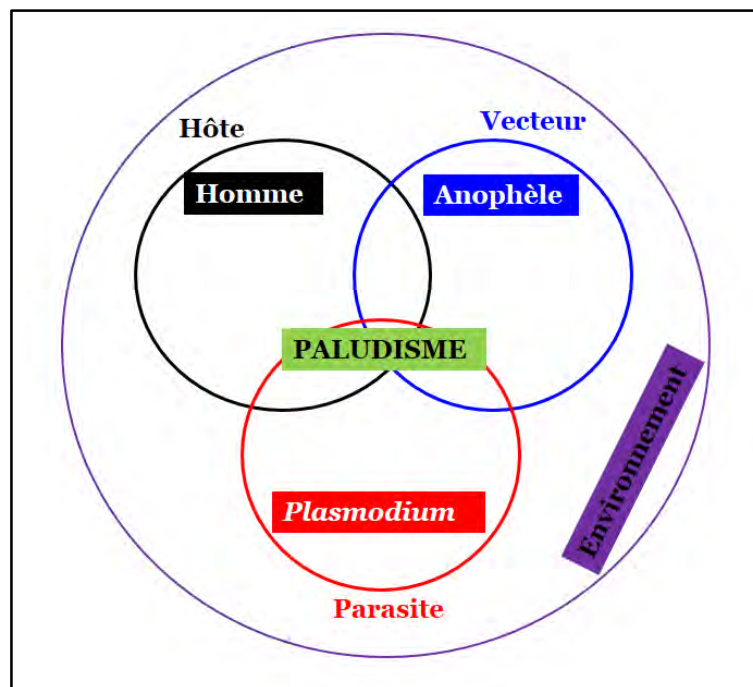


Figure 8 : Système d'interaction entre les différents intervenants dans cycle du *Plasmodium*

1. Cycle de vie chez l'Homme

Le cycle de développement des parasites chez l'hôte vertébré se déroule en plusieurs étapes successives : inoculation des stades infectieux, schizogonie hépatique et schizogonie érythrocytaire (Mouchet, 2004)

1.1 Inoculation des stades infectieux

Le parasite est transmis à l'Homme par la piqûre d'une femelle d'anophèle durant son repas sanguin (Figure 9). Les stades infectieux sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires sont injectés avec la salive dans la circulation sanguine en nombre variable par le tissu cutané (Sor-suwan et *al.*, 2014, Robert and Boudin, 2003).

Les sporozoïtes sont des formes très mobiles ; Ils vont transiter rapidement dans la circulation sanguine, où elles se retrouvent dans le foie en quelques minutes. Ils vont ensuite pénétrer dans un hépatocyte (Ngimbi et *al.*, 1979) où ils prennent des formes incapables de se déplacer. Les parasites sont à ce moment obligatoirement endocellulaires chez l'hôte intermédiaire.

1.2 Schizogonie hépatique ou exo-érythrocytaire

Au sein de la vacuole parasitophore, le trophozoïte endocytosmique entre alors dans une phase de réplication, une division asexuée aboutissant à la formation d'une masse multinucléée appelée schizonte. Après éclatement de l'hépatocyte, les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure de 8 à 15 jours, selon les espèces. Il est à noter que le processus de reproduction se déclenche, chaque schizonte libère entre 10000 à 30000 mérozoïtes chez *P. falciparum*, et entre 2000 et 15000 pour les trois autres *Plasmodium* humains. La schizogonie se déclenche immédiatement dans tous les hépatocytes parasités pour les espèces *P. malariae* et *P. falciparum* alors qu'elle peut être retardée dans certains hépatocytes qui restent en attente (hypnozoïtes) entre 1 et 18 mois pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale* (*P. malariae* infecte les érythrocytes de façon latente).

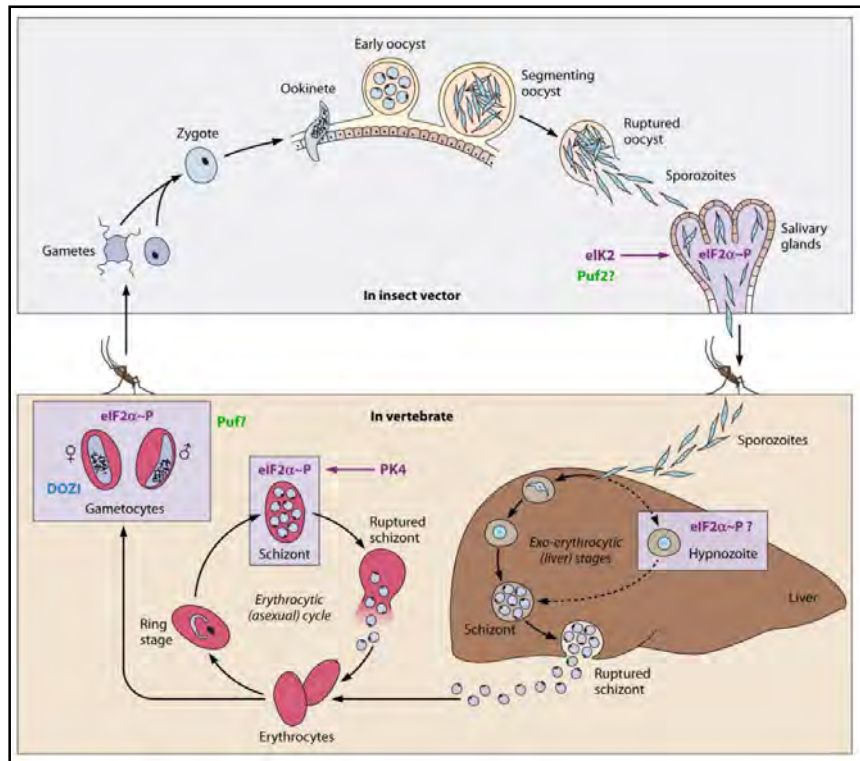


Figure 9 : Les grandes étapes de la vie du *Plasmodium* au sein des hôtes (Zhang et *al.*, 2012)

1.3 Schizogonie intra-érythrocytaire et différenciation

Cette phase sanguine est responsable des symptômes d'intensité variable survenant au cours de la maladie. L'attachement et la pénétration de l'érythrocyte par le mérozoïte est un processus d'interactions fines hôte-parasite de type récepteurs-ligands présents à la surface des cellules hôte et parasite. Après différenciation au sein de la vacuole parasitophore en anneaux, trophozoïtes (stade à partir duquel une intense phase répllicative commence) puis schizontes. Ces derniers, après segmentation, présentent une forme en rosace libérant, par lyse de l'érythrocyte, de 8 à 32 mérozoïtes qui réinfectent rapidement des érythrocytes sains.

La durée du cycle et le nombre de mérozoïtes obtenus sont caractéristiques de chaque espèce (chez *P. falciparum* : 48 h et 16 mérozoïtes). À l'issue de chaque cycle, les hématies éclatent de façon généralement synchrone, d'où la notion de fièvre tierce maligne pour *P. falciparum*. Après environ une semaine, une faible proportion de mérozoïtes, induite par certains facteurs de stress, va se différencier en gamétocytes mâles et femelles. À la suite d'une nouvelle piqûre par un moustique, les gamétocytes sont ingérés avec le repas sanguin

2. Cycle de vie chez le vecteur

2.1 Cycle sporogonique

Le cycle sporogonique chez le vecteur débute par l'ingestion de gamétocytes mâles et femelles matures circulant dans le sang périphérique de l'hôte vertébré lors du repas de sang pris sur ce dernier par le vecteur (Fougere, 2012, Robert and Boudin, 2003) (Figure 9). Les gamétocytes mâles et femelles ingérés s'échappent rapidement de l'enveloppe érythrocytaire et se différencient respectivement en microgamètes et macrogamètes (Mustfa, 2011). Dans les 15 minutes suivant l'ingestion, le gamétocyte mâle subit trois cycles de mitoses, formant 4 à 8 gamètes rendus très mobiles par exflagellation.

La fécondation entre gamètes mâles et femelles a lieu moins d'une heure après l'ingestion. Le zygote diploïde issu de la fécondation subit la méiose, au sein de l'enveloppe nucléaire qui ne se divise pas. Les quatre produits haploïdes des deux divisions méiotiques sont donc contenus dans le noyau. Le zygote se différencie en ookinète mobile, migre du bol alimentaire en cours de digestion et franchit la matrice péritrophique, 19 à 36 heures après l'ingestion du repas sanguin par la femelle anophèle. L'ookinète se glisse ensuite à travers ou entre les cellules épithéliales de la membrane de l'estomac de l'anophèle, processus d'invasion qui déclenche les réponses immunitaires du moustique. Le contact avec la membrane basale inhibe l'activité mobile et le cycle cellulaire reprend au sein du zygote (Mlambo et *al.*, 2012, Khan et *al.*, 2005).

L'ookinète se différencie alors en oocyste sphérique, dont le noyau polyploïde se divise, et subit des mitoses successives, aboutissant à la formation de sporoblastes contenant plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes. Pendant sa maturation, qui met environ 4 à 21 jours, la taille de l'oocyste passe d'environ 8µm à environ 60-80µm. À maturité, les sporozoïtes perforent activement la capsule de l'oocyste et la lame basale et sont libérés dans l'hémolymph. Ils migrent ensuite majoritairement vers les glandes salivaires, d'où ils seront injectés vers l'hôte vertébré avec la salive lors de la piqure. Les sporozoïtes restent infectants dans les glandes salivaires pendant toute la durée de vie du moustique (Mlambo et *al.*, 2012, Wang et *al.*, 2005)

IV. *Plasmodium* chez Les primates non humains africains

1. Aperçu historique sur les *Plasmodium* des PNHs africains.

Approximativement 40 espèces différentes de parasites du paludisme ont été identifiées chez les primates (Cormier, 2013). Les études sur les parasites du paludisme des singes africains ont été limitées à quelques observations faites principalement entre les années 1920 et 1950 (Krief et *al.*, 2010, Rich et *al.*, 2009), tandis que les premières observations par Alphonse Laveran sur les *Plasmodium spp* des primates dataient de plusieurs années avant (Snounou et *al.*, 2011).

La première description de *Plasmodium* en Afrique s'est faite au début du 20^e siècle avec Hans Ziemann qui décrit un *Plasmodium* chez un chimpanzé au Cameroun. Dix ans plus tard, Reichenow observa des *Plasmodium spp* non seulement dans le sang des chimpanzés mais aussi dans celui des gorilles au Cameroun (Reichenow, 1920). C'était ainsi la première et la dernière observation de *Plasmodium spp* chez le gorille (Snounou et *al.*, 2011, Reichenow, 1917b). Il décrit trois espèces qui rattacha ces hématozoaires aux formes classiques humaines (*P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*) (Rodhain, 1948, Reichenow, 1920, Reichenow, 1917a), et il les considéra comme étant les mêmes que celles infectant l'Homme (Rodhain, 1948, Rodhain and Van Den Berghe, 1936). En Sierra Leone, Blacklock et Adler ont pu étudier le parasite de type *P. falciparum* chez un chimpanzé. Ils firent des expérimentations sur des humains. Ces expérimentations se soldèrent par des échecs. En effet, ils tentèrent sans succès d'infecter des humains avec ce parasite ainsi qu'un jeune chimpanzé avec *P. falciparum* (Blacklock and Adler, 1924, Adler, 1923); Ces résultats les conduisirent à conclure que ce parasite était une nouvelle espèce propre au chimpanzé et ils la nommèrent *P. reichenowi*.

Au cours de ces années, ce sera Rodhain qui va démontrer le premier la spécificité d'hôte des *Plasmodiums* des grands singes africains, après plusieurs séries d'inoculation de chimpanzé à chimpanzé, de l'Homme au chimpanzé, du chimpanzé à l'Homme, et aussi de quelques essais de transmission par Anopheles (Snounou et *al.*, 2011). Ceci conduit par la suite Emile Brumpt à donner le nom de *P. schwetzi* et *P. rodhaini* aux deux espèces qui étaient respectivement du type *vivax* et du type *malariae* (Snounou et *al.*, 2011, Brumpt, 1939). Ainsi après toutes ces années, il a été établi que les chimpanzés sont réceptifs à *P. vivax* et que *P. rodhaini* et *P. schwetzi* mais pas *P. reichenowi* peuvent être transmis à l'Homme de manière expérimentale (Brack, 2012, Coatney et *al.*, 1971, Coatney, 1971, Garnham, 1966b).

Toutefois, les petits singes ne sont pas en reste dans les infections à *Plasmodium*. En effet, il a été noté la présence de deux *Plasmodium* (*Plasmodium gonderi*, *Plasmodium Daj-2004*) qui infectent les petites singes africains (mangabey, drills, mandrills et cercopithèques) (Cormier, 2013, Prugnolle et al., 2011d).

En résumé, avant 2009, les espèces répertoriées chez les PNH africains étaient *Plasmodium gonderi*, *Plasmodium sp. Daj-2004*, *Plasmodium rodhaini*, *Plasmodium reichenowi* et *Plasmodium schwetzi* (Duval, 2012, Prugnolle et al., 2011c, Brack, 1987) (Figure 10). Ce qui faisait apparaître les parasites du paludisme comme des agents infectieux spécifiques soit à l'Homme ou soit au singe. Ces études étaient essentiellement basées sur des observations en microscopie des aspects biologiques des parasites (Duval, 2012, Valkiunas et al., 2006, Garnham, 1966b). Cependant, les pionniers du paludisme simien avaient déjà observé que *P. rodhaini* et *P. schwetzi* respectivement parasites des chimpanzés et parasites des gorilles n'étaient pas distinguables morphologiquement de *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* (Coatney et al., 1971, Bray, 1963, Rodhain, 1956, Rodhain, 1955). Tandis que, la proximité ou la ressemblance de *P. reichenowi* avec *P. falciparum* de l'Homme conduisit Bray à proposer de les classer dans le sous-genre *Laverania* (Figure 10) (Snounou et al., 2011, Bray, 1963, Bray, 1958).

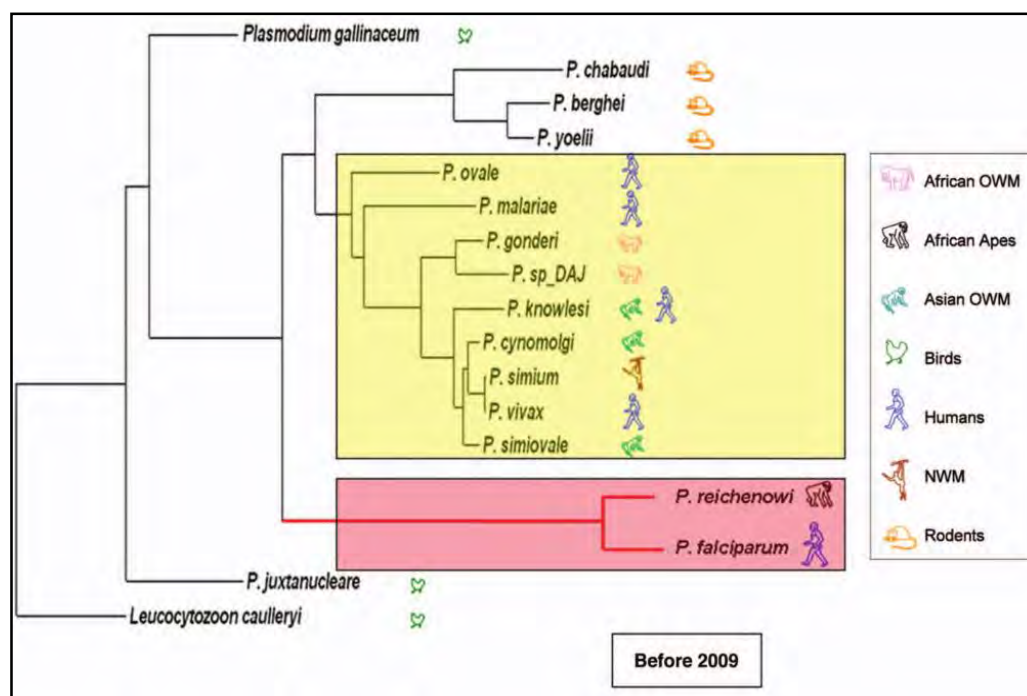


Figure 10 : Phylogénie simplifiée des *Plasmodium* connus avant 2009. L'encadré en rose représente le sous genre *Laverania* et en jaune le sous genre *Plasmodium* infectant les PNH (Prugnolle et al., 2011).

2. État actuel des *Plasmodiums* des primates non humains

Pendant plusieurs années les premiers parasitologues se sont basés sur la taxonomie descriptive des hémospories c'est-à-dire la description des caractères morphologiques pour décrire les grands groupes de parasites (Valkiunas et al., 2005, Valkiunas et al., 2006, Perkins and Schall, 2002, Garnham, 1966a). Toutefois, l'utilisation de ces caractères morphologiques uniquement pour la différenciation des espèces s'est avérée dans certains cas peu fiable (Megali et al., 2011, Birtles et al., 1994). Le développement des outils de la biologie moléculaire va permettre de pallier ce problème.

En effet, la sensibilité et la qualité des méthodes de diagnostics moléculaires basées sur le séquençage et l'utilisation des outils phylogénétiques, vont permettre de réviser la classification des parasites du genre *Plasmodium* (Valkiunas et al., 2006, Valkiunas et al., 2005) chez les primates non-humains et en particulier chez les grands singes (gorilles, chimpanzés et bonobos) (Krief et al., 2010, Liu et al., 2010, Prugnolle et al., 2010, Ollomo et al., 2009). Elles vont dévoiler l'existence d'une large diversité de parasites, jusqu'alors ignorée par les méthodes microscopiques (Megali et al., 2011, Prugnolle et al., 2011c, Prugnolle et al., 2011a).

Les résultats de l'exploration des parasites de primates avec les nouveaux outils de diagnostics débutera en 2009 avec la découverte, chez les chimpanzé du Gabon, d'une nouvelle espèce de *Plasmodium* qui va être nommée *Plasmodium gaboni* (Ollomo et al., 2009).

Les analyses phylogénétiques vont révéler que cette espèce est un ancêtre commun de *P. reichenowi* (chimpanzé) et *P. falciparum* (Homme), suggérant que l'ancêtre des grands singes africains était infecté par les parasites du paludisme et qu'hôtes et parasites auraient pu co-évoluer. Au cours de la même année, une autre équipe travaillant au Cameroun va elle aussi décrire une large diversité de lignées génétiques parasites chez les chimpanzés de cette région. Cette équipe menée par Stephen Rich va toutefois considérer toutes ces lignées comme appartenant à une seule et même espèce (*P. reichenowi*) suggérant ainsi que l'origine de *P. falciparum* se trouverait chez les chimpanzés et qu'un transfert vers l'Homme aurait eu lieu avant 50000 ans de notre ère (Rich et al., 2009).

L'année 2010 fut une année de bouleversements profonds en ce qui concerne la diversité et l'évolution au sein des *Plasmodium spp* en général et particulièrement au sein du groupe des *Laverania*. Un groupe de chercheurs regroupant des gabonais et des français publie pour la seconde fois des résultats extraordinaires obtenus à l'aide d'un procédé originale non invasif de

collecte d'échantillons (fèces). Ces chercheurs confirment tout d'abord, la présence de *P. gaboni* et *P. reichenowi* en circulation chez les chimpanzés de la sous-espèce *Pan troglodytes troglodytes* et, ensuite, ils décrivent des nouvelles lignées plasmodiales infectant les gorilles d'Afrique centrale (*Gorilla gorilla gorilla* et *Gorilla gorilla diehi*). Les deux lignées seront nommées *Plasmodium gorA* et *Plasmodium gorB* (Prugnolle et al., 2010).

Cependant, aujourd'hui, elles sont appelées respectivement *Plasmodium adleri* et *Plasmodium blacklocki* (Boundenga et al., 2015, Rayner et al., 2011). Enfin, cette étude révèle pour la première fois l'existence des gorilles infectés par *P. falciparum*-like (syn *P. praefalciparum*) (Gonzalez et al., 2013, Prugnolle et al., 2010). Ce qui va permettre de savoir que l'Homme aurait acquis *P. falciparum* par un transfert récent des gorilles et non qu'il aurait co-évolué avec lui.

Un mois après l'apparition de leur article, une autre équipe vient confirmer la grande diversité de *Plasmodiums* qui circulent chez les grands singes africains notamment les bonobos et chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*). Cette équipe va confirmer la présence de *P. gaboni*, *P. reichenowi*, *P. falciparum* et de deux nouvelles espèces : *Plasmodium billbrayi* et *Plasmodium billcollinsi* (Krief et al., 2010). À cause de la proximité de *P. billbrayi* et *P. gaboni*, certains auteurs vont jusqu'à penser qu'il s'agirait de la même espèce (Rayner et al., 2011).

Cette même équipe montra la présence de *P. falciparum* humains chez les bonobos et, conclut vite que les bonobos seraient à l'origine de *P. falciparum* chez les humains, mais toutefois l'analyse poussée de leurs séquences montra que celles-ci présentaient des allèles de résistances aux antipaludéens classiquement donnés aux Hommes suggérant donc que les bonobos venaient d'acquérir ces parasites par transfert horizontal depuis les Hommes (Rayner et al., 2011, Krief et al., 2010). La capacité de *P. falciparum* à franchir la barrière d'espèce hôte va être à nouveau illustrée au cours de la même année avec une étude révélant des chimpanzés infectés par ce parasite au Cameroun (Duval et al., 2010).

Vers la fin de la même année, une grande étude qui s'inspirait des travaux menés par Prugnolle et ses collaborateurs (Prugnolle et al., 2010), viendra confirmer l'existence de toutes ces espèces à partir d'une large collection d'échantillons de fèces collectés un peu partout en Afrique Centrale chez les grands singes. Cette étude va confirmer l'existence d'au moins six espèces de *Plasmodium spp* dans le groupe de *Laverania*. Trois de ces espèces seraient spécifiques aux chimpanzés (*P. reichenowi*, *P. gaboni*, et *P. billcollinsi*) et les trois autres aux gorilles (*P. praefalciparum*, *P. adleri* et *P. blacklocki*) (Liu et al., 2010). Dans le sous-genre

Plasmodium, ce sont trois espèces qui seront décrites chez les grands singes : *P. malariae*-like, *P. ovale*-like et *P. vivax*-like (Figure 11).

Seule l'espèce *P. billbrayi* n'a pas été confirmée par cette étude. L'absence de cette espèce s'expliquerait par le fait que cette espèce est considérée comme un variant de *P. gaboni* ou C2 (Clade 2) et ne semble pas être suffisamment différente de *P. gaboni* pour justifier de la désignation d'espèce distincte à ce moment (Rayner et *al.*, 2011, Liu et *al.*, 2010).

Cette année 2010 va se terminer avec la publication de cinq espèces qui circulent en Afrique de l'Ouest en milieu forestier, notamment *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. reichenowi* et *P. gaboni*. (Kaiser et *al.*, 2010).

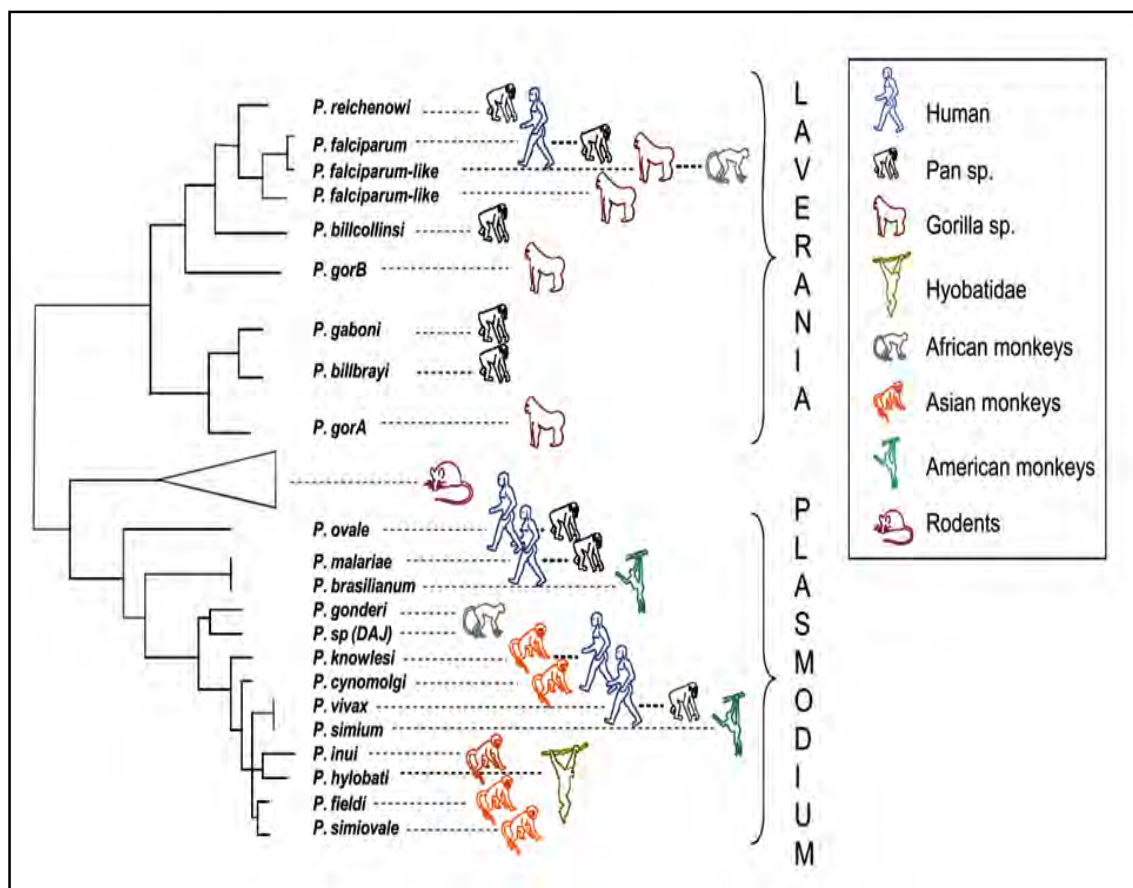


Figure 11 : Diversité plasmodiale en circulation chez PNH (Gonzalez et *al.*, 2013)

Chapitre 2

Les primates non-humains du Gabon



I. Généralités sur les primates non humains

Les primates non humains sont des mammifères arboricoles vivant principalement dans les forêts tropicales et subtropicales (Bouhallier and Berge, 2006, Dounias, 1999, Koopman et *al.*, 1993) (Figure 12). Les primates se distinguent des autres mammifères (Carroll, 2003, Sussman, 1991) par un certain nombre de caractéristiques morphologiques, anatomiques, physiologiques et comportementales (Carroll, 2003, Kaessmann et *al.*, 2001).

Parmi les principales caractéristiques qui les différencient des autres mammifères, on peut citer :

- ❖ la présence d'yeux rapprochés et dirigés vers l'avant conduisant à un perfectionnement de la vision ;
- ❖ un développement de la vision binoculaire ;
- ❖ la réduction du museau qui est l'organe de l'olfaction ;
- ❖ la présence d'un pouce opposable (qui peut toucher l'extrémité intérieure des quatre autres doigts de la main) leur permettant la préhension (Pouydebat et *al.*, 2006) ;
- ❖ la présence d'ongles plats au lieu de griffes (à l'exception des galagos qui possèdent des griffes) (Maiolino et *al.*, 2012, Maiolino et *al.*, 2011) ;
- ❖ une gestation relativement longue et une longue période de dépendance des jeunes (vie postnatale prolongée) ;
- ❖ une vie sociale complexe, différents types de locomotion (Batty et *al.*, 2007, Sénut, 1979) ;
- ❖ un cerveau généralement bien développé traduisant un développement énorme de la capacité crânienne par rapport au poids corporel ainsi que l'expansion du cortex cérébral (Lupien et *al.*, 2009, Rae and Koppe, 2003, Dawson et *al.*, 2000).

Avec une cinquantaine de genres et près de deux cent espèces, l'ordre des primates occupe une place particulière dans la classification des mammifères et ont une grande distribution géographique (Figure 13).

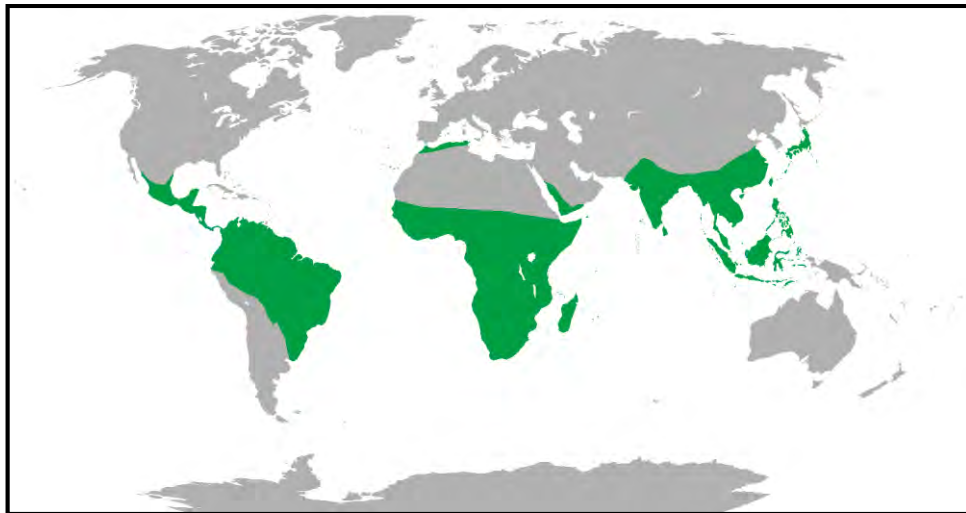


Figure 12: Distribution des primates non humains dans le monde en vert (Wikipedia, 2015)

L'ordre des primates compte environ 200 espèces de primates non humains de nos jours appartenant à deux sous-ordres subdivisés en plusieurs sous ordres (Lorenz et *al.*, 2005, Wilson and Reeder, 2005) ; à savoir : le sous-ordre des *Strepsirrhini* (*Prosimiens*) et le sous-ordre des *Haplorhini*.

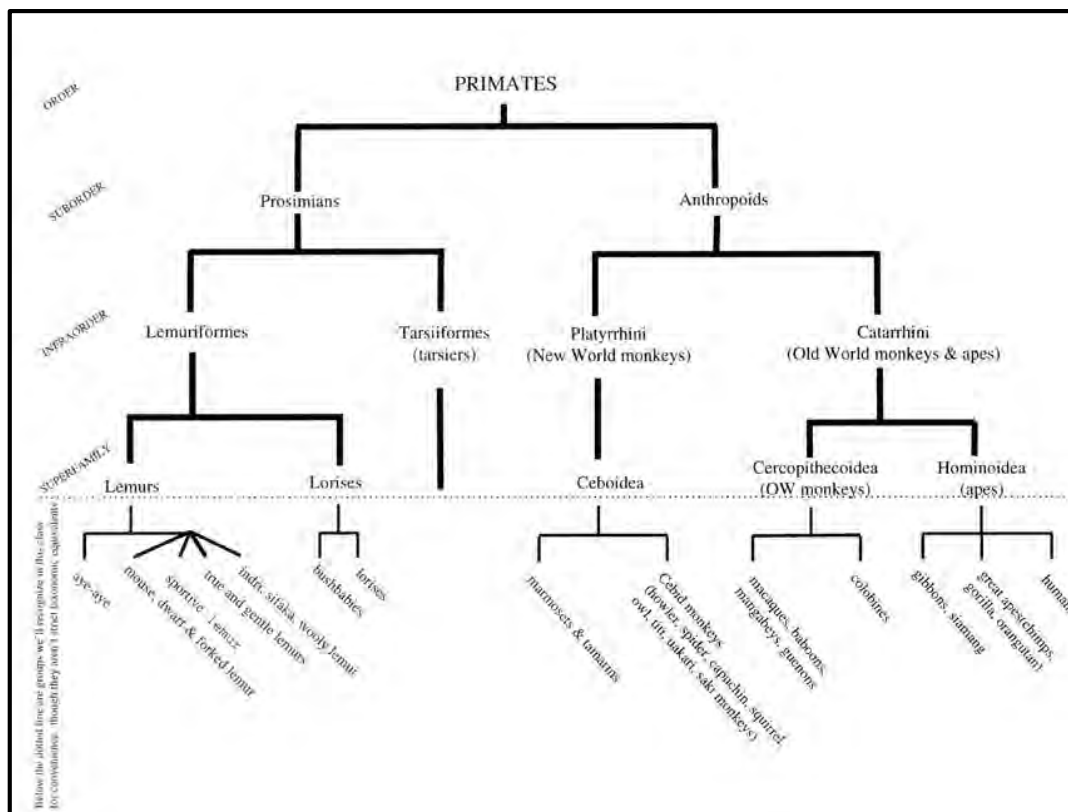


Figure 13 : Classification de l'Ordre des primates (www.d.umn.edu , 2015)

1. Le sous ordre des *Strepsirrhini* (Prosimiens)

Le sous-ordre des prosimiens regroupe les espèces jugées autrefois comme les primates plus primitifs que les *Semiiformes*, c'est-à-dire que ce sont des espèces des primates considérées comme le plus éloignées des *Hominidae* (Makungu et *al.*, 2014, Kawashima and Thorington Jr, 2011, Ruff, 2008). Aujourd'hui, il est admis que les prosimiens sont un groupe paraphylétique (c'est-à-dire qu'il regroupe en son sein une espèce ancestrale et une partie de ses descendants) subdivisé en deux taxa à savoir : les *Tarsiiformes* qui appartiennent maintenant aux *Haplorhini* et aux *Strepsirrhini* (Yildirim, 2014, Carvalho et *al.*, 2011, Cartmill et *al.*, 2010) (Figure 13). Le taxon des *Strepsirrhini* comprend les *Tupaïdés*, les *Indriidés*, les *Lorsidés*, les *Lémuridés*, les *Tarsiidés* et les *Daubentoniidés* (Figure 13).

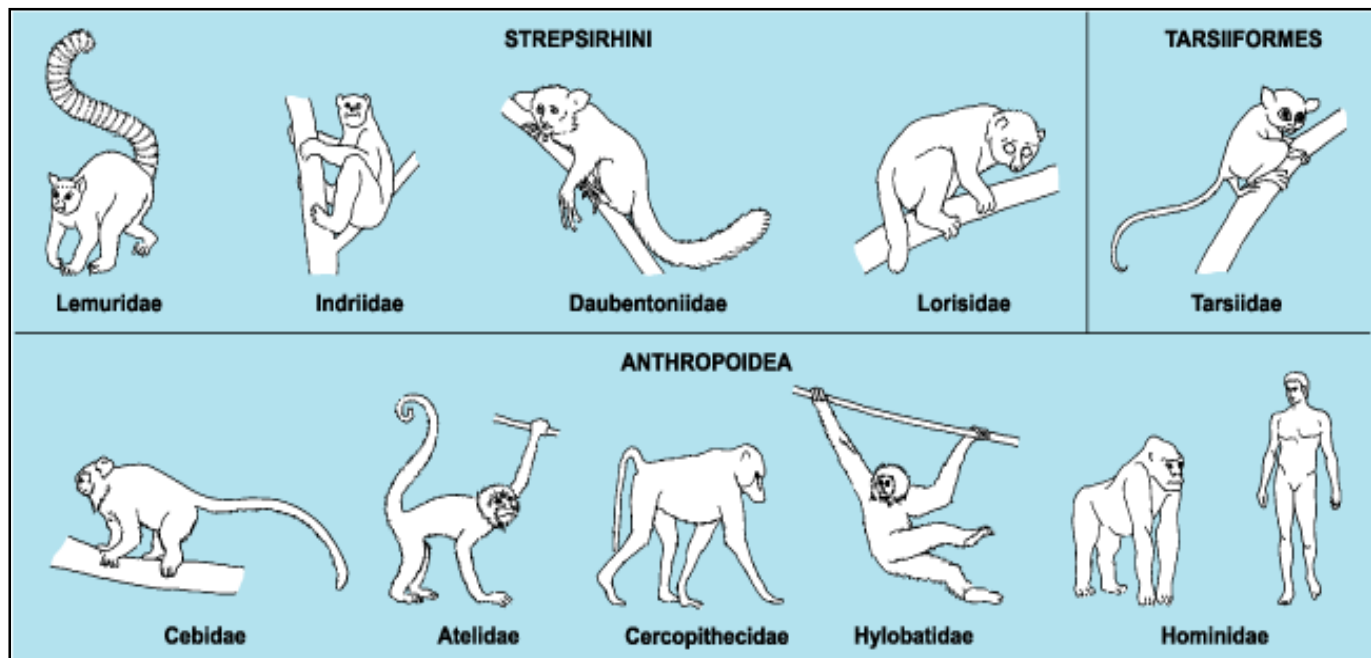


Figure 14: Les différentes familles des primates

Les prosimiens (**Figure 14**) sont des primates archaïques qui possèdent un museau allongé et un cerveau relativement petit, avec des lobes olfactifs bien développés. Leurs caractères sont encore primitifs. La plupart des espèces de ce sous-ordre sont nocturnes, insectivores et frugivores. Du fait de leur vie nocturne, ces animaux ne perçoivent pas les couleurs (Vorobyev, 2004, Gautier-Hion et *al.*, 1999). Leur aire de répartition est très réduite. En effet, des spécimens survivent à Madagascar (*Lémuriens*), en Afrique (*Lorisiformes*), en Asie du Sud-Est et en Indonésie (*Lorisiformes*) (Deputte, 1998).

2. Le sous ordre des *Haplorhini*

Le sous-ordre des *Haplorhiniens* est le groupe dont fait partie l'Homme. Il regroupe aussi les simiens proprement dits qui sont des PNH plus évolués. Le sous-ordre des *Haplorhiniens* est divisé en deux infra-ordres (Hoffstetter, 1977):

- ❖ l'Infra-ordre des *Semiformes* encore appelés *Anthropoidae* et *Tarsiiformes* ont été pendant longtemps considérés comme des primates primitifs ;
- ❖ l'Infra-ordre des *Anthropoidae* comprend deux taxa celui des *Platyrrhini* et celui des *Catarrhini* (singes de l'Ancien Monde) (Schmitt, 2010).

2.1 Les *Platyrrhiniens*

Les *Platyrrhiniens* (encore appelé singes du nouveau monde) sont des primates de taille relativement petite, arboricoles et d'un poids modeste (120g à 12 kg). Ils possèdent des pouces qui sont moins opposables et comme l'indique leur nom *Platyrrhini* ("nez plat"), ils ont des narines aplaties avec ouvertures latérales, une queue longue relativement préhensible. Ces animaux sont repartis depuis le Mexique (Amérique central) jusqu'au Brésil (Amérique du Sud) (Coren, 2003, Kingston, 1985, Woodward, 1916).

Ils sont relativement plus fragiles du point de vue physique et psychologique. Du point de vue écologique, ces singes néotropicaux sont frugivores et insectivores. Un seul genre donné occupe souvent un site géographique. Parmi les principales espèces, on peut citer les capucins, les atèles, les ouistitis, les saïous, les tamarins et les saïmiris (Deputte, 1998).

2.1 Les *Catarrhiniens*

Les *Catarrhiniens* sont un clade des primates de l'ancien monde. Ces représentants peuplent essentiellement les continents africain et asiatique (Jablonski, 2005, Harcourt and Schreier, 2009). Ce sont des animaux dotés d'une assez grande puissance à l'exemple de gorilles (Fossey, 1974). Ils se caractérisent par des narines rapprochées, orientées vers l'avant, et ouvertes vers le bas et séparées par une fine cloison, une queue peu préhensible. Leur pouce est très développé et les ongles de mains et de pieds sont plats (Almécija et al., 2013, Napier et al., 1993). Leur région auditive est caractérisée par un tube osseux de l'oreille.

Du point de vue écologique, ils ont un mode de vie diurne qui préfigure celui de l'Homme, (ils sont actifs le jour et dorment la nuit). Cet infra-ordre est néanmoins très diversifié, comme chez les Platyrrhiniens, mais il est subdivisé en deux superfamilles, à savoir les *Hominoidea* et les *Cercopithecoidea* (Cartmill et *al.*, 2010, Deputte, 1998, Gautier-Hion, 1975).

La sous-famille des *Colobinae* regroupe les entelles, les semnopithèques, les nasiques et les colobes (Gautier-Hion et *al.*, 1999, Deputte, 1998).

❖ **Les *Hominoidae*** : Ils comprennent deux sous-familles : la sous-famille des *Hylobatidae* et des *Pongidae* représentées en Asie avec respectivement les gibbons et les orangs-outans puis la sous-famille des *Hominidae* qui comprend les bonobos, gorilles, les chimpanzés (uniquement présents en Afrique) et l'Homme (Gautier-Hion et *al.*, 1999). Les bonobos, les orangs-outans, les gorilles et les chimpanzés sont souvent regroupés sous le nom de grands singes par opposition aux petits singes (Deputte, 1998). Ils sont tous caractérisés par l'absence de queue.

❖ **Les *Cercopithecoidea*** qui regroupent divers espèces, constituent numériquement le groupe le plus important (Ackermann and Cheverud, 2004, Jorde and Spuhler, 1974). Ce groupe comprend les genres *Papio*, *Macaca*, *Cercocebus*, *Erythrocebus* et *Cercopithecus*. Parmi les principales espèces, nous pouvons citer entre autre ses macaques, babouins, mandrills, les mangabés et les cercopithèques (Rae and Koppe, 2003, Gautier-Hion et *al.*, 1999, Deputte, 1998). Ils présentent une très étroite distance inter-orbitaire, des narines étroites, une fosse lacrymale confinée à un os lacrymal développé. La longueur de la queue est très variable, jamais grande et parfois nulle. Le pouce est absent ou réduit à un petit tubercule qui peut supporter un ongle vestigial (Gautier-Hion et *al.*, 1999, Deputte, 1998).

II. Présentation de la zone d'étude et aperçu des PNHs du Gabon

1. Présentation de la zone de l'étude

1.1 Localisation géographique de la zone d'étude

Notre zone d'étude est le Gabon, pays d'Afrique centrale, situé de part et d'autre de l'équateur (Martin, 1981), au centre ouest de l'Afrique centrale, le Gabon a une superficie de 267.667 km². Il se présente comme le pays le moins peuplé d'Afrique centrale (Doumenge et *al.*, 2001), avec environ 1,3 (Chippaux et *al.*, 2005) à 1,8 millions d'habitants selon le derniers récemment de 2013 . Sa population est essentiellement urbaine à hauteur de 73% dont près de 50% d'habitants vivent à la capitale (Libreville). Le reste de la population occupe l'intérieur du pays qui de plus en plus se dépeuple.



Figure 15: Carte topographiques du Gabon (<http://tourisme-gabon.org/>)

Le Gabon possède des frontières délimitées au Nord-Est par le Cameroun, au Nord-Ouest par la Guinée-équatoriale, et à l'Est et au Sud par le Congo Brazzaville (Pourtier, 1989). À l'Ouest, le Gabon est bordé par l'Océan Atlantique sur une distance de 880 Km (M.E.F, 2000, Sayer et *al.*, 1992) (Figure 15) .

Ce pays est drainé par plusieurs cours d'eau dont le plus grand est l'Ogooué. L'Ogooué qui est le plus grand fleuve constitue une barrière naturelle divisant le pays en Nord et Sud (Wilks, 1990). Étant situé dans le bassin du Congo, le deuxième massif forestier le plus important au monde (Fargeot and du Castel, 2009), le Gabon est doté d'une grande richesse en biodiversité végétale et animale (Auzias and Labourdette, 2011, Doucet and Brugière, 1999).

1.2 Situation climatique de la zone d'étude

Le climat du Gabon est de type équatorial (Nguema Ndoutoumou et *al.*, 2013) tropical chaud, humide et pluvieux (Mavoungou et *al.*, 2013, Mpounza and Samba-Kimbata, 1990). Il est caractérisé par des températures constantes et élevées, par des pluviométries de basse altitude et il est dominé par un climat équatorial avec une alternance de deux saisons (sèche et pluie) (Liwouwou et *al.*, 2014, Dubost and Feer, 1992).

En forêt de plaine, la pluviométrie annuelle varie de 1500 mm environ à plus de 2300 mm. De façon générale au Gabon, la pluviométrie varie au cours de l'année entre 1500 et 3300 mm (Doucet, 2003). Cette alternance de saison fait que le Gabon possède deux saisons de pluies et deux saisons sèches. La grande saison des pluies caractérisée par des violentes averses s'observe aux alentours de mi-Février à mi-Mai et la petite saison des pluies à son pic autour d'octobre et novembre (Figure 16). La petite saison sèche intervient en décembre et janvier ; la grande saison sèche, quant à elle, se situe entre mi-Mai et mi-Septembre (Doucet, 2003, Drouineau and Nasi, 1999).

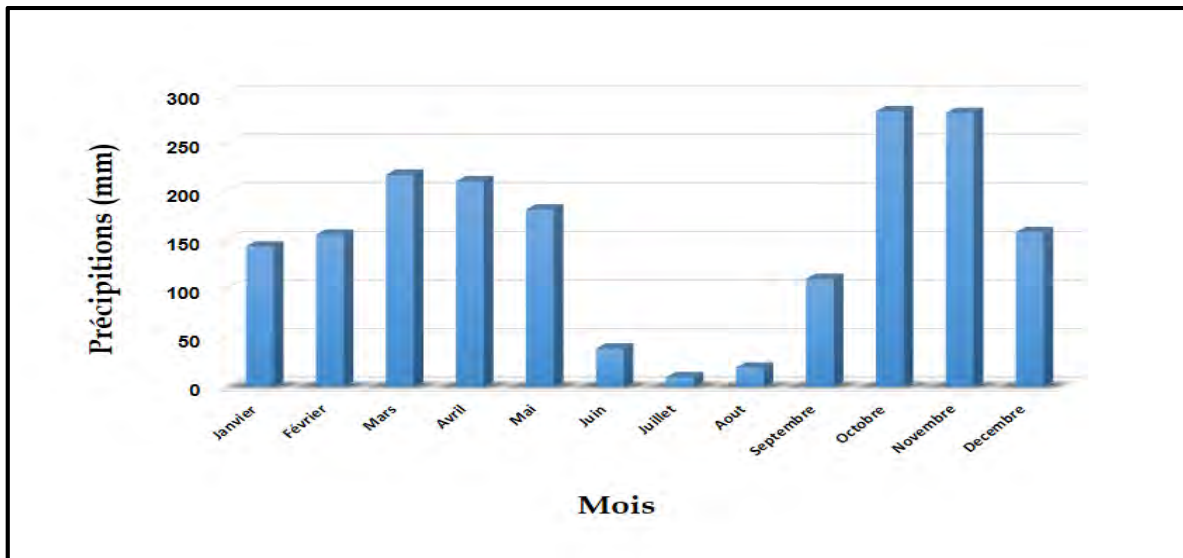


Figure 16 : Variation mensuelle de la pluviométrie en zone de forêt en 2009
(Source: World Bank Climate Change Knowledge Portal; Climate Research Unit).

1.3 La forêt gabonaise

La forêt gabonaise fait partie de la forêt du bassin du Congo (Gautier-Hion et *al.*, 1999), représentant le deuxième massif forestier du monde après l'Amazonie (Bamba et *al.*, 2010, Karsenty, 2005). Le Gabon abrite une part importante de ce bloc forestier, avec 80% de son territoire couvert par la forêt tropicale humide (Lee et *al.*, 2006), une flore liée au centre d'endémisme régional guinéo-congolais (White, 1983), riche en espèces végétales de plaine et de forêt. La forêt gabonaise compte parmi les plus riches de toute l'Afrique (Breteler, 1996).

La forêt gabonaise s'est constituée une véritable richesse avec une remarquable variété d'arbres qui induisent des variations de la quantité et de la qualité des ressources disponibles pour les animaux (notamment les fruits et les feuilles).

Tout comme l'eau, la forêt a une très grande influence dans la vie des gabonais, notamment en ce qui concerne l'organisation sociale et l'alimentation en zone rurale. En effet, la forêt gabonaise fournit aux populations qui pratiquent la chasse ou l'agriculture, les ressources nécessaires à leur survie. Le bloc forestier gabonais regroupe plusieurs types de forêts qui se répartissent comme suite 212 380 km² de forêt primaire, 2080km² de forêt marécageuse et de mangrove; 10080km² de forêt secondaire et complexe rural puis, 14230 km² de savanes boisées et arborées (Doucet, 2003, Mayaux et *al.*, 2003).

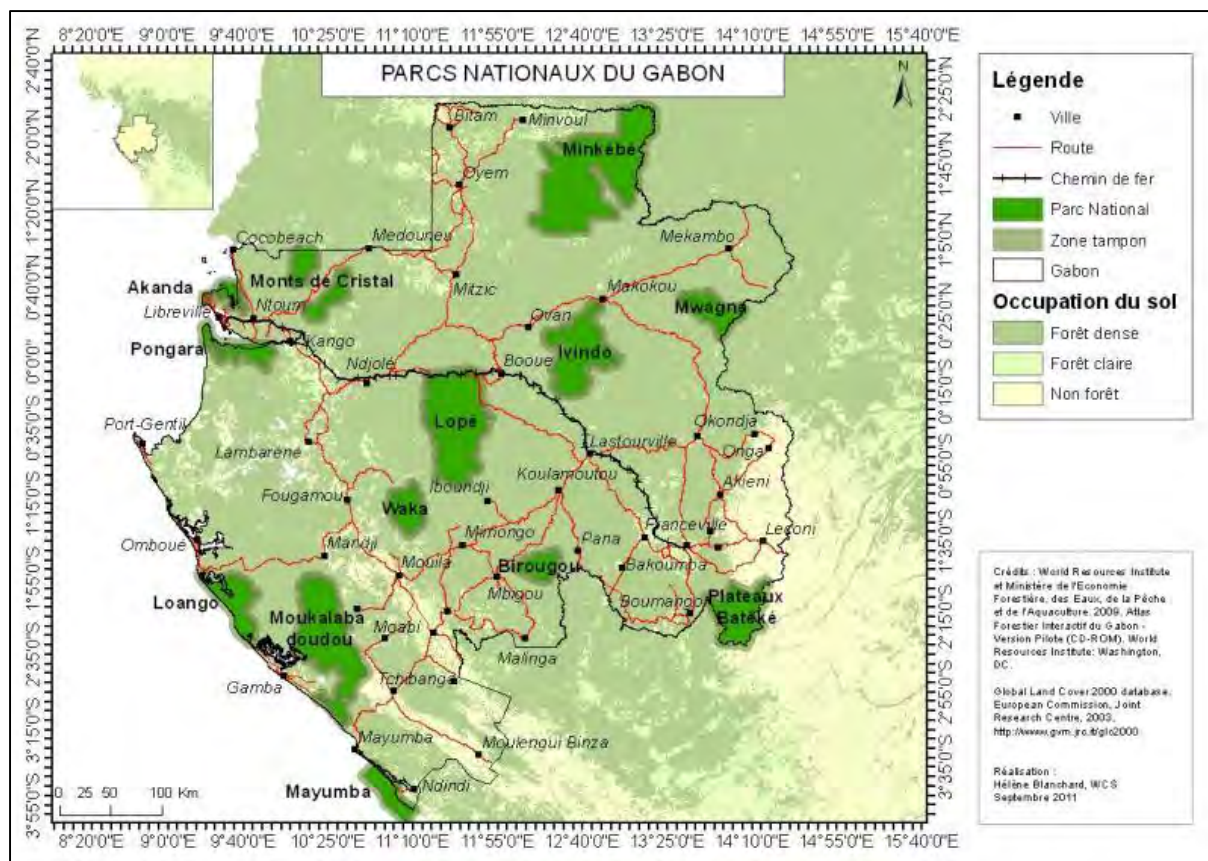


Figure 17: Les différents types de forêts du Gabon (<http://www.ngondetour.com/>)

En fonction de l'âge, du stade de maturité et du degré de perturbation des forêts, nous distinguerons les forêts primaires et les forêts secondaires.

- ❖ Les forêts primaires : ce sont des forêts âgées, à croissance lente, qui ne présentent pas de perturbations récentes importantes. Elles sont dominées par de grands arbres qui forment une canopée plus ou moins continue, surplombée par quelques émergents. Leur sous-bois, qui ne reçoit que peu de lumière, est généralement clairsemé et la végétation herbacée y est réduite ;
- ❖ Les forêts secondaires : ce sont des écosystèmes forestiers plus ou moins jeunes. Ils constituent différents stades de régénération naturelle de la forêt après avoir subi des perturbations naturelles ou dues aux activités anthropiques (exploitation minière, déforestation, cultures, feux, etc.). Leur canopée est plus basse et plus ouverte que celle des forêts primaires.

Ces forêts primaires et secondaires ont une importance écologique dans le fait qu'elles vont influencer le climat, protéger le sol de l'érosion que pourrait engendrer par les fortes précipitations qui sont régulièrement enregistrées.

Le Gabon compte approximativement 6000 espèces de plantes sans compter les groupes inférieurs (Algues, Champignons, Lichens et Bryophytes) (Wilks, 1990). En 2002, lors du sommet de la terre de Johannesburg, les autorités gabonaises ont décidé de consacrer 11% (environ 30 000 km²) du territoire national aux Parcs Nationaux. Ainsi, un réseau de 13 Parcs Nationaux dédiés à la gestion durable des écosystèmes fut créé. Dans ces Parcs Nationaux, On a répertorié à l'heure actuelle, 65 espèces de reptiles, 1000 espèces d'oiseaux et 400 espèces de mammifères (dont les PNH répartis dans 19 espèces).

1.4 Importance scientifique de la forêt gabonaise.

La forêt tropicale est l'écosystème le plus riche et le plus complexe de notre planète. C'est aussi l'un des écosystèmes les moins connus. Nous commençons à peine à comprendre quelques aspects de son fonctionnement (Lee et *al.*, 2006, White, 1983). Sa diversité est extraordinaire. Près de 50% de toutes les espèces de la terre y vivent. En Afrique centrale, dans le bassin du Congo, le Gabon fait partie de la région (domaine gabono-camerounais) la plus riche en espèces végétales de toutes les forêts tropicales (Gautier-Hion et *al.*, 1999, Wilks, 1990). De part sa richesse exceptionnelle en biodiversité, le Gabon constitue une zone importante pour de nombreuses études scientifiques dans diverses disciplines.

2. Aperçu sur les primates non-humains du Gabon

Au Gabon, l'ordre des primates est représenté par trois familles : la famille des *Strepsirhini*, la famille des *Cercopithecidae* et la famille des *Hominidae*. Les espèces appartenant à ces différentes familles, respectent une distribution tant locale que régionale (Motsch et *al.*, 2011, Gautier-Hion et *al.*, 1999). Environ 19 espèces de primates non-humains ont été répertoriées dans toute la forêt gabonaise. *Cercopithecus solatus*, espèce endémique est la dernière espèce de primates décrite (Peignot et *al.*, 2002, Gautier et *al.*, 1992, Harrison, 1988).

Nous donnons une description non exhaustive des genres rencontrés au Gabon et quelques informations sur leur biologie et leur écologie.

2.1 Les Strepsirhini

Cette ordre de primates les plus anciens est représenté au Gabon par le genre *Galago* et genre *Perodicticus*. Cinq espèces de galagos ont été répertoriées au Gabon, il s'agit de : *Galagoides allensis*, *Galagoides demidoffi*, *Galagoides thomasi*, *Galagoides elegantus*, *Galagoides dwarty* (Jean Wickings et *al.*, 1998, Charles-Dominique, 1977) (Figure 18).



Figure 18: Deux espèces de galagos observées dans la forêt gabonaise (Boundenga, 2011)

Le genre *Perodicticus* y est représenté par une seule espèce (Pimley et *al.*, 2005). Il s'agit de *Perodicticus potto* également appelé Potto de Bosman (Figure 19). Cette espèce a été décrite dans la région de Makokou (Oates, 1984, Charles-Dominique, 1974).



Figure 19: *Perodicticus potto* et distribution géographique (<http://www.help-congo-stories.org/>)

Ces primates nocturnes se nourrissent de gommages, de feuilles et d'insectes. Ils vivent dans le creux des arbres. La nuit, ils se déplacent sur des petites lianes en bondissant. Ce sont des animaux territoriaux dont le domaine vital peut à certains moments se chevaucher à celui d'un autre de ses congénères.

2.1 Le sous ordre des *Haplorhini*

A. La famille des *Cercopithecidae*

La famille des *Cercopithecidae* de l'infra-ordre des *Anthropoidea* comprend deux sous-familles : la sous-famille des *Cercopithecinae* (Cercopithèques au sens large, cercocèbes, babouins, mandrills) et la sous-famille des *Colobinae* (colobes). Aujourd'hui, la majorité des espèces de cette famille de "singes à queue" (*cercos*: queue; *pithecus*: singe) sont forestières (Deputte, 1998, Gautier-Hion, 1975).

1. La sous famille des *Cercopithecinae*

La sous-famille des *Cercopithecinae* au Gabon est représentée par plusieurs genres comprenant plusieurs espèces savanicoles et forestières. La plus grande diversité spécifique s'observe cependant en forêt où la majorité des espèces sont arboricoles et présentent des particularités écologiques (Gautier-Hion et al., 1999, Harrison, 1988).

Parmi les genres appartenant à la sous-famille des *Cercopithecinae*, on distingue les genres suivants :

❖ le genre *Cercopithecus*: il comprend plusieurs espèces, à savoir: *Cercopithecus cephus*, *Cercopithecus mona nigripes* (Wilks, 1990), *Cercopithecus nictitans*, *Cercopithecus pogonias*, *Cercopithecus solatus*, *Cercopithecus neglectus*. Ce sont des espèces omnivores à tendance frugivores vivant en groupes monospécifiques ou mixtes (Picq, 2009, Galat-Luong et al., 2000, Gautier-Hion, 1975) (Figure 20).

❖ le genre *Miopithecus*: il est représenté par l'espèce *Miopithecus ogoouensis* (Gautier-Hion et al., 1999) (Figure 20, 2). Cette espèce a une distribution en mosaïque qui répond à leur préférence écologique (Colyn and Deleporte, 2002). Ils sont également qualifiés d'arboricoles, car ils passent l'essentiel de leur temps dans les arbres. Ces animaux insectivores vivant dans des groupes multi-mâles de grande taille pouvant atteindre 60 à 70 individus (Gautier-Hion and Brugière, 2005, Gautier-Hion et al., 1999).

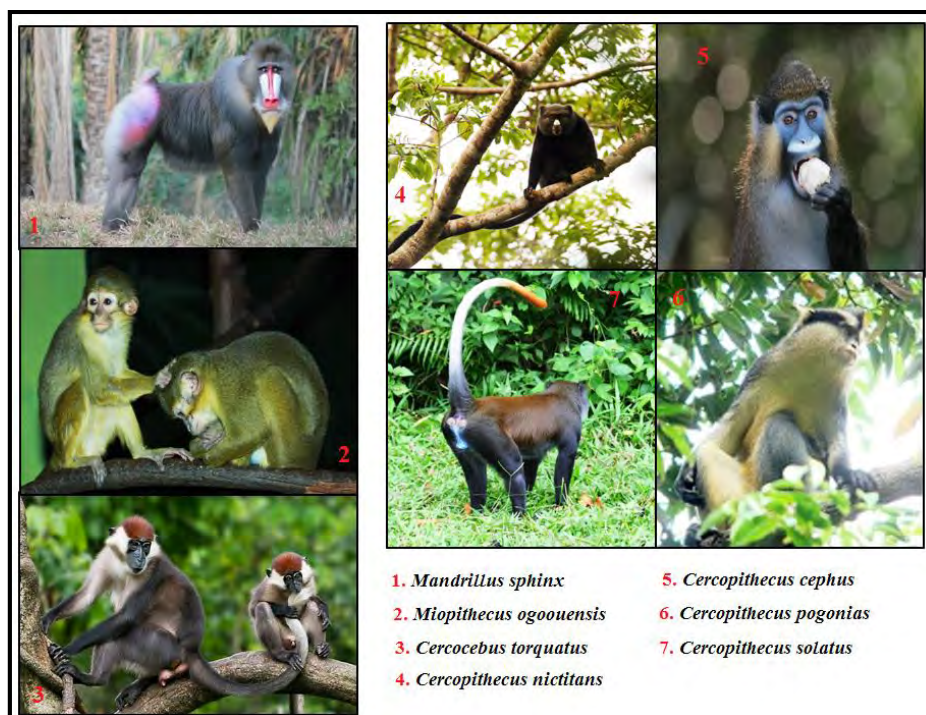


Figure 20: Quelques espèces de la famille des *Cercopithecinae* du Gabon (Boundenga, 2015)

❖ le genre *Cercocebus* : il est représenté par deux espèces, communément appelées “Mongabey”. La distribution de ces espèces allopatriques est particulière sur le territoire. En effet, *Cercocebus torquatus* (Figure 20, 3) est limité au bassin côtier tandis que *Cercocebus agilis* est localisé au Nord-est du Gabon (Estrada and Butler, 2008, Gautier-Hion et *al.*, 1999). On les observe rarement en forêts primaires de terre ferme mais elles peuvent de manière occasionnelle coloniser des forêts dégradées et dévaster les plantations (Wilks, 1990). Elles ont un régime omnivore composé des fruits, des feuilles, des proies animales, des racines (Morgan, 2007, Ehardt and Butynski, 2006).

❖ le genre *Mandrillus* : il est uniquement représenté par une espèce: *Mandrillus sphinx* (Figure 20, 1) (Gautier-Hion, 1975). Même si la présence des drills (*M. leucophaeus*) a été signalée dans la région du Nord du Gabon, il n’en demeure pas moins qu’aucune étude n’en fait mention. Les mandrills sont des animaux fortement bâtis ne possédant qu’une queue rudimentaire (moins de 7-8 cm). Comme chez les autres singes terrestres, le dimorphisme sexuel de poids est très important (Gautier-Hion, 1975) dans ce groupe animal. Leur croupe nue est colorée en rose et bleu (Figure 20, 1). De part et d’autre du nez rouge surmonté d’une ligne également rouge, s’observe une série de profondes rides bleues. Ils sont représentés par deux populations séparées par la barrière

formée par le fleuve Ogooué (Figure 21) (Gautier-Hion et *al.*, 1999). Les mandrills vivent en groupes dont la taille et la composition varient considérablement et pouvant aller jusqu'à 1200 individus (à la Lopé) (Gautier-Hion et *al.*, 1999).



Figure 21: Distribution des mandrills au Gabon (Carte UICN modifié par Boundenga, 2015)

A. Le sous famille des *Colobinae*

Cette sous-famille est représentée au Gabon par deux espèces appartenant au genre *Colobus*. Il s'agit de *Colobus guereza* et *Colobus santanus* (Figure 22). Ce sont deux espèces de *Colobinae* vivant de manière sympatrique dans la forêt au Nord du Gabon. Elles se distinguent par leur pelage. En effet, le pelage de *C. santanus* est complètement noir tandis que celui de *C. guereza* est noir et blanc (Groves, 2007, Gautier-Hion et *al.*, 1999).

Les individus de *C. guereza* vivent, en général, en groupes comprenant le plus souvent moins d'une dizaine d'individus. Ces groupes comportent dans la majorité des cas un seul mâle adulte, près de deux fois plus de femelles et leurs descendants.

Par contre les individus de *C. santanus* forment des groupes comprenant régulièrement plusieurs mâles adultes ayant l'effectif moyen le plus important (17 individus ; variations 7-25). Le régime alimentaire des colobes est majoritairement composé des feuilles ou des graines (Gautier-Hion et *al.*, 1999).

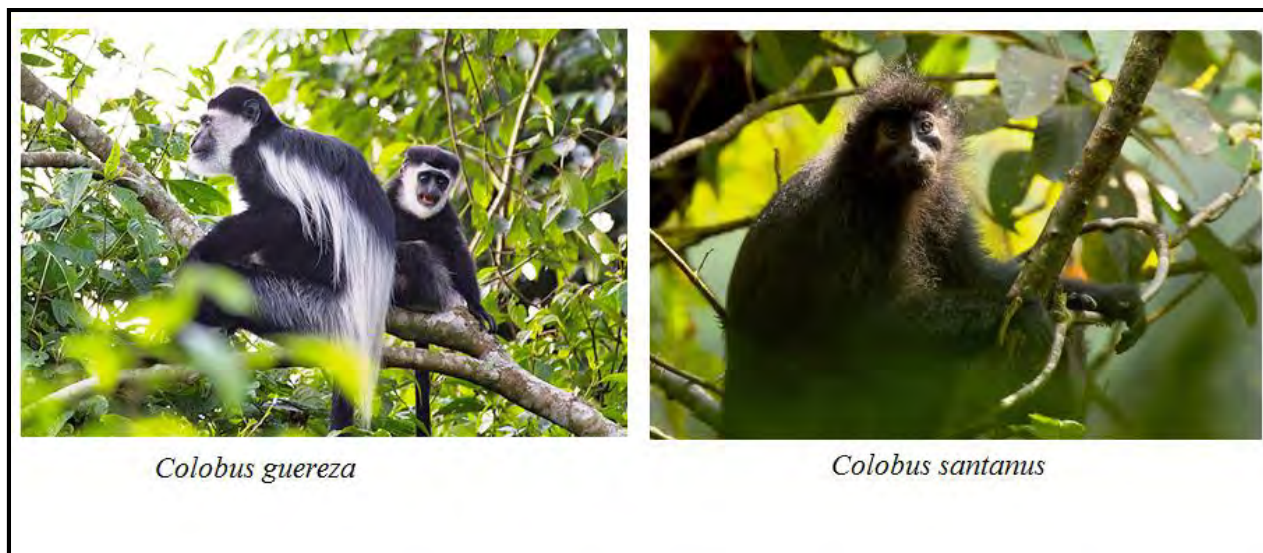


Figure 22: Les différentes espèces de colobes du Gabon (Image montée par Boundenga, 2014)

B. La famille des *Hominidae*

La superfamille des *Hominoidae* est représentée au Gabon par la famille des *Hominidae* comprenant les gorilles, les chimpanzés, les bonobos (uniquement présents en Afrique) et l'Homme. Les orangs-outans, les gorilles, les chimpanzés et les bonobos sont souvent regroupés sous le nom de grands singes (Anthropoïdes) par opposition aux petits singes (*Cercopithecidae*) des quels ils se distinguent par l'absence de queue.

Au Gabon cette famille est représentée par les gorilles et les chimpanzés appartenant respectivement aux genres *Gorilla* et *Pan* (Haurez et *al.*, 2013, Gautier-Hion et *al.*, 1999).

1. Le genre *Gorilla*

Il comprend deux espèces subdivisées en quatre sous espèces (*Gorilla g. gorilla*, *Gorilla g. diehli*, *Gorilla g. graueri* et *Gorilla g. beringei*) (Thalmann et *al.*, 2007, Groves and Harding, 2003). Au Gabon, il est représenté par la sous espèce *Gorilla g. gorilla*. Cette sous-espèce a une distribution qui couvre presque tout le territoire gabonais (Figure 23) (Gautier-Hion et *al.*, 1999). Les gorilles sont typiquement forestiers et ne s'aventurent que rarement en milieu ouvert.

Ils colonisent tous les types d'habitats depuis les forêts marécageuses et les forêts de terre ferme de plaine. Leur préférence pour ces zones est sans doute due à leur régime alimentaire

qui est constitué principalement de fruits des jeunes tiges, des pousses et à la variabilité saisonnière de ce régime (Marshall and Wrangham, 2007, Knott, 2005, Rogers et *al.*, 2004).

Sur le plan comportemental, les gorilles vont à la recherche de nourriture dans la journée. Après leur quête journalière de nourriture, les gorilles confectionnent des nids pour la nuit (Hladik, 2002, Tutin and Fernandez, 1992, Tutin and Fernandez, 1985). Ces nids sont généralement faits dans les arbres ou au sol, entre 0 et 25m de Hauteur. Ces nids rudimentaires sont composés de quelques tiges de plantes herbacées pliées, d'herbes ou de branches cassées ou repliées. Le nombre de nids reflètent plus ou moins fidèlement la taille des groupes à l'exclusion des individus non sevrés (Taylor, 2006, Tutin et *al.*, 1995).

Les gorilles sont des animaux extrêmement menacés par les activités humaines (exploitation forestière, exploitation minière, etc.), le braconnage, la déforestation, la destruction de leurs habitats (Haurez et *al.*, 2013), mais aussi par les maladies infectieuses qui ont contribué à l'accélération de leur déclin (Walsh et *al.*, 2007, Leroy et *al.*, 2004, Walsh et *al.*, 2003). Les gorilles les chimpanzés sont également la source de plusieurs maladies retrouvées chez l'Homme (Wolfe et *al.*, 2007).

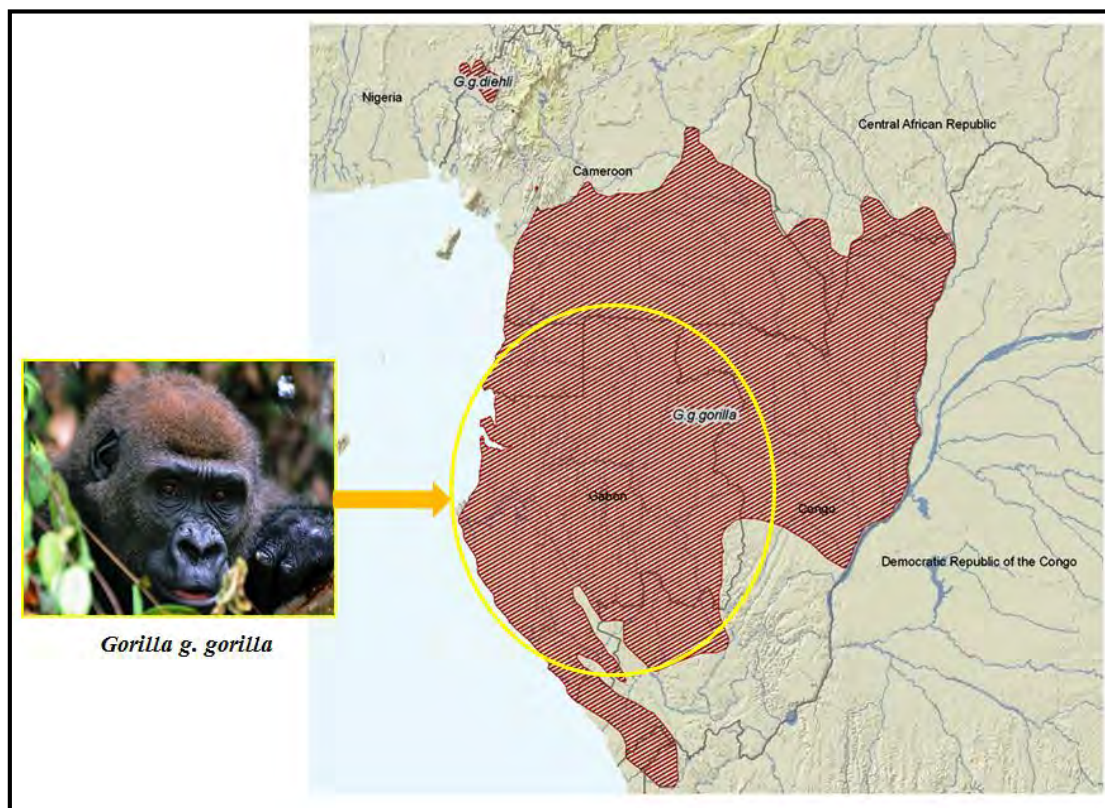


Figure 23 : Distribution des Gorilles d’Afrique de l’Ouest au Gabon
(Carte UICN, modifiée par Boundenga, 2015).

2. Le genre *Pan*

Il regroupe quatre espèces de chimpanzés (*Pan troglodytes verus*, *Pan troglodytes vellerosus*, *Pan troglodytes troglodytes* (Figure 24) et *Pan troglodytes schweinfurthii*) et une espèce de bonobos. Au Gabon, les chimpanzés sont représentés par la sous espèce *Pan troglodytes troglodytes* (Tutin and Fernandez, 1984). Cette espèce est présente essentiellement en Afrique centrale et au sud du Cameroun. Au Gabon, elle est distribuée sur tout le territoire (Figure 25) (Gautier-Hion et *al.*, 1999).

Du point de vue morphologique, ils ont de longs poils noirs, généralement peu denses. Leur face est de couleur claire, voire rose chez les nouveau-nés (Figure 24). Elle se pigmente plus ou moins rapidement et plus ou moins intensément en noir, avec l'âge (Kuhlmann, 2007, Schmittbuhl, 1996). La durée de gestation est en moyenne de 8 mois. C'est vers 4-5 ans que le sevrage s'achève chez les chimpanzés où le développement de l'enfant est lent. Les jeunes chimpanzés resteront dans l'entourage de leur mère jusqu'à 7 ans, bien qu'ils construisent un nid séparé (Gautier-Hion et *al.*, 1999, Deputte, 1998). Arboricoles et terrestres, en dépit de leur poids, les chimpanzés se déplacent avec agilité sur les arbres, usant de leurs quatre membres et de la grande force de préhension de leurs longs doigts. Ils sont également capables de courir rapidement au sol. Leur structure sociale est originale ; ils sont organisés en communautés qui peuvent comprendre 20 à près de 100 individus (Gautier-Hion et *al.*, 1999, Deputte, 1998).



Figure 24: Un jeune chimpanzé orphelin (Source : Cyril Ruoso)

Les chimpanzés sont en priorité des frugivores ; ils se nourrissent de fruits, feuilles, fleurs, graines, tiges et écorces. Toutefois, ce sont des consommateurs d'une grande variété de matières animales allant des insectes (termites, fourmis, abeilles, guêpes, diptères, papillons) aux mammifères (colobes, céphalophes, rongeurs et bien d'autres) (Hladik, 2002, Tutin and Fernandez, 1992, Tutin and Fernandez, 1985). Ces espèces prisées par les consommateurs de viande de brousse, peuvent vivre dans le même espace que les gorilles sans jamais partager le même domaine vital (Tutin et *al.*, 1991).

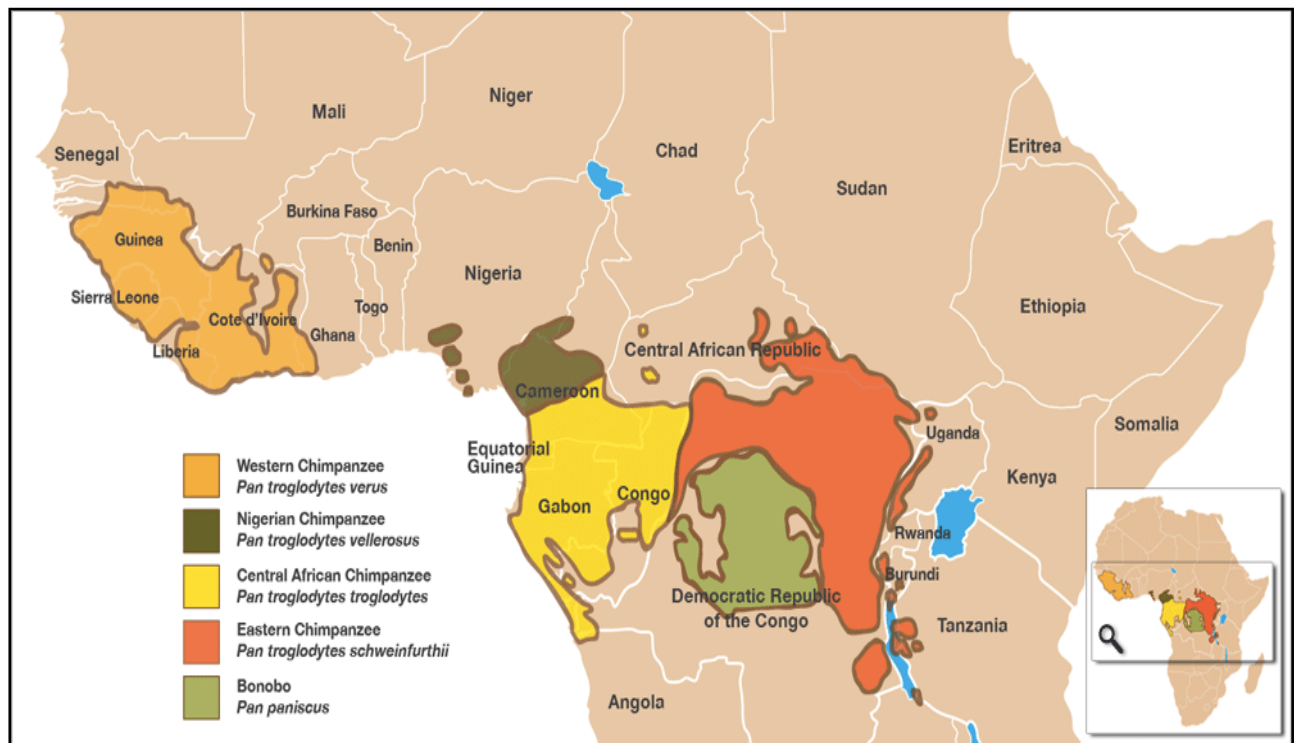


Figure 25 : Distribution des espèces chimpanzés (Jane Goodall Institute of Canada, 2015).

III. Primates non-humains source de maladies infectieuses

Les PNH sont reconnus pour être la source de plusieurs maladies infectieuses qui touchent l'Homme. En effet, en raison de la proximité génétique étroite avec les humains, les singes sont sensibles à de nombreux agents infectieux humains et vice versa (Keita et *al.*, 2014, Sharp et *al.*, 2013). Ils peuvent servir de réservoir à ces agents pathogènes. Cela pourrait constituer un risque grave pour la santé des humains. De nombreuses maladies infectieuses émergentes proviennent de la faune sauvage et continuent de menacer les populations humaines, en particulier les maladies transmises par des vecteurs comme le Paludisme (Cox-

Singh and Culleton, 2015, Prugnolle et *al.*, 2013) ou encore les Rickettsioses (Keita et *al.*, 2013).

Les singes africains sont porteurs de certains virus, bactéries et parasites. Nous présentons ici de manière brève quelque pathogène dont les PNH sont les réservoirs où considérés comme tels.

1. Cas des virus

Plusieurs virus appartenant à diverses familles sont susceptibles d'être transmis à l'Homme (Keita et *al.*, 2014) mais nous parlerons ici seulement de quelques-uns. Il est clairement établi que les virus *HIV* de type 1 et 2 trouvent respectivement leur origine chez les chimpanzés et mangabey (Keele et *al.*, 2006, Gao et *al.*, 1999). Le virus de l'Hépatite B a été mis en évidence chez les grands singes d'Afrique et d'Asie à des fréquences élevées (Lyons et *al.*, 2012). Les virus comme Ebolavirus même si les chauves-souris sont indexées d'être le réservoir, ont été caractérisés chez les grands singes en Afrique centrale. Ils ont été responsables de nombreuses pertes humaines (Labouba and Leroy, 2015, Leroy et *al.*, 2011).

2. Cas des bactéries

Plusieurs bactéries ont été également retrouvées chez les primates africains (Keita et *al.*, 2014). Les agents bactériens comme *Bacillus anthracis* (Leedertz et *al.*, 2006) ou *Streptococcus pneumoniae* (Chi et *al.*, 2007) et *Rickettsia felis* (un autre agent pathogène intracellulaire) ont été retrouvés chez plusieurs grands singes africains (chimpanzés, gorilles et bonobos) (Keita et *al.*, 2013). La découverte de *R. felis* chez les grands singes indique ainsi qu'ils seraient des hôtes potentiels ou même des réservoirs de cette bactérie Rickettsie émergente en Afrique subsaharienne (Keita et *al.*, 2014).

3. Cas des parasites

Comme le montre la Figure 26, les primates non humains sont des réservoirs d'un grand nombre de parasites à l'origine de maladies infectieuses chez l'Homme (Keita et *al.*, 2014). En effet, les études des primates dans leurs milieux naturels comme dans les conditions de captivité ont révélé une multitude de parasites issus des primates africains infectant les Hommes chez (Toft, 1982). Les niveaux élevés de parasites retrouvés chez les singes laissent penser que ces primates seraient des réservoirs potentiels des nombreux parasites qui pourraient être à l'origine de zoonoses émergentes (Calvignac-Spencer et *al.*, 2012) dont la transmission pourrait être véhiculée par un agent vecteur (Homsy, 1999).

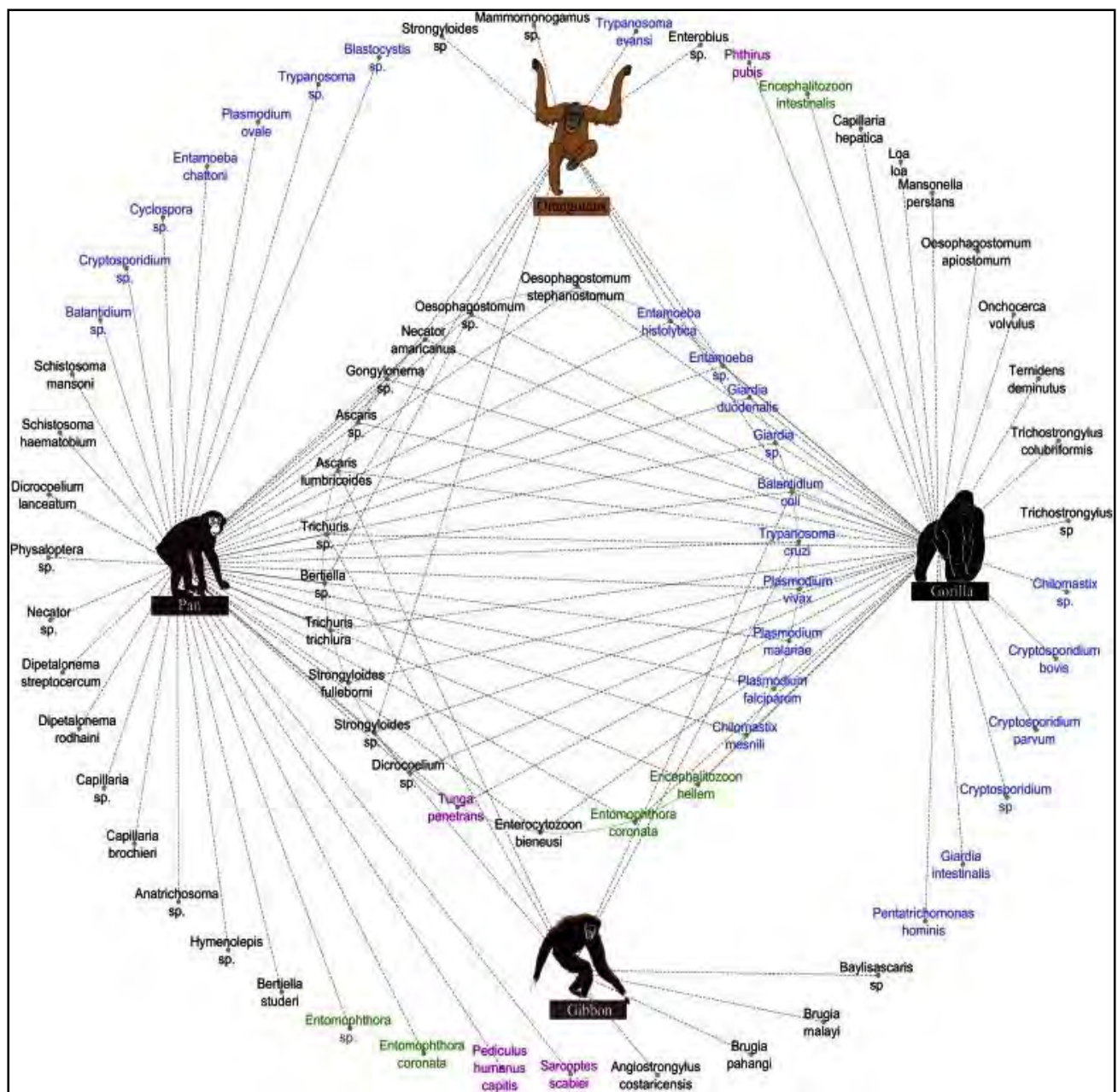


Figure 26: Réservoir parasite des PNHs : Helminthes (noir), protozoaires (bleu), champignon (vert). (Keita et al., 2014)

DEUXIEME PARTIE

***APPROCHE
MÉTHODOLOGIQUE***

I. PRÉSENTATION DU SUJET DE THESE

1. Problématique

Depuis 2009, plusieurs études sur les parasites du paludisme chez les primates non-humains (PNH) ont mis en évidence plusieurs lignées plasmodiales chez les singes africains en milieu sauvage et en captivité (Prugnolle et al., 2011c, Krief et al., 2010, Prugnolle et al., 2010, Ollomo et al., 2009). Ces études ont révélé que les grands singes d'Afrique étaient infectés par sept espèces de *Plasmodiums* du sous genre *Laverania* dont quatre chez les chimpanzés (*P. reichenowi*, *P. gaboni*, *P. billcollinsi* et *P. billbrayi*) (Krief et al., 2010, Prugnolle et al., 2010, Ollomo et al., 2009) et trois chez les gorilles (*P. adleri*, *P. blacklocki* et *P. praefalciparum*) (Sharp et al., 2013, Rayner et al., 2011, Prugnolle et al., 2010).

Le sous-genre *Plasmodium* (non-*Laverania*) n'est pas en reste dans les populations des primates africains, avec la mise en évidence de *P. ovale-like*, *P. malariae-like* et *P. vivax-like* chez les grands singes africains (Kaiser et al., 2010, Liu et al., 2010, Duval et al., 2009).

Au cours de ces grandes campagnes sur les parasites du paludisme chez les primates africains, aucune espèce *Laverania* n'a été trouvée infectant à la fois les gorilles et les chimpanzés en milieu naturel (Rayner et al., 2011, Liu et al., 2010, Prugnolle et al., 2010). Certaines études mettent l'accent sur la spécificité d'hôte apparente des *Laverania* (groupe auquel appartient *P. falciparum*) chez les grands singes africains en milieu naturel (Duval and Arie, 2012, Rayner et al., 2011).

Des études récentes soutiennent l'hypothèse selon laquelle cette spécificité d'hôte serait due à une interaction entre le récepteur ligand du parasite et celui de l'hôte (Wanaguru et al., 2013, Rayner et al., 2011). Selon les auteurs cette spécificité d'hôte serait déterminée par l'interaction entre le ligand *PfEBA175*⁶ du parasite et le récepteur érythrocytaire hôte GYPA (Glycophorine-A) (Martin et al., 2005). Toutefois, cette hypothèse a été remise en cause par des études récentes qui suggèrent que ce serait en fait l'interaction entre RH5⁷-BSG⁸ qui serait à l'origine de la spécificité d'hôte observé chez les *Laverania* (Otto et al., 2014, Wanaguru et al., 2013). Cette spécificité serait-elle uniquement liée à des facteurs génétiques ou elle pourrait

⁶ EBA : Antigènes de liaison érythrocytaire)

⁷ *PfRH5* : protéine Réticulocyte Homologue du *P. falciparum*

⁸ BSG (la Basiginine) est une protéine transmembranaire qui appartient à l'immunoglobuline.

aussi être due à l'influence des facteurs écologiques (Boundenga et al., 2015, Paupy et al., 2013).

Des études montrent que le transfert des parasites du paludisme entre singes et Homme est possible. C'est le cas de *P. knowlesi* (Cox-Singh et al., 2008, Singh et al., 2004) ou récemment le transfert de *P. cynomolgi* et *P. vivax* d'origine simienne qui ont été transmis à l'Homme (Ta et al., 2014, Prugnolle et al., 2013). Toutefois, il a été aussi montré que les *Plasmodium spp* humains pouvaient être transmis aux singes africains (Prugnolle et al., 2013, Duval et al., 2010, Krief et al., 2010). Tous ces transferts de parasites sont le résultat d'un contact permanent créé par les systèmes de conservation, les centres de santé d'animaux ou les activités d'écotourisme qui entraînent les hommes dans les habitats des singes.

Les sanctuaires sont d'autant plus importants dans l'évaluation des risques de transferts des pathogènes dans le sens où ces lieux permettent un contact permanent entre les hommes (personnel soignants, animaliers, visiteurs) et les primates non-humains en particulier les grands singes. Ce contact accru créé par les sanctuaires pourrait constituer un problème de santé tant pour les populations humaines que pour les primates non humains. Des études récentes montrent les risques encourus par les populations des grands singes face aux agents infectieux d'origine humaine (Kaur et al., 2008, Köndgen et al., 2008).

Les questions qui sont au centre des débats concernant les parasites du paludisme sont les suivantes :

- (i) est-ce que toutes les lignées plasmodiales circulant chez les PNH africains ont été identifiées ?
- (ii) quels sont les facteurs qui déterminent la spécificité d'hôte apparente remarquée chez les *Laverania* ?
- (iii) quels seraient les risques encourus par la population humaine dont le contact devient de plus en plus fréquent à travers les différentes activités d'exploitation forestière et de déforestation ?

Bien qu'un nombre important de populations de grands singes en Afrique aient été maintenant étudiées, concernant les infections à *Plasmodium*, il y a encore de vastes zones de leur aire de répartition géographique qui restent inexplorées. C'est le cas, pour les populations de chimpanzés et de gorilles d'Afrique occidentale et centrale. Les infections à *Plasmodium* ont

été presque exclusivement étudiées dans les populations du Cameroun (Liu et *al.*, 2010). Ce qui fait qu'environ les deux tiers de l'aire de distribution des grands singes de la sous espèce *Gorilla g. gorilla* et *Pan t. troglodytes* restent encore inexplorée.

Le Gabon est une zone importante pour les grands singes (gorilles et chimpanzés) et les autres singes de la famille des *Cercopithecidae* (Gautier-Hion and Brugière, 2005, Gautier-Hion et al., 1999). Cependant, juste quelques individus ont servi aux différentes études sur les *Plasmodium spp* (Prugnolle et al., 2011d, Prugnolle et al., 2010, Ollomo et al., 2009). À l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible sur toutes les espèces de *Plasmodium spp* en circulation chez les PNH du Gabon en milieu naturel. De même, aucune donnée n'est disponible sur la probable infection des grands singes vivant en milieu naturel par des souches humaines de *Plasmodium spp*.

Nous ne saurions être à l'abri d'un risque d'émergence de nouvelles souches plasmodiales dans la population humaine par le biais d'une transmission des parasites (*Plasmodium spp*) de PNH vers l'Homme. Au Gabon, les grands singes orphelins (chimpanzés et gorilles) saisis par les agents du ministère des Eaux et Forêt sont libérés dans les sanctuaires après une période de quarantaine au centre de primatologie du CIRMF (Centre International de Recherche Médicale de Franceville). Ces cadres créés pour la préservation des primates non humains (PNH) accroissent le contact entre l'Homme et ces derniers, ce qui pourrait favoriser des échanges de pathogènes entre eux. Nous assistons également à la création de plusieurs villages autour des concessions forestières, ce qui contribue à favoriser le contact entre populations humaines et les animaux et en particulier les primates non-humains. Ainsi, quelles peuvent être les conséquences engendrées par les proximités entre les hommes et les PNH créées par les systèmes de conservation tels que les sanctuaires ou les centres de primatologie? Y-a-t-il un risque réel de transfert de ces parasites dans les populations humaines ?

2. OBJECTIFS DE LA THESE

Le Gabon a voué 11% de son territoire à la conservation de la biodiversité tant animale que végétale (Figure 17). D'après le constat fait sur le manque d'informations sur les parasites du paludisme chez les PNH du Gabon, sur l'augmentation des activités d'exploitation forestières qui accroissent les contacts entre la population humaine et les PNH et l'hypothèse selon laquelle la proximité engendrée par les systèmes de gestion des animaux pourrait favoriser un échange (transfert) de pathogènes entre Homme et PNH, nous nous sommes fixés comme objectif principal de :

Déterminer la diversité plasmodiale et l'écologie des parasites circulant chez les primates non-humains du Gabon et de mettre en évidence les éventuels transferts inter-espèces.

Cet objectif global se décline en divers objectifs spécifiques, à savoir :

- 1) Déterminer la diversité de *Plasmodium* en circulation chez les grands singes du Gabon en milieu naturel. Ici il s'agira d'utiliser des méthodes non-invasives (analyses de fèces) et outils moléculaires afin de caractériser toutes les espèces de *Plasmodium* circulant dans les grands singes sauvages en milieu naturel.
- 2) Évaluer la transmission inter-espèces de *Plasmodium* entre les populations humaines et les PNH. Il s'agira de vérifier si la proximité créée par les sanctuaires et les centres de santé des PNH favorisent une commutation de *Plasmodium* entre populations humaines et PNH.
- 3) Évaluer les effets des infections à *Plasmodium* sur la santé des grands singes? En d'autres termes quelle est la virulence des *Plasmodium* chez les grands singes.
- 4) Déterminer les souches plasmodiales qui circulent chez les autres espèces de la faune sauvage. Il s'agit dans cette partie de voir si le fait que les PNH partagent leur habitat avec d'autres espèces animales permet une transmission horizontale entre les différentes espèces animales partageant le même territoire.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Populations d'étude

Dans le cadre de ces travaux de thèse trois types de populations ont été étudiés. Nous donnons ici une description succincte de ces populations mais d'avantage de détails sur celles-ci sont contenus dans les articles.

- ❖ la population des gorilles (*Gorilla gorilla gorilla*) et des chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) vivant en milieu naturel au Gabon. Ces populations ont été étudiées dans le but d'évaluer la diversité plasmodiale circulant chez les grands singes du Gabon. Nous avons utilisé les fèces des populations sauvages collectées de manière non-invasives afin de répondre au premier objectif spécifique (plus de détails dans l'**Article 1**);
- ❖ les populations de gorilles, de chimpanzés et autres PNH des différents sanctuaires (Parc de la Lékédi (LEK), Programme de Protection de Gorilles (PPG) et du Centre de Primatologie du CIRMF (CDP). Ces populations ont été étudiées dans le but d'évaluer les transferts de *Plasmodium* entre les grands singes et les hommes qui travaillent en contact étroit avec ces animaux. Nous avons analysé environ 800 échantillons de sang qui nous ont permis d'évaluer la diversité de *Plasmodium* qui circulent dans ces écosystèmes et de mettre en évidence les éventuels transferts existant dans ces environnements. (voir **Article 2 et Article 3**).
- ❖ Une "biobank" d'environ 490 échantillons de plusieurs espèces de mammifères, reptiles et oiseaux du Gabon. Ces échantillons (foie et rate), collectés à partir de viande de brousse, ont été utilisés pour évaluer la diversité des parasites du paludisme qui circulent dans la faune sauvage coexistant avec les primates non-humains, mais aussi pour vérifier la possibilité de transfert inter-espèces des *Plasmodium* entre des populations hôtes partageant un même environnement. (**Article 4**)

2. Collecte d'échantillons

Pour la réalisation de ce travail, différentes méthodes d'échantillonnage ont été utilisées selon les cas : (1) des méthodes dites non-invasives : prélèvements de matières fécales, et (2) des méthodes invasives : prélèvements de sang et organes.

2.1 Méthodes non-invasives

Les méthodes non-invasives sont des méthodes de prélèvements d'échantillons biologiques qui ne nécessitent aucun contact direct avec l'animal. Concernant les échantillons prélevés, il peut s'agir de tout élément biologique laissé dans l'environnement par les animaux et que le chercheur pourra collecter et analyser (poils, fèces, urine, salive, sang à l'issue de blessure). Il y a aucune interaction directe et rapprochée entre le chercheur et l'animal. Ces méthodes sont de plus en plus utilisées car elles limitent le risque de transferts d'agents infectieux et limitent les risques d'accidents pour les chercheurs et les animaux eux-mêmes (Kawai et *al.*, 2014, Prugnolle et *al.*, 2010, Nwakanma et *al.*, 2009, Wilson et *al.*, 2008).

Les méthodes non-invasives réduisent également l'impact du stress sur le comportement des animaux. L'approche non invasive permet de répondre à une multitude de questions en écologie, ce qui en fait un outil de recherche fort intéressant (Mainguy and Bernatchez, 2007, Valière et *al.*, 2003). Elle permet par exemple de mettre en évidence les pathogènes (virus, bactéries, parasites) qui circulent dans la faune (D'arc et *al.*, 2015, Jirku et *al.*, 2015, Mombo et *al.*, 2014). Poils, salive ou fèces peuvent également servir, grâce à des analyses génétiques, à estimer la taille d'une population sur un territoire donné, à établir les relations de parentés entre les différents individus (Mainguy and Bernatchez, 2007). L'acquisition de ces informations se fait via l'interprétation des signatures génétiques qui sont maintenant décodées par des techniques moléculaires modernes. Cette information génétique peut également permettre l'assignation d'un échantillon à un individu particulier (Duval, 2012, Mainguy and Bernatchez, 2007).

Dans le cas de la détection des *Plasmodium*, plusieurs méthodes non-invasives ont été mises au point ces dernières années, sur la base de l'urine, la salive (Nwakanma et *al.*, 2009, Wilson et *al.*, 2008) et les fèces (Prugnolle et *al.*, 2010). Cette dernière approche fut utilisée pour la première fois pour la détection du *Plasmodium* en milieu naturel par Prugnolle et *al.* (2010). Ensuite, elle fut reprise dans d'autres études à plus grande échelle dans la caractérisation des parasites du paludisme chez les grands singes (Mapua et *al.*, 2015, Liu et *al.*, 2010, Kaiser et *al.*, 2010).

S'agissant de notre étude, nous avons concrètement prélevé des échantillons de fèces sur le terrain. Les échantillons de fèces collectés ont été mis dans un tube Falcon de 50mL contenant 20mL solution d'RNAlater® (Figure 27). C'est une solution qui permet de conserver à température ambiante le matériel génétique (ADN et ARN) durant toute la période de la mission (environ 15 jours). Puis, le tube est homogénéisé (Figure 27-3). La date de prélèvement, le numéro d'échantillon, le site de collecte et l'espèce à laquelle appartient l'animal sont inscrits sur le tube. Les autres informations (fraicheur des fèces (<24h ou <24h), saison (saison de pluie ou saison sèche) sont inscrites sur les fiches de terrain. Tous les échantillons sont conservés au laboratoire du CIRMF dans des congélateurs à -80° C. Pour ce travail de thèse, près de 1261 échantillons fécaux de grands singes ont été collectés dans 8 des 9 provinces du Gabon.



Figure 27 : Collecte de fèces en milieu naturel (Boundenga, 2014).

2.2 Méthodes invasives.

Les premières études du paludisme chez les primates faisaient intervenir des méthodes de collecte invasives via la prise de sang (Bray and Garnham, 1964, Bray, 1958, Adler, 1923). Toutefois, ces procédés se sont avérés avoir des conséquences sur la physiologie, le comportement des animaux ou même encore faciliter les risques infectieux.

Malgré ces inconvénients, ces méthodes ont été appliquées pour certains individus de PNH étudiés au cours de la thèse. Elles ont été utilisées lorsque les effectifs d'individus étaient réduits et que les animaux étaient facilement accessibles comme les chimpanzés et gorilles en

semi-captivité, vivant dans les sanctuaires (Parc de la LEKEDI (LEK) ou le Programme de Protection de Gorilles (PPG)) ou le Centre de Primatologie (CDP) du CIRMF.

De manière générale, les échantillons de sang des PNH ont été collectés durant les différentes périodes de contrôles sanitaires. Ces contrôles, annuels ou bisannuels, visent à faire le bilan de santé des animaux. Après une anesthésie de l'animal avec de la kétamine, environ 4 à 7mL de sang ont été prélevés dans un tube EDTA pour chaque individu selon le poids de ce dernier comme décrit par Herbert et *al.* (2015) et Ollomo et *al.* (2009). Les échantillons sont ensuite envoyés au CIRMF où ils sont conservés dans des congélateurs à -20°C.

Des échantillons de sang du personnel travaillant en contact avec les animaux ont été également prélevés pendant ces périodes. Nous tenons à rappeler que cette étude a été autorisée par le comité national d'éthique gabonais, et que les prélèvements se sont faits avec l'accord de chaque agent dont l'anonymat a été respecté jusqu'à la fin de l'étude (PROT/0020/2013/SG/CNE). Les quantités et qualités des ADN parasites extraits à partir de prélèvements de sang étant optimales, la qualité et sensibilité des techniques de diagnostics moléculaires applicables sont très robustes (Duval, 2012).

Pour la caractérisation de *Plasmodium* dans les autres animaux de la faune sauvage, nous avons utilisé les échantillons de la biobank de virologie du CIRMF. Cette biobank est composée d'échantillons d'organes (foie et rate) d'animaux sauvages (reptiles, oiseaux et mammifères) contenu dans des tubes NUNC conservés aux congélateurs -80° C. Ces échantillons ont été prélevés sur des animaux morts (viande de brousse) saisis par les agents de Eaux et Forêts pendant leurs campagnes de lutte anti-braconnage.

3. Études moléculaires

Après les travaux de terrain succèdent les analyses moléculaires qui s'effectuent au laboratoire. L'extraction de l'ADN, la spéciation (confirmation de l'hôte), la préparation du «mix PCR», l'amplification génique par PCR nichée, et la migration des amplicons sur gel d'agarose ont été réalisées dans des salles différentes prévues pour chaque étape, afin d'éviter les risques de contaminations. Et près que toutes les analyses ont été répétées plusieurs fois pour éliminer tout risque d'erreurs liées à de possibles mauvaises manipulations. D'avantages d'informations sur les méthodes utilisées au cours de cette thèse sont contenues dans les différentes publications scientifiques (*cf* partie résultats).

3.1 Extraction d'ADN et Spéciation

L'ADN a été extrait à partir de 200µl de sang total ou 2ml de fèces liquide respectivement à l'aide d'un kit *Blood and Tissue* et d'un kit *QIAmp DNA stool Mini kit blood Mini Kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France) suivant les indications du fabricant. C'est aussi à l'aide du même kit Qiagen blood and tissue que l'ADN a été extrait à partir d'organes des autres mammifères, mais suivant un autre protocole (détaillé dans l'article 3). Dans tous les cas, l'extraction de l'ADN s'est déroulée en plusieurs étapes (Figure 28) :

- (i) la lyse des échantillons dans des conditions dénaturantes à l'aide d'un tampon de lyse qui permet de digérer des cellules et d'extraire des acides nucléiques ;
- (ii) la fixation de l'ADN sur la membrane de la colonne ;
- (iii) les lavages (au nombre de deux) pour augmenter la pureté de l'ADN ;
- (iv) l'élution de l'ADN avec 200µl de tampon d'élution et le stockage à -20°C.

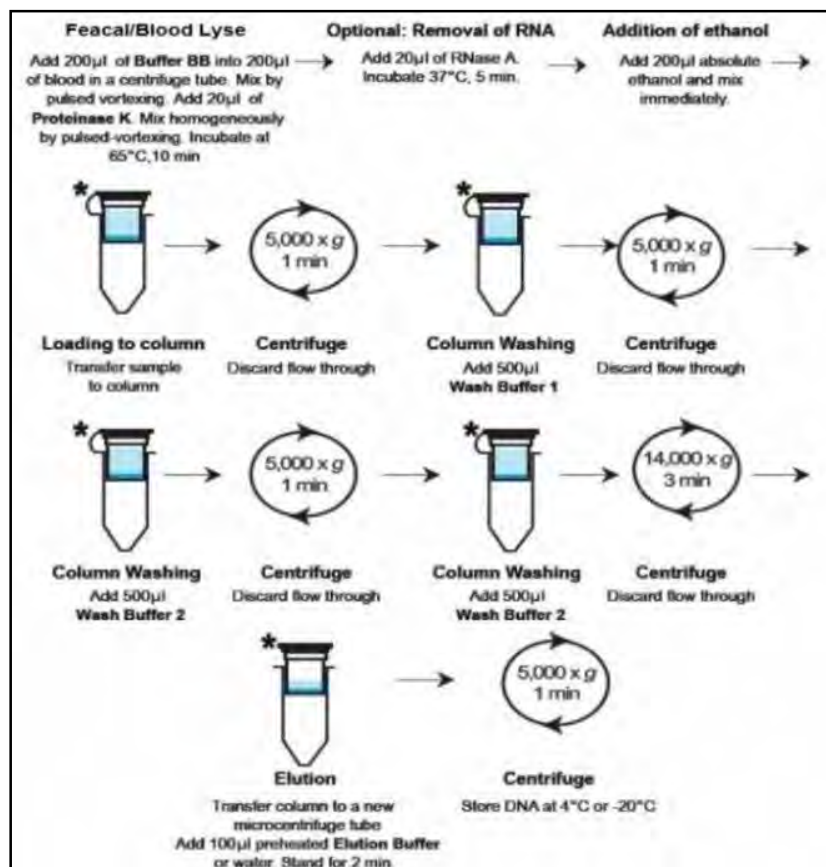


Figure 28: Les différentes étapes du protocole d'extraction d'ADN (Qiagen, 2014)

Après l'extraction d'ADN à partir des fèces, nous procédons à une spéciation moléculaire qui a pour objectif de déterminer l'origine des fèces grâce à l'amplification d'une partie de la D-loop ou 12S ARNr (Figure 29) qui va permettre de distinguer les échantillons qui proviennent des gorilles de ceux des chimpanzés. Une simple vérification sur gel permet de discriminer le chimpanzé du gorille car ce dernier, à cause d'une délétion, apparaîtra plus bas sur le gel.

La D-loop ou encore boucle de déplacement est seule région non codante de l'ADNmt contient l'origine de réplication du brin lourd, les sites d'initiation de la transcription et les séquences régulatrices de la transcription et de la réplication (Larsson and Clayton, 1995).

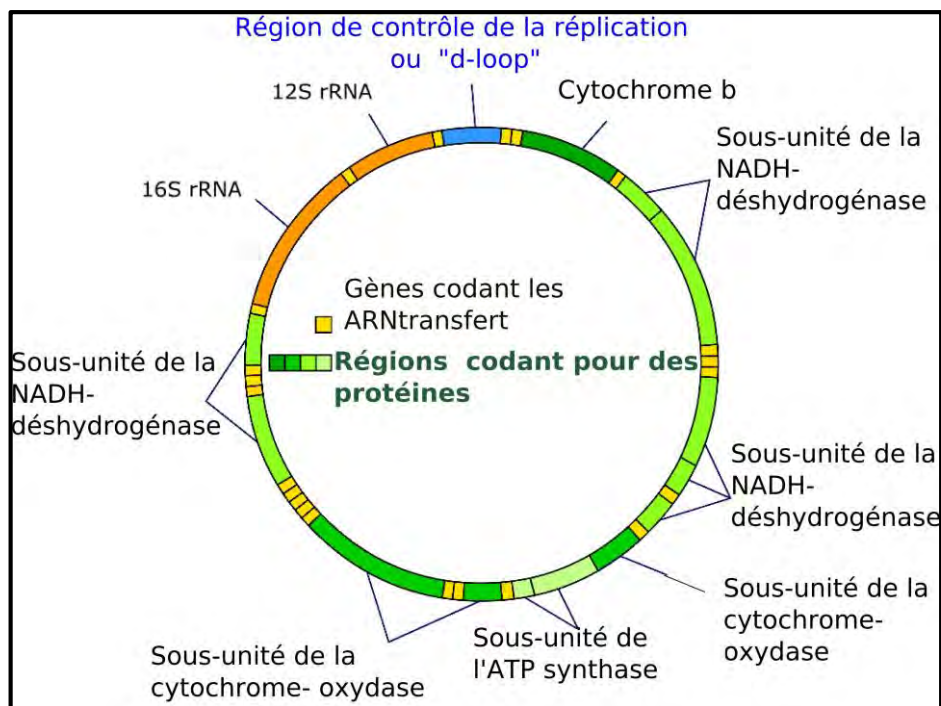


Figure 29: Organisation de l'ADN mitochondrial des Mammifères (Commons.wikimedia.org)

3.2 Caractérisation de l'infection à *Plasmodium* et Séquençage

Depuis les années 1990, les techniques d'amplification de l'ADN principalement par réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR), accompagnées de l'analyse du polymorphisme de l'ADN, ont surpassé toutes les autres techniques d'identification d'espèces. Cet essor considérable des outils moléculaires est dû à leurs usages faciles, à leurs sensibilités, fiabilités et leurs rapidités (Carnevale et *al.*, 2009).

Les classifications taxonomiques actuelles sont très souvent basées sur l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est circulaire contrairement à l'ADN nucléaire, avec un polymorphisme limité (Coquoz and Taroni, 2006). Les mitochondries sont en grand nombre dans le génome, l'amplification des gènes est ainsi facilitée. L'héritabilité du génome mitochondrial (Figure 29) est quasi maternelle et la recombinaison est absente (De Benedictis et *al.*, 1999, Simon et *al.*, 1994, Bell et *al.*, 1985). Ainsi, l'ADN mitochondrial est informatif sur l'histoire de la lignée matriarcale. Les gènes mitochondriaux sont donc des marqueurs de choix dans les phylogénies et sont utilisés en phytogéographie (Hurst and Jiggins, 2005, Sunnucks, 2000).

L'ADN mitochondrial offre donc nombre d'opportunités et d'avantages pour les études de biologie évolutive ou d'écologie moléculaire car elle est singulièrement pourvue de caractéristiques propres à l'étude de l'histoire évolutive des espèces (Felinier and Rosselló, 2007, Ballard and Whitlock, 2004, Crespi, 2001).

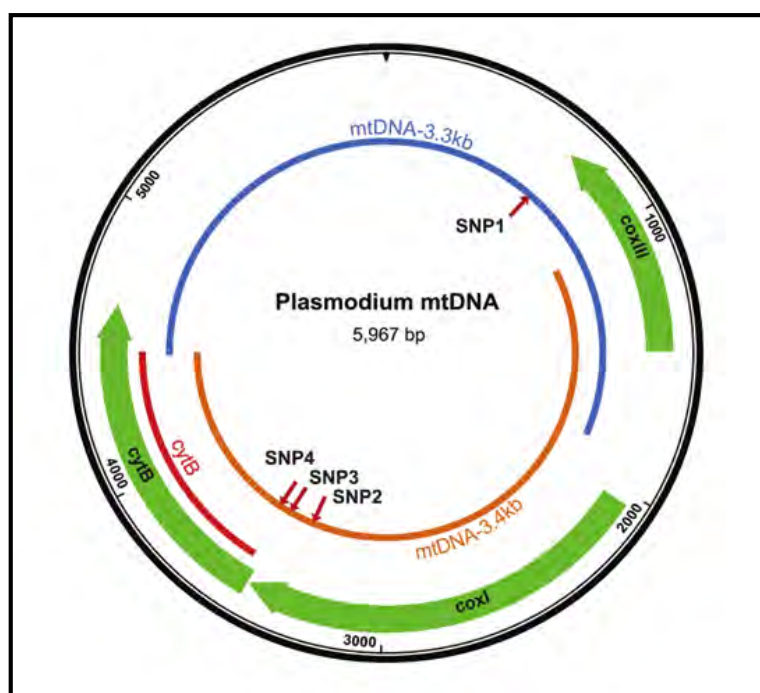


Figure 30: Représentation du génome mitochondrial d'un *Plasmodium* (Liu et *al.*, 2010). Les SNPs permettent de faire une différence entre les souches d'humaines et simiennes.

3.2.1 PCR nichée

Le statut parasitaire des individus a été déterminé par l'amplification d'un fragment du gène du *Cytochrome b* (**Cyt-b**), localisé dans une région précise de l'ADNmt (Figure 30). Nous

avons choisi le gène *cytochrome b* de la mitochondrie pour l'analyse parce qu'il a été identifié dans plusieurs études comme un bon marqueur phylogénétique pour lequel de nombreuses données sont disponibles. Le *cytochrome b* est impliqué dans le transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Il est composé de 8 hélices transmembranaires liées à des domaines intra ou extra membranaires. Il existe beaucoup de séquences de ce gène disponibles dans GenBank pour les différents genres d'Haemosporidia (*Plasmodium*, *Hepaticystis*, *Haemoproteus* et *Leucocytozoon*) isolés chez les oiseaux, reptiles et mammifères.

La PCR nichée qui est le procédé utilisé au cours de ces travaux comme décrit dans les travaux d'Ollomo et *al.* (2009) et Prugnolle et *al.* (2010), consiste en deux PCR successives (Sabourdy, 2001, Niepceon and Licois, 2007) (Figure 32). Cette approche moléculaire utilise deux couples d'amorces différents (Prugnolle et *al.*, 2010) (Figure 31).

Primer	Sequence	PCR conditions		Reference
DW2	5'-TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG-3'	95 °C	15'	Prugnolle et al. (2010)
DW4	5'-TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'	94 °C	30"	
		60 °C	1'30"	
		72 °C	1'30"	
		72 °C	10'	
		10 °C	10'	Prugnolle et al. (2010)
Cytb1	5'-CTCTATTAATTTAGTTAAAGCACA-3'	95 °C	5'	
Cytb2B	5'-GCTCTATCATACCCTAAAGG-3'	94 °C	30"	
		44-9 °C	1'	
		72 °C	1'	
		72 °C	5'	Prugnolle et al. (2010)
		4 °C	~	
Cytb2	5'-ACAGAATAATCTCTAGCACC-3'	95 °C	5'	
Cytb1A ⁺	5'-CAAATGAGTTATTGGGGTGCAACT-3'	94 °C	30"	
		58-9 °C	1'	
		72 °C	1'	
		72 °C	5'	
		4 °C	~	

Cytb2B* primer designed in this study, amplifying first overlapping fragment.
Cytb1A⁺ primer designed in this study, amplifying second overlapping fragment.

Figure 31: Les différents couples d'amorces utilisées (Mapua et *al.*, 2015)

Les fragments d'ADN amplifiés au cours de la première PCR contiennent les séquences qui seront appariées avec la deuxième paire d'amorce et amplifiées. Cette deuxième amplification dite «nichée» rend la technique très sensible, et permettra ainsi d'amplifier un fragment du gène du *cytochrome b* des parasites (Figure 30). Tout au long de ces travaux, cette technique de diagnostic plus sensible que la méthode microscopique (Megali et *al.*, 2011, Soulé et *al.*, 1994, Valkiunas et *al.*, 2006) a été utilisée pour la caractérisation des infections à *Plasmodium* chez les primates non humains.

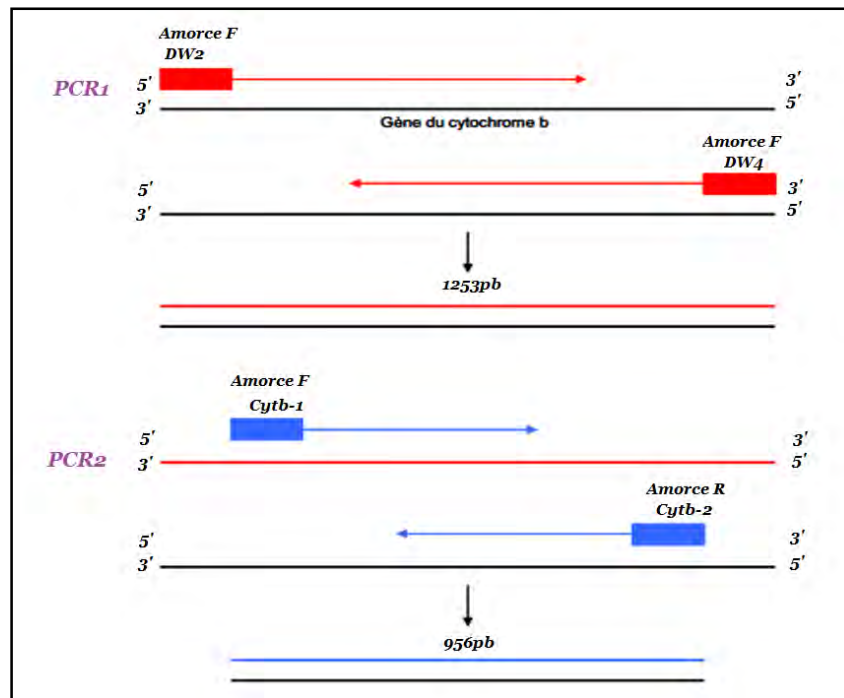


Figure 32: Principe de la PCR nichée. Deux PCR successives

3.2.2 Séquençage

Les produits de PCR obtenus (c'est-à-dire les fragments amplifiés) sont directement envoyés pour être séquencé afin de déterminer la souche plasmodiale. La méthode utilisée pour le séquençage est la méthode Sanger. Le séquençage génétique de Sanger est une méthode qui permet de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN (Figure 33) (Ronaghi et *al.*, 1998, Sanger et *al.*, 1977).

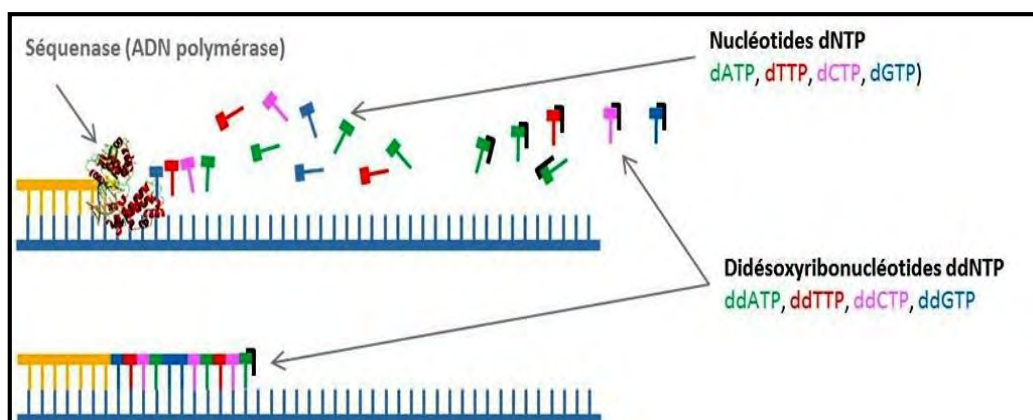


Figure 33: Illustration d'une phase de séquençage (www.oezratty.net, 2015)

3.3 Analyse des séquences

Les résultats du séquençage, présentés sous la forme de chromatogrammes de type ABI contenant les séquences nucléotidiques ont été analysés à l'aide du logiciel Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.htm>) et Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-seqmanpro>). Les séquences ont ensuite été comparées aux séquences de Genbank à l'aide du logiciel BLAST pour leur caractérisation (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Sous format FASTA, les séquences “contig” ont été alignées avec d'autres séquences précédemment publiées à l'aide du logiciel ClustalW 1.81 pour la détermination des similarités nucléotidiques. Ce dernier alignement des séquences sous format FASTA se fait à l'aide du logiciel MEGA5 (Molecular Evolution Genetics Analysis) (Tamura et *al.*, 2011) ou sur le site PhyML :(<http://www.phylogeny.fr/>) (Guindon et *al.*, 2010, Dereeper et *al.*, 2008) pour les différentes études phylogénétiques.

3.4-Phylogénie

La phylogénie permet de classer et d'étudier les relations entre les espèces. Un arbre phylogénétique est une représentation graphique de la phylogenèse d'un groupe de taxa, où les nœuds externes représentent les unités taxonomiques étudiées et les branches les relations entre les taxa en termes de descendance (Cracraft, 1983a, Cracraft, 1983b). Les nœuds internes représentent des ancêtres hypothétiques (Huson and Bryant, 2006, Maddison et *al.*, 1984). Les phylogénies actuelles sont maintenant, la plupart du temps, basées sur la comparaison de séquences génétiques de différentes espèces. Les organismes sont les véhicules de l'information génétiques (Santoni et *al.*, 2000) et il est donc logique que l'histoire évolutive des organismes et celle de leur gènes soient intimement mêlées (Keeling and Palmer, 2008). On parle dans ce cas de phylogénétique.

La méthode d'analyse phylogénétique utilisée est le maximum de vraisemblance ML (*Maximum Likelihood*). Elle repose sur un raisonnement probabiliste de l'évolution supposée des séquences au sein des espèces (Guindon and Gascuel, 2003, Felsenstein, 1973). La méthode du maximum de vraisemblance est considérée comme la plus fiable de toutes les méthodes phylogénétiques, celle qui conduit au résultat le plus proche de l'arbre évolutif réel (Guindon et *al.*, 2010) et permet d'appliquer les différents modèles d'évolution (Tamura/Nei, GTR, K2P, HKY85). Par contre, c'est une méthode qui demande une grosse puissance de calcul et qui prend le plus de temps. Afin d'estimer la fiabilité des branches internes, des méthodes

statistiques sont utilisées, telles que le bootstrapping (Stamatakis et al., 2005, Rannala and Yang, 1996, Yang, 1994). On considère généralement que les branches définies par une valeur de bootstrap supérieure à 70 % sont fiables (Balding et al., 2008, Balding, 2003).

La phylogénétique est l'outil que nous avons utilisé pour décrire les relations de parenté entre les organismes étudiés puis pour retracer l'histoire évolutive des différents *Plasmodium* comme cela a été effectué décrit dans les études précédentes de Prugnolle et al. (2010) et Ollomo et al. 2009. Toutefois, nous avons utilisé également une approche bayésienne dans l'article 4, afin de vérifier les approches phylogénétiques réalisés à partir de Maximum Likelihood dans description des nouvelles lignées des hémospories chez les antilopes.

L'analyse bayésienne (Mr Bayes ver 3.1.2) (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) été menée selon le modèle Equalin (F81) et d'autres paramètres recommandés par les auteurs (1 000 000 de générations avec un échantillonnage toutes les 100 générations jusqu'à obtention d'une déviation standard inférieure à 0.01, un burnin de 25%, un « potential scale reduction factor » (PSRF) proche de 1.0 pour chaque paramètre). La robustesse des nœuds est donnée avec des probabilités postérieures. Nous avons défini notre groupe d'étude des parasites *hémospories* en choisissant comme groupe externe, *Leucocytozoon sp*, parasites appartenant au Phylum *Apicomplexa* infectant les oiseaux.

4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été faites avec le Logiciel R (Version R i386 3.1.0). Les différentes analyses réalisées pour ces travaux de thèse, nous avons utilisé la régression logistique.

La régression logistique est un des modèles multivariés couramment utilisé en épidémiologie et en écologie. Elle s'utilise lorsque la variable à expliquer (dans notre cas présence ou absence du *Plasmodium*) est qualitative, le plus souvent binaire. Les variables explicatives (variables indépendantes X_i = fraîcheur de crottes (> 24h ou <24h), espèces hôtes (chimpanzé ou gorille), saison (pluie ou saison sèche) ou encore le site de collecte) pour ce qui est de notre cas. L'intérêt majeur de cette approche est de quantifier la force de l'association entre chaque variable indépendante et la variable dépendante, en tenant compte de l'effet des autres variables.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

Dans cette partie, nous présentons, sous forme de publications scientifiques, les résultats de l'étude de la diversité des *Plasmodiums* en circulation chez les primates non humains du Gabon, leur écologie et les potentiels transferts inter-espèces. Ces résultats sont consignés dans quatre articles scientifiques parus, soumis dans des revues internationales ou en préparation. En amont de chacune de ces publications, nous présentons un résumé (en français) de chacun des articles en indiquant le contexte, les objectifs, les résultats et les grandes conclusions des dits articles. Parmi ces articles, nous pouvons citer :

Article-1 Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon

Larson Boundenga, Benjamin Ollomo, Virginie Rougeron, Lauriane Yacka-Moule, Nancy Diamella Moukodoum, Alain Prince Okougua, Céline Arnathau, Florian Liégeois, Vanina Boué, Janvier, Christophe Paupy, Cheikh Tidiane Ba, Francois Renaud, Franck Prugnolle
Malaria Journal (2015) 14:111 [DOI 10.1186/s12936-015-0622-6](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0622-6).

Article-2 Ape malaria host specificity can be broken in confined environments

Ngoubangoye Barthélémy[†], **Larson Boundenga**[†], Celine Arnathau, Thierry-Audrey Tsoumbou, Bertony Vacky Otoro, Rick Sana, Alain-Prince Okougua, Nancy Moukodoum, Anaïs Herbert, David Fouchet, Cheikh Tidiane BA, Virginie Rougeron, Benjamin Ollomo, Christophe Paupy, Dominique Pontier, François Renaud, Franck Prugnolle

[†] Co-premier auteur; (en préparation pour [Emergence Infection Disease](#))

Article-3 Malaria-like symptoms associated with a natural *Plasmodium reichenowi* infection in a chimpanzee: a case report

Herbert A, **Boundenga L**, Meyer A, Moukodoum N, Okouga A. P, Arnathau C, Durand P, Magnus J, Ngoubangoye B, Willaume E, BA CT, Rougeron V, Renaud F, Ollomo B, Prugnolle F. Malaria Journal (2015) 14:220 DOI [10.1186/s12936-015-0743-y](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0743-y).

Article-4 Haemosporidian parasites of antelopes and other vertebrates from Gabon, Central Africa

Larson Boundenga[†], Boris Makanga[†]; Benjamin Ollomo, Virginie Rougeron, Bertrand Mve-Ondo, Celine Arnathau, Patrick Durand, Nancy Diamella-Moukodoum, Alain-Prince Okouga, Lucretse Loembet-Delicat, Lauriane Yacka-Mouele, Eric Leroy, Nil Rahola, CheikhTidiane BA, Francois Renaud, Franck Prugnolle, Christophe Paupy. (Soumis [Plos One](#))

Remarque

La présente étude a fait l'objet d'un mini documentaire d'une durée de 17mn portant sur l'origine du Paludisme chez les hommes intitulé "Enquête en forêt gabonaise", réalisé par l'IRD et qui peut être vu sur le site youtube à l'adresse (www.youtube.com/watch?v=oHmE8zaylRg).

Chapitre 1

Diversité plasmodiale chez les grands singes du Gabon



Résumé

Contexte et Objectif

Des études récentes font état d'une large diversité de *Plasmodium* chez les grands singes d'Afrique. En effet, le développement récent des outils moléculaires a permis la ré-exploration de la diversité plasmodiale chez les singes africains. Ces études ont révélé qu'un minimum de six espèces de *Plasmodium* appartenant au sous-genre *Laverania* circulent dans les grands singes. Bien qu'un grand nombre de populations de grands singes aient maintenant été étudiées en ce qui concerne les infections à *Plasmodium* en Afrique, il y a encore de vastes zones de leur aire de distribution qui sont restées inexplorées, en particulier le Gabon. Ce pays constitue une zone importante dans la distribution des chimpanzés et gorilles d'Afrique centrale, mais n'a pas été étudié jusqu'à présent. L'objectif de notre première étude était donc de déterminer toutes les espèces de *Plasmodium* qui circulent chez les gorilles et chimpanzés du Gabon. Ainsi, l'analyse a porté sur 1261 échantillons fécaux dont 791 de chimpanzés et 470 de gorilles recueillis dans 24 sites partout au Gabon.

Résultats

L'analyse des 1261 échantillons des grands singes a révélé qu'au moins six espèces de *Plasmodium* circulent dans les grands singes au Gabon (*P. praefalciparum*, *P. gorA*, *P. gorB* chez les gorilles et *P. gaboni*, *P. reichenowi* et *P. billcollinsi* chez les chimpanzés). Aucune nouvelle lignée phylogénétique n'a été découverte. Le taux moyen d'infection était de 21,3% pour les gorilles et 15,4% pour les chimpanzés.

Conclusions

Les résultats obtenus dans cette étude rendent compte de la circulation chez les grands singes du Gabon d'au moins six espèces de *Plasmodium spp.* Toutes les espèces de *Plasmodiums* trouvées appartenaient au sous genre *Laverania* et ont tous été préalablement identifiées. Dans cette étude, aucune espèce du sous genre *Laverania* n'a été trouvée infectant les deux espèces d'hôtes (gorilles et chimpanzés). Cela renforce l'hypothèse que les différentes espèces du sous genre *Laverania* infectent des hôtes spécifiques.

Aucun *Plasmodium spp* humain n'a été trouvé chez les grands singes africains. Ces résultats sont conformes à d'autres études effectuées jusqu'ici sur les populations sauvages, et contrairement à ce qu'affirment certains auteurs, nous pensons que les grands singes ne constituent pas des réservoirs de *Plasmodium* humain.

Mots clefs : Diversité plasmodiale, clade des *Laverania*, grands singes, *Cytochrome b*, Gabon

Article-1

Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon

RESEARCH

Open Access

Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon

Larson Boundenga^{1,3*}, Benjamin Ollomo^{1†}, Virginie Rougeron^{1,2}, Lauriane Yacka Mouele¹, Bertrand Mve-Ondo¹, Lucrèce M Delicat-Loembet¹, Nancy Diamella Moukodoum¹, Alain Prince Okouga¹, Céline Arnathau², Eric Elguero², Patrick Durand², Florian Liégeois^{1,4}, Vanina Boué¹, Peggy Motsch¹, Guillaume Le Flohic¹, Alphonse Ndoungouet¹, Christophe Paupy^{1,2}, Cheikh Tidiane Ba³, Francois Renaud² and Franck Prugnolle^{1,2‡}

Abstract

Background: Until 2009, the *Laverania* subgenus counted only two representatives: *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium reichenowi*. The recent development of non-invasive methods allowed re-exploration of plasmodial diversity in African apes. Although a large number of great ape populations have now been studied regarding *Plasmodium* infections in Africa, there are still vast areas of their distribution that remained unexplored. Gabon constitutes an important part of the range of western central African great ape subspecies (*Pan troglodytes troglodytes* and *Gorilla gorilla gorilla*), but has not been studied so far. In the present study, the diversity of *Plasmodium* species circulating in great apes in Gabon was analysed.

Methods: The analysis of 1,261 faecal samples from 791 chimpanzees and 470 gorillas collected from 24 sites all over Gabon was performed. *Plasmodium* infections were characterized by amplification and sequencing of a portion of the *Plasmodium cytochrome b* gene.

Results: The analysis of the 1,261 samples revealed that at least six *Plasmodium* species circulate in great apes in Gabon (*Plasmodium praefalciparum*, *Plasmodium gorA* (syn *Plasmodium adleri*), *Plasmodium gorB* (syn *Plasmodium blacklocki*) in gorillas and *Plasmodium gaboni*, *P. reichenowi* and *Plasmodium billcollinsi* in chimpanzees). No new phylogenetic lineages were discovered. The average infection rate was 21.3% for gorillas and 15.4% for chimpanzees. A logistic regression showed that the probability of infection was significantly dependent on the freshness of the droppings but not of the host species or of the average pluviometry of the months of collection.

Keywords: Plasmodial diversity, *Laverania* clade, Great apes, *Cytochrome-b*, Gabon

Background

Plasmodium falciparum is a protozoan parasite responsible for malaria in humans. Among the five parasites infecting humans (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*), *P. falciparum* is by far the most virulent, responsible every year for approximately 207 million clinical cases and 627,000 deaths in the world

[1], of which 98% are in sub-Saharan Africa [2-5]. Malaria is proving to be an obstacle that can slow down economic prosperity in many tropical countries, particularly in Africa [3].

Plasmodium falciparum belongs to the subgenus *Laverania*, which up to 2009 included only two known representatives: *P. falciparum* and *Plasmodium reichenowi*, a parasite from chimpanzees. Since 2009, thanks to the use of molecular tools for species identification and the development of non-invasive methods, several studies re-explored the diversity of *Plasmodium* species circulating in non-human primates in Africa, especially great apes (gorillas and chimpanzees) [6-8]. These studies revealed the existence

* Correspondence: larsonamedeo@yahoo.fr

†Equal contributors

¹Centre International de Recherche Médicale de Franceville, BP 769, Franceville-Gabon, Gabon

³Laboratoire d'Écologie et Biologie évolutive, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar BP5005, Sénégal

Full list of author information is available at the end of the article

of several lineages/species related to *P. falciparum*, deeply modifying the comprehension of the evolution of this parasite and of *Laverania* more generally. Four *Laverania* species are now recognized to infect chimpanzees: *P. reichenowi*, *Plasmodium billcollinsi*, *Plasmodium gaboni* and *Plasmodium billbrayi* [9-11]. For gorillas, there are three species: *Plasmodium praefalciparum* (the closest relative of *P. falciparum*), *Plasmodium gorB* (syn-*Plasmodium blacklocki*) and *Plasmodium gorA* (syn-*Plasmodium adleri*) [2,12]. Great apes have also been shown to be infected with species of the subgenus *Plasmodium* (non-*Laverania*): *P. malariae*-like, *P. ovale*-like and *P. vivax*-like parasites [8,13,14].

Was the entire diversity of *Plasmodium* species circulating in great apes in Africa discovered? Although a large number of great ape populations in Africa have now been studied regarding *Plasmodium* infections, there are still vast areas of their geographic distribution that remain unexplored. This is the case, for instance, for the western, central African populations of chimpanzees and gorillas (*Pan troglodytes troglodytes* and *Gorilla gorilla gorilla*). Although the range of both species covers all Gabon, half the surface of the Republic of the Congo, the south of Cameroon (south of the Sanaga river) and south of the Central African Republic, *Plasmodium* infections were almost only studied in populations from Cameroon, making about two-thirds of their range still unexplored [2,3,12].

In this study, using the second largest bank of faecal samples studied so far (more than 1,200 faecal samples), the diversity of *Plasmodium* species circulating in the great ape populations of Gabon was analysed. An investigation of the ecological factors susceptible to influence the

detection of *Plasmodium* from these non-invasive samples was also performed.

Methods

Origin of faecal samples

Faecal samples of chimpanzees and gorillas were collected in 24 sites in Gabon from 2010 to 2014 (Figure 1a and Table 1). In the field, the origin of the faeces (chimpanzee or gorilla) was deduced according to cues such as the type of nest near which they were found, footprints, texture, and odours. Freshness of the faeces (>24 or <24 hours post excretion) was also estimated based on the freshness of surrounding nests (when present), texture, colours, humidity, and level of degradation. All samples were preserved in RNAlater® (Life technologies, USA) and conserved at the CIRMF at -80°C. Their origin (chimpanzee or gorilla) was confirmed by mitochondrial DNA analysis as previously described [15,16]. This investigation was approved by the Government of the Republic of Gabon and with the authorization of the Agence Nationale des Parcs Nationaux (ANPN). In total, 791 faecal samples of chimpanzees and 470 of gorillas were collected and analysed.

Extraction of DNA and PCR

Faecal DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Courteboeuf, France) as previously described [17] and *Plasmodium* infections were determined after amplification of a portion of *Plasmodium* mitochondrial genome (*cytochrome b: cyt-b*) as described in Prugnolle et al. [2]. All amplified products (10 µl) were run on 1.5% agarose gels in TAE buffer. The PCR-amplified products (956 bp) were used as templates

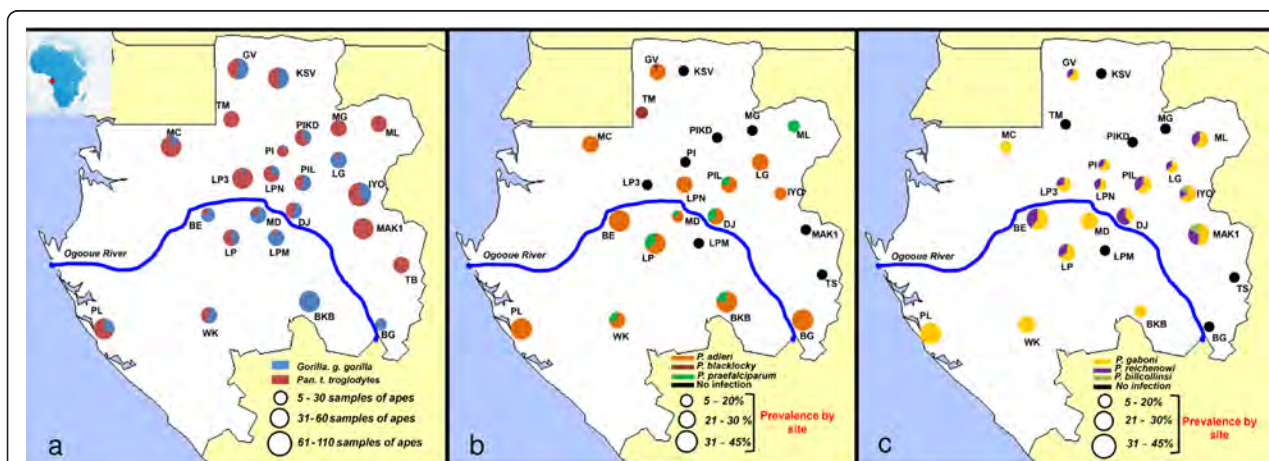


Figure 1 Sampling sites and variations of *Plasmodium* prevalences in Gabon. (a) Distribution of the sampling sites and amount of gorilla and chimpanzee samples collected and analysed in each site. Figure also shows the variations of prevalence (frequency of PCR-positives) and relative frequencies among positives of the different parasite species within the various populations of gorillas (b) and chimpanzees (c) sampled.

Table 1 List of collection sites, abbreviations and geographical coordinates in Gabon

Sites	Abbreviations	Coordinates	
		(Degree, minute, second)	
Lope	LP	S0°13'21.5"	E11°36' 37.5"
Lope-Mikongo	LPM	S0°18'27.2"	E11°40'10.3"
Tsouba	TB	S1°09'54.2"	E14°26'46.8"
Makande	MD	S0°40'53.7"	E11°55'34.4"
Langoue	LG	N0°00'05.8"	E12°27'25.9"
Parc Ivindo-Langoue	PIL	S0°11'23.0"	E12°34'58.4"
Parc Ivindo-Iret-Kongou-Djidji	PIKD	N0°30'05.2"	E12°48' 03.4"
Makatamangoye 1	MAK1	S0°08'39.3"	E13°36'47.6"
Monts De Cristal	MC	N0°40'15.4"	E10°24'54.2"
Parc Ivindo	PI	N0°23'24.8"	E12°41'33.1"
Djidji	DJ	N0°10'41.2"	E12°43'51.8"
Mwagna	MG	N0°38'53.5"	E13°52'08.2"
Boumango	BG	S1°43'36.0"	E14°03'10.0"
Malouma	ML	N0°39'01.6"	E13°52'17.2"
Lope 3	LP3	S0°19'32.4"	E11°37'23.6"
Gabonville	GV	N1°46'55.7"	E11°56'58.4"
Tomassi	TM	N1° 06'37.0"	E11°42'42.4"
Iyokomilieu	IYO	N0°02'54.1"	E13°36'05.6"
Boue	BE	S0°11'52. 7"	E12°02'01.8"
Parc de Loango	PL	S1°59'54.8"	E9°27'10.5"
Waka	WK	S1°07'57.3"	E11°08'30.8"
Bakoumba	BKB	S1°45'47.8"	E12°57'06.2"
Lope-Nord	LPN	N0°18'52.1"	E12°34'37.7"
Konossaville	KSV	N1°40'23.9"	E12°04' 09.7"

for sequencing. DNA sequencing was performed by Eurofin MWG [18].

Species identification in mixed infections

When sequence chromatograms showed multiple peaks (heterozygous base calling), the program Mixed Sequences Reader (MSR) was used to determine if the isolates were mixed infected and by which species [19]. This program can directly analyse heterozygous base-calling fluorescence chromatograms and identify species in presence from a list of reference sequences (Table 2).

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed using only *cyt-b* sequences derived from chromatograms with no ambiguous base calls. To examine the relationship of the *cyt-b* sequences obtained with the different *Plasmodium* species known so far, a phylogenetic tree was constructed using a set of reference sequences belonging to different *Plasmodium* species. Hosts and GenBank accession numbers for these reference sequences are given in Table 3.

The multiple alignment of all partial *cyt-b* sequences (686 nucleotides) was done using ClustalW (v 1.8.1 in BioEdit v.7.0.9.0. software) [20]. Maximum likelihood (ML) tree construction was based on the *cyt-b* sequences. The best-fitting ML model under the Akaike Information Criterion was GTR (general time reversible) + ModelTest. [21] The highest-likelihood DNA tree and corresponding bootstrap support values were

Table 2 Percentage of mixed infections detected from sequence chromatograms with multiple peaks using the program MSR (Mixed Sequences Reader)

Host	Percentage (%) of mixed infections	Associated species (n)
		<i>P. reichenowi</i> + <i>P. gaboni</i> (6)
		<i>P. billcollinsi</i> + <i>P. gaboni</i> (1)
Chimpanzees	20% (8/40)	<i>P. reichenowi</i> + <i>P. billcollinsi</i> (1)
Gorillas	28% (8/29)	<i>P. adleri</i> + <i>P. praefalciparum</i> (7)
		<i>P. adleri</i> + <i>P. blacklocky</i> (1)

n: Number of mixed infection found.

Table 3 Accession numbers of the sequences of reference used in the phylogenetic tree

Accession number	Isolates	Species	Host species	References
HM235178	C1 BBptt238	<i>P. reichenowi</i>	Chimpanzee	Liu et al. [12]
HM235317	C2 LBptt176	<i>P. gaboni</i>	Chimpanzee	Liu et al. [12]
HM234979	C2 BBptt93	<i>P. gaboni</i>	Chimpanzee	Liu et al. [12]
HM234980	C1 BBptt93	<i>P. reichenowi</i>	Chimpanzee	Liu et al. [12]
HM234976	C3 BApts1413	<i>P. billcollinsi</i>	Chimpanzee	Liu et al. [12]
KC203544	EC4014_SGA500.11	<i>P. falciparum</i>	Human	Sundaraman et al. [25]
FJ895308	Isolate B	<i>P. gaboni</i>	Chimpanzee	Ollomo et al. [11]
GU045315	BQ642	<i>P. reichenowi</i>	Chimpanzee	Prugnolle et al. [2]
GQ355486	DRCJ	<i>P. malariae</i>	Bonobo	Krief et al. [26]
FJ409564	CPZcam91	<i>P. ovale</i>	Chimpanzee	Duval et al. [27]
KF591814	MRL49_FD_SGA1k.	<i>P. vivax</i>	Human	Liu et al. [14]
JQ345521	KN013	<i>P. knowlesi</i>	Human	Neoh Wan Fen et al. [28]
GU045317	BQ668	<i>P. blacklocki</i>	Gorilla	Prugnolle et al. [2]
GU045322	BQ638	<i>P. adleri</i>	Gorilla	Prugnolle et al. [2]
HM235386	G1 DDgor27	<i>P. praefalciparum</i>	Gorilla	Liu et al. [12]
HM235295	G3 DSgor24	<i>P. blacklocki</i>	Gorilla	Liu et al. [12]
HM235203	G1 DSgor86	<i>P. praefalciparum</i>	Gorilla	Liu et al. [12]
HM235059	G2 KKgor2638	<i>P. adleri</i>	Gorilla	Liu et al. [12]
JF923762	MO454	<i>P. praefalciparum</i>	<i>C. nictitans</i>	Prugnolle et al. [2]
GU815512	Louise	<i>P. billcollinsi</i>	Chimpanzee	Kaiser et al. [8]
GQ355478	UGF	<i>P. billcollinsi</i>	Chimpanzee	Krief et al. [26]
GQ355477	UGD	<i>P. billcollinsi</i>	Chimpanzee	Krief et al. [26]
AJ251941	-	<i>P. reichenowi</i>	Chimpanzee	Conway et al. [29]
JX893151	Clone39C	<i>P. gaboni</i>	Chimpanzee	Pacheco et al. [30]
JX893154	Clone20A	<i>P. reichenowi</i>	Chimpanzee	Pacheco et al. [30]

obtained by PhyML (freely available at the ATGC bio-informatics platform [22,23]) using NNI (nearest neighbour interchange) + SPR (sub-tree pruning regrafting) branch swapping and 100 bootstrap replicates [24].

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R [31]. A logistic regression was used to analyse the variations among individuals in the infection status. In these models, the variable to be predicted was the presence/absence of a *Plasmodium* infection. The predictive variables were: (i) the site of collection (random effect); (ii) freshness of the faeces; (iii) host species; and, (iv) average pluviometry during months of collection (fixed effects). For the second predictive variable, faeces were subdivided into two groups: the faecal samples deposited less than 24 hours before collection and those collected after 24 hours. The host species corresponded to gorilla and chimpanzee. Finally, for each month of collection, the average Gabonese pluviometry (estimated from data collected from 1960 to 1990) was retrieved from [32], which data were produced

by the Climatic Research Unit (CRU) of University of East Anglia (UEA). Pluviometry was considered as a possible predictive variable because it is known to influence levels of infection in human foci [33,34].

GeneBank accession numbers published in this study

The sequences reported in this study were deposited in GenBank under the following accession numbers KP875428 to KP875480

Results

Plasmodium species infecting great apes in Gabon

Some 1,261 faecal samples from wild chimpanzees (n = 791) and gorillas (n = 470) from 24 sites were analysed (Figure 1a). Among them, 122 samples of chimpanzees (15.42%) and 100 of gorillas (21.28%) were detected positive to a *Plasmodium* infection by *Cyt-b* PCR. Sequences of quality (of sufficient size (>600 bp) and with a clear chromatogram) were obtained for 31% (n = 69) of the *Cyt-b* amplicons. Among them, sixteen showed multiple peaks and were identified as clear

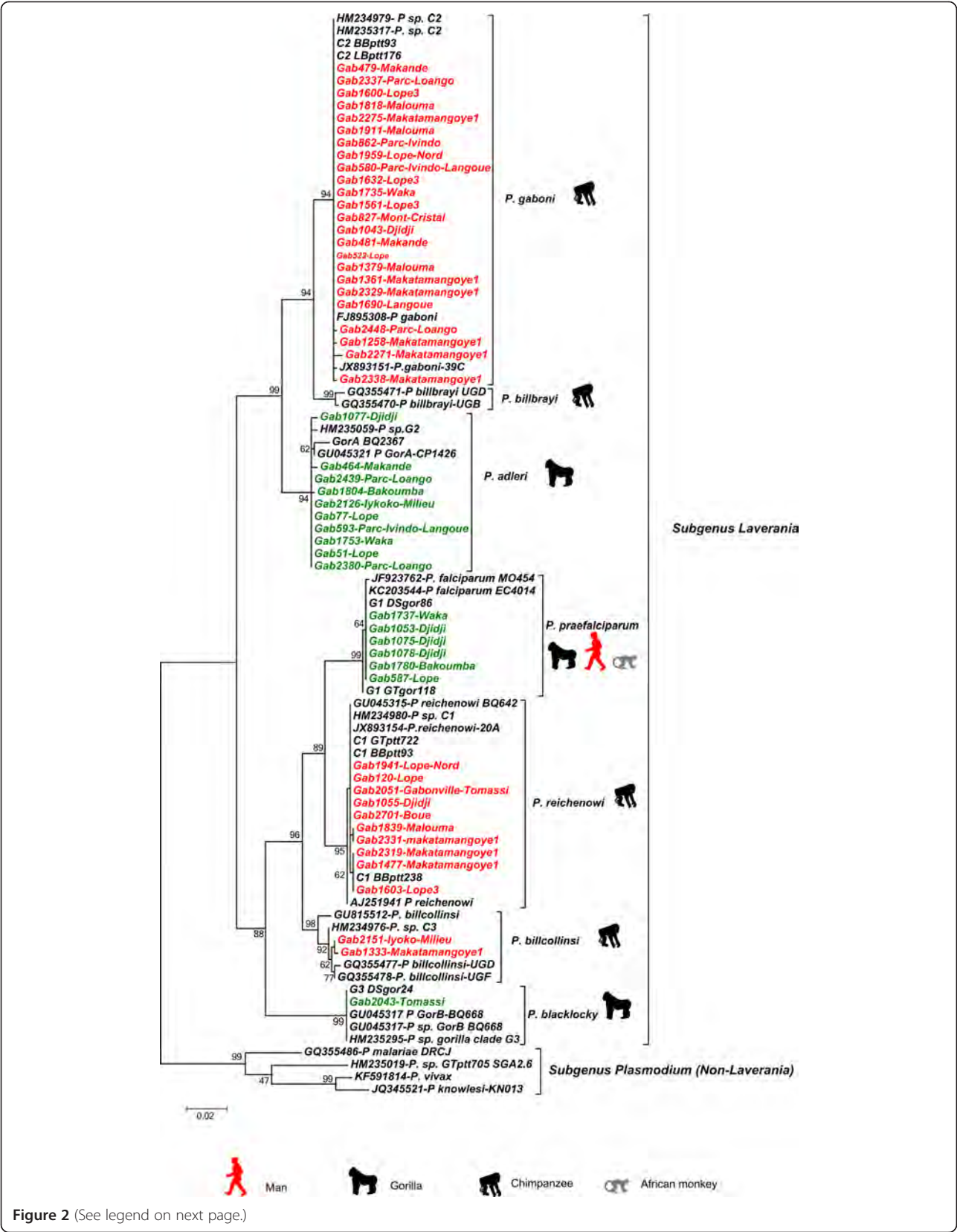


Figure 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 2 Phylogenetic relationships between the Cytochrome *b* sequences obtained in the study and those of known *Plasmodium* species (represented by their accession number). The tree was built based on cytochrome *b* (*cyt-b*) sequences of 686 bp. Red indicates sequences obtained from chimpanzees and green from gorillas. Bootstrap values are given at each node. More details on the different reference sequences can be found in Table 3.

mixed infections by the program MSR. The frequency of mixed infections observed in chimpanzees and gorillas as estimated by the analysis of the chromatograms is given in Table 2. Phylogenetic analyses (Figure 2) revealed the presence of three *Plasmodium* species in chimpanzees (*P. gaboni*, *P. reichenowi* and *P. billcollinsi*) and three in gorillas (*P. praefalciparum*, *P. gorA* and *P. gorB*). Neither species of the subgenus *Plasmodium* (*P. vivax*-like, *P. malariae*-like and *P. ovale*-like) nor new phylogenetic lineages were found in these samples. Relative frequencies of each *Plasmodium* species in each site among positives are given in Figure 1a-c.

Over the entire dataset, logistic regressions revealed that the probability of infection was only significantly dependent on the variable 'freshness of the stool'. Pluviometry as well as host species did not significantly explain the probability of infection (Table 4). As shown in Table 4, the probability of infection was higher in stools collected less than 24 hours after dropping than in the older ones. Overall, freshness of the stools did not significantly differ between chimpanzees and gorillas (p -value = 0.07).

Discussion

In the last few years, several new *Plasmodium* species were discovered in African non-human primates, especially great apes [2,3,6,10,26]. These discoveries were made possible by the development of a non-invasive method allowing detection of *Plasmodium* infections from faecal samples [2,6], despite inherent problems of DNA degradation with this type of biological material. This issue was overcome by the use of mitochondrial sequences to amplify the parasite, which presents several advantages: 1) Mitochondrial DNA is in multiple copy inside parasites (unlike nuclear DNA) and 2) if properly chosen, small portions of the mitochondrial genome (as small as 200 bp), can contain enough phylogenetic information to identify the different *Plasmodium* species.

Table 4 Results of the logistic regression

Variable	P-value	Odds ratio [CI _{95%}]
Host species	0.051390	0.67 [0.503 to 0.905]
Freshness of the faeces	0.006684	2.038[1.458 to 2.849]
Pluviometry	0.581011	0.576 [0.429 to 0.775]

The presence or absence of infection by *Plasmodium* was the variable to be predicted. Predictive variables were: host species, freshness of faeces (<24 or >24 hr) and pluviometry. CI_{95%}: 95% Confidence Interval.

This method is now one of the main methods used to analyse *Plasmodium* from wild non-human primates [2,7,12,25].

In the present study, analyses were performed on a set of 1,261 faecal samples collected all over Gabon from chimpanzees and gorillas. All *Plasmodium* species found belonged to the subgenus *Laverania* and were all previously identified in *Pan troglodytes troglodytes* and *Gorilla gorilla gorilla*, respectively [2,12]. No new phylogenetic lineage or species were identified. Surprisingly, no species of the subgenus *Plasmodium* (*non-Laverania*) were identified either. This is at odds with recent observations made from ape blood samples or infected sylvatic anopheline mosquitoes collected in Gabon showing the circulation of *P. vivax*-like parasites in the area. [13] These results are nevertheless congruent with those from Liu *et al.* [12]. Although they analysed 3,000 ape faecal samples from west and central Africa, they only obtained seven sequences of *Plasmodium* belonging to the subgenus *Plasmodium* (*non-Laverania*).

One main factor could explain why parasites of the subgenus *Plasmodium* were not detected and this is most likely linked to the nature of the primers used to perform PCRs. Indeed, as in the study of Liu *et al.* [12], the primers used were specifically designed to amplify sequences of *Laverania* parasites. As a consequence, several nucleotides of differences separated them from the homologous sequences in *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*, thus very likely reducing the sensitivity of this PCR to detect *non-Laverania* species. In addition, such problem might have been amplified by the presence of co-infections with *Laverania* species. Indeed, it has been demonstrated that in case of co-infection, the PCR tends to favour the amplification of the parasite with the best matching sequence to the primers [35,36]. Recently, Liu *et al.* [14] solved this problem by designing primers specific to *P. vivax*. Out of the 3,000 samples previously analysed and re-analysed with other samples, they finally detected more than 87 *P. vivax* infections.

In this study, no *Laverania* species were found to infect both hosts (gorillas and chimpanzees). This reinforces the hypothesis that *Laverania* lineages infect specific hosts [10], a specificity that could be associated to specific ligand/receptor interactions occurring in the vertebrate host, as suggested by several studies [37], or by ecological factors such as the trophic preferences of the vectors [38] or the fact that gorillas' and chimpanzees' home ranges might not overlap in space and time.

Additional studies would be needed to disentangle these different possibilities.

No human *Plasmodium* species were found. This result is congruent with other studies performed so far on wild populations of apes [8,12,39] thus confirming that, contrarily to what some authors have feared [7,40], great apes do not (and will certainly never) constitute reservoirs of *Plasmodium*, in particular *P. falciparum*, for humans. The fact that their populations are rapidly declining [41,42] is unfortunately another element in support of this prediction. Finally, no evidence of ape-to-human transfers of *Laverania* species was ever recorded despite efforts to find them [37]. The only documented record of this kind of transfer, in a natural context, was for a *P. vivax*-like (non-*Laverania*) parasite [13].

Regarding the prevalence of infections, more than 15% of the chimpanzee and 21% of the gorilla samples were positive to *Plasmodium*. Infections were detected in 17 out of 23 sites for chimpanzees and 16 out of 24 for gorillas. Global rates of infection found in this study are similar to those found by Prugnolle *et al.* [2], Kaiser *et al.* [8], and Liu *et al.* [12] in other areas. As previously discussed [2,12], it is very likely that the accurate rates of infection are higher, because the detection of *Plasmodium* in this kind of biological material (faecal) is expected to be less sensitive than in blood, as it is the case for urine and saliva [12,43,44], due to sample degradation or repeated sampling (faecal samples from the same individual may have been collected several times). The effect of sample degradation (and hence DNA degradation) is evident here when comparing the rates of infection detected in the faeces that were collected before and after 24 hours post excretion. The freshest (and so the less degraded) faecal samples significantly present more *Plasmodium* infections than the other ones (odds ratio = 2.038).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LB, BO, FP, VB, VR, APO, FL, AN, GL, PM, and CP contributed to the acquisition of samples in fieldwork; LB, BO, FP, APO, NDM, BMO, LMDL, LYM, CA, EE, PD, CTB, PM, GL, CP, and FR analysed and interpreted the data; LB, BO, CTB, FR, and FP conducted and supervised this work; LB, BO, FP, and FR wrote this paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Authors thank the three reviewers for their constructive comments. The study was funded by Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF, Gabon), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France) and Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant ORIGIN JCJC 012). We thank all the persons that were involved in the sampling as well as the Gabonese national agency of the national parks (authorization of collection: N° AE13009/PR/ANPN/SE/CS/AEPN). We also thank Bouanga Miriame for her help.

Author details

¹Centre International de Recherche Médicale de Franceville, BP 769, Franceville-Gabon, Gabon. ²MIVEGEC (Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), UMR CNRS 5290 / IRD 224, Université Montpellier 1, Montpellier, France. ³Laboratoire d'Ecologie et Biologie évolutive, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar BP5005, Sénégal. ⁴TransVIHMI (Recherche Translationnelle sur le VIH et les Maladies Infectieuses), UMI 233, Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Université Montpellier 1, Montpellier, France.

Received: 20 November 2014 Accepted: 22 February 2015

Published online: 14 March 2015

References

- WHO. World malaria report 2013. Geneva: World Health Organization; 2014. p. 178.
- Prugnolle F, Ollomo B, Durand P, Yalcindag E, Arnathau C, Elguero E, et al. African monkeys are infected by *Plasmodium falciparum* nonhuman primate-specific strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:11948–53.
- Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, et al. The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14902–7.
- Jeffares DC, Pain A, Berry A, Cox AV, Stalker J, Ingle CE, et al. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2007;39:120–5.
- Rich SM, Ayala FJ. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6994–7001.
- Prugnolle F, Ayala F, Ollomo B, Arnathau C, Durand P, Renaud F. *Plasmodium falciparum* is not as lonely as previously considered. *Virulence*. 2011;2:71–6.
- Duval L, Fourment M, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM, et al. African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the *Laverania* subgenus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:10561–6.
- Kaiser M, Lowa A, Ulrich M, Ellerbrok H, Goffe AS, Blasse A, et al. Wild chimpanzees infected with 5 *Plasmodium* species. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1956–9.
- Snounou G, Escalante A, Kasenene J, Renia L, Gruner AC, Krief S. [Malaria in hominids] (in French). *Bull Acad Natl Med*. 2011;195:1945–54.
- Rayner JC, Liu W, Peeters M, Sharp PM, Hahn BH. A plethora of *Plasmodium* species in wild apes: a source of human infection? *Trends Parasitol*. 2011;27:222–9.
- Ollomo B, Durand P, Prugnolle F, Douzery E, Arnathau C, Nkoghe D, et al. A new malaria agent in African hominids. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000446.
- Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010;467:420–5.
- Prugnolle F, Rougeron V, Becquart P, Berry A, Makanga B, Rahola N, et al. Diversity, host switching and evolution of *Plasmodium vivax* infecting African great apes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:8123–8.
- Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, et al. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nat Commun*. 2014;5:3346.
- Santiago ML, Lukasik M, Kamenya S, Li Y, Bibollet-Ruche F, Bailes E, et al. Foci of endemic simian immunodeficiency virus infection in wild-living eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *J Virol*. 2003;77:7545–62.
- Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercopithecus atys atys*) from the Tai Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol*. 2005;79:12515–27.
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*. 2006;313:523–6.
- Eurofine ME. [www.eurofinsgenomics.com]
- Chang CT, Tsai CN, Tang CY, Chen CH, Lian JH, Hu CY, et al. Mixed sequence reader: a program for analyzing DNA sequences with heterozygous base calling. *Sci World J*. 2012;2012:365104.
- Hall T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:4598.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14:817–8.

22. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:465–9.
23. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003;52:696–704.
24. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59:307–21.
25. Sundararaman SA, Liu W, Keele BF, Learn GH, Bittinger K, Mouacha F, et al. *Plasmodium falciparum*-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:7020–5.
26. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, Andre C, Halbwax M, et al. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000765.
27. Duval L, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh Mba SA, Houze S, Fourment M, et al. Chimpanzee malaria parasites related to *Plasmodium ovale* in Africa. *PLoS One.* 2009;4:e5520.
28. Joveen-Neoh WF, Chong KL, Wong CM, Lau TY. Incidence of malaria in the interior division of sabah, malaysian borneo, based on nested PCR. *J Parasitol Res.* 2011;2011:104284.
29. Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BM, Baloch AH, Somanath SD, et al. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;111:163–71.
30. Pacheco MA, Cranfield M, Cameron K, Escalante AA. Malarial parasite diversity in chimpanzees: the value of comparative approaches to ascertain the evolution of *Plasmodium falciparum* antigens. *Malar J.* 2013;12:328.
31. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2008. URL: <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
32. Group WB. Climate change Knowledge Portal: Average Monthly Rainfall 1901 to 2009 of Gabon. [www.worldbank.org/contry/gabon]. 2014.
33. Robert V, Dieng H, Lochouran L, Traore SF, Trape JF, Simondon F, et al. [Malaria transmission in the rural zone of Niakhar, Senegal](in French). *Trop Med Int Health.* 1998;3:667–77.
34. Ouldabdallahi M, Ouldbezeid M, Diop C, Dem E, Lassana K. [Epidemiology of human schistosomiasis in Mauritania. The right bank of the Senegal River as model](in French). *Bull Soc Pathol Exot.* 2010;103:317–22.
35. Valkunas G, Palinauskas V, Ilgunas M, Bukauskaite D, Dimitrov D, Bernotiene R, et al. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (*Haemosporida*), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. *Parasitol Res.* 2014;113:2251–63.
36. Zehindjiev P, Krizanauskiene A, Bensch S, Palinauskas V, Asghar M, Dimitrov D, et al. A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction-based protocols for amplification of the cytochrome B gene. *J Parasitol.* 2012;98:657–65.
37. Wanaguru M, Liu W, Hahn BH, Rayner JC, Wright GJ. RH5-Basigin interaction plays a major role in the host tropism of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:20735–40.
38. Paupy C, Makanga B, Ollomo B, Rahola N, Durand P, Magnus J, et al. *Anopheles moucheti* and *Anopheles vinckei* are candidate vectors of ape *Plasmodium* parasites, including *Plasmodium praefalciparum* in Gabon. *PLoS One.* 2013;8:e57294.
39. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1458–63.
40. Duval L, Arieu F. Ape *Plasmodium* parasites as a source of human outbreaks. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:528–32.
41. Prado-Martinez J, Sudmant PH, Kidd JM, Li H, Kelley JL, Lorente-Galdos B, et al. Great ape genetic diversity and population history. *Nature.* 2013;499:471–5.
42. Campbell G, Kuehl H, N'Goran Kouame P, Boesch C. Alarming decline of West African chimpanzees in Cote d'Ivoire. *Curr Biol.* 2008;18:R903–4.
43. Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, et al. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. *J Infect Dis.* 2009;199:1567–74.
44. Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malar J.* 2006;5:103.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

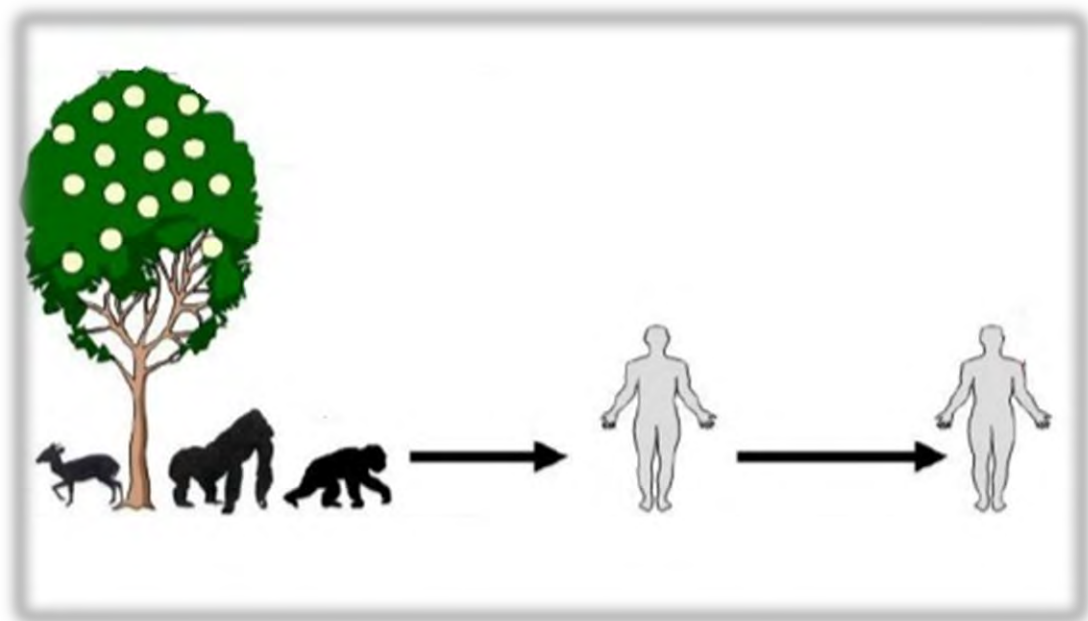
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Chapitre 2

Transferts inter-espèces entre primates non humains et Homme



Résumé

Contexte et objectifs

Dans le sous-genre *Laverania*, quatre espèces sont maintenant reconnues pour infecter les chimpanzés (*P. reichenowi*, *P. billcollinsi*, *P. gaboni* et *P. billbrayi*) et trois pour les gorilles (*P. praefalciparum*, *P. blacklocki* et *P. adleri*). Des études réalisées à ce jour sur les populations naturelles de singes ont montré qu'aucune espèce des *Laveranias* n'infecte les deux hôtes, suggérant l'existence d'une spécificité d'hôte forte pour ce groupe de parasites. Cependant, d'autres études ont montré que des transferts entre différentes espèces hôtes sont possibles lorsque celles-ci vivent à proximité. Afin, de vérifier l'hypothèse selon laquelle, la cohabitation sur un même site de plusieurs espèces hôtes pourrait favoriser le franchissement de la barrière d'hôte par les parasites, nous avons collecté et analysé 794 échantillons de sang (PNH et des hommes travaillant à proximité et en permanence avec les animaux) dans deux sanctuaires (PPG et LEK) et un centre de primatologie au Gabon (CDP).

Résultats

Les pourcentages d'infection trouvés dans cette étude sont de 33,11% pour les chimpanzés ; 63,64% pour les gorilles ; 17,68% pour les hommes et 0,56% pour les petits singes. Environ 11% des parasites ont été trouvés chez des hôtes inattendus (nous observons des transferts de parasites entre gorilles et chimpanzés, des hommes vers les chimpanzés et des hommes vers les mandrills). Par contre, les autres 89% des associations hôte/parasite trouvées étaient cohérentes avec les observations faites *in natura*.

Conclusions

Nos résultats sont en accord avec ceux de Kriefs et *al.* (2010) et Duval et *al.* (2010), qui montrent que les transferts sont en effet possible lorsque plusieurs espèces hôtes vivent à proximité dans des milieux confinés de type sanctuaire. *P. falciparum* est aussi capable d'infecter les mandrills. Les *Plasmodium spp* du sous-genre *Laverania* de gorilles sont capables d'infecter les chimpanzés et vice versa dans les milieux confinés. Aucune lignée simienne n'a été trouvée chez les soigneurs.

Les résultats suggèrent l'existence de vecteurs qui joueraient le rôle de pont entre les hommes et PNH et que les barrières génétiques à l'origine de la spécificité observée *in natura* ne sont pas totalement imperméable. Ces échanges de pathogènes pourraient avoir des conséquences tant sur la santé des animaux que sur celle des Hommes.

Mots clefs : Homme, grands singes, Spécificité d'hôte, *Laverania*, facteurs, sanctuaires

Article-2

Ape malaria host specificity can be broken in confined environments

Ape malaria host specificity can be broken in confined environments

Ngoubangoye Barthélémy^{1,4†}, **Boundenga Larson**^{2,5†}, Celine Arnathau³, Illich Manfred Mombo^{3,7}, Patrick Durand³, Thierry-Audrey Tsoumbou¹, Bertony Vacky Otoro¹, Rick Sana¹, Alain-Prince Okouga², Nancy Moukodoum², Anaïs Herbert¹, David Fouchet⁴, Virginie Rougeron^{2,3}, Cheikh Tidiane Bâ⁵, Benjamin Ollomo², Christophe Paupy³, Eric Leroy⁷, François Renaud³, Dominique Pontier^{4,5}, Franck Prugnolle^{2,3}

¹Centre de Primatologie, CIRMF, B.P. 769, Franceville, GABON

²Unité de Biodiversité, Écologie et Évolution des Parasites, CIRMF, B.P. 769, Franceville, GABON

³Laboratoire MIVEGEC; UM1-CNRS 5290-IRD 224, IRD Montpellier, France

⁴Laboratoire de Biometrie et Biologie Evolutive, UMR5558, Université Lyon 1

⁵Laboratoire d'Écologie et Biologie évolutive, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP5005, Sénégal

⁶LabEx ECOFECT, Ecoevolutionary Dynamics of infectious Diseases, University of Lyon, Lyon, France.

⁷Département de Zoonose et maladies émergentes, CIRMF, B.P. 769, Franceville, GABON.

†Equal contributors

Corresponding authors:

Barthélémy Ngoubangoye: genistha@hotmail.com

Larson Boundenga: larsonamedeo@yahoo.fr

Abstract

Recent studies have revealed a large diversity of *Plasmodium* among African great apes, some related to *Plasmodium falciparum*, the most virulent agent of human malaria (subgenus *Laverania*), others to *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium vivax* (subgenus *Plasmodium*), three other human malaria agents. *Laverania* parasites exhibit strict host specificity in their natural environment. *P. reichenowi*, *P. billcollinsi* and *P. gaboni* infect only chimpanzees. *P. praefalciparum*, *P. blacklocki* and *P. adleri* are restricted to gorillas and *P. falciparum* is pandemic in humans. This specificity is due to genetic or environmental factors. Sanctuaries and primatology centers are places where there is a concentration of several host species, which could promote exchanges of pathogens. Using molecular tools, we analyzed samples of non-human primates and humans working in different primate sanctuaries or health centers of Gabon, with the aim to evaluate the risk of *Plasmodium* transfers between different host species. Our study demonstrates, for the first time, that the genetic barrier that determines the apparent host specificity of *Laverania* is not completely impermeable, and that exchanges of parasites between gorillas and chimpanzees are possible in confined environments. We also show that humans can transmit *P. falciparum* to chimpanzees and mandrills. No simian *Plasmodium* was found in the humans working at proximity of the primates.

Keys words Human, Great apes, *Laverania* subgenus, Host specificity, Genetic Barrier, Ecological factors, Gabon

Introduction

Malaria is a mosquito-borne epidemic human disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. Among the five parasites known to infect humans (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*), *P. falciparum* is by far the most virulent, responsible every year for approximately 198 million clinical cases and 580 000 deaths worldwide (1).

In our closest relatives, the African apes (gorillas and chimpanzees), a large diversity of *Plasmodium* parasites has been documented, some parasites being related to *P. falciparum* (subgenus *Laverania*), others to *P. malariae*, *P. ovale* or *P. vivax* (subgenus *Plasmodium*) (2-5). In the subgenus *Laverania*, four species are now recognized to infect chimpanzees: *P. reichenowi*, *P. billcollinsi*, *P. gaboni* and *P. billbrayi* (6-8) and three to infect gorillas: *P. praefalciparum* (the closest relative of *P. falciparum*), *P. blacklocki* and *P. adleri* (2, 5-7).

Studies realized so far on natural populations of apes (based on the analysis of fecal samples) have shown that no *Plasmodium* species from the *Laverania* subgenus is able to infect both hosts (gorillas and chimpanzees), thus suggesting the existence of a strong host specificity for this group of parasites (3, 9, 10). This host specificity could be due to incompatibilities at the parasite-host interface, as suggested by certain authors (7) and thus be due to genetic barriers. However, the discovery of *P. falciparum* parasites circulating in bonobos and chimpanzees of sanctuaries (11-13) but also of a *P. praefalciparum* (normally found in gorillas) in a small monkey (*Cercopithecus nictitans*) (14), raises question about the strength of this host specificity and so of the genetic barrier. Is the barrier really impermeable? What is the capacity of these parasites to switch from one host to another?

Transfers of parasites from one host species to another requires several elements: (i) a contact of the recipient host with the new infectious agent, (ii) the transmission from the donor host species toward the recipient host. In the case of *Plasmodium* species, this step requires the intervention of a mediating host which is a mosquito vector; and (iii) finally, the passage of the species barrier. In case of the existence of a barrier due to some specific ligand /receptor interactions, passage will be possible if and only if a mutation occurs on the parasite's protein or on the new host receptor allowing the binding of the two proteins and hence the invasion of the host's cells. .

In natura, conditions required for transfers may not be fulfilled very frequently. This leads us to wonder if these transfers would not be more frequent in particular environmental conditions like when the different host species are forced to live at proximity. Our hypothesis

is that the grouping, on same sites like sanctuaries or primate health centers, of various host species, could favour the crossing of host barrier by *Plasmodium* parasites by forcing contact between different host species.

In several African Countries, governments and organizations of animal protection have installed sanctuaries and primate health centers of non-human primate orphans especially great apes. In these sanctuaries, several primate species may cohabit. Most generally, these are humans with non-human primates thus possibly favoring the transfer of *Plasmodium* parasites between these host species but sometimes several other species are also present.

In the present paper, we present the results of a follow-up of *Plasmodium* infections in several non-human primate (NHPs) species and humans living or working at proximity in two Gabonese sanctuaries and in one primate health center of Gabon (Central Africa). Thanks to this follow-up, we documented that inter-species transfers are not rare and may occur between several primate host species. Our work demonstrates that sanctuaries and primate health centers may favor transfers and so the emergence of new infectious diseases for humans or animals.

Materials and Methods

Study sites

Follow ups of *Plasmodium* infections in different host species were performed in three sites in Gabon: the Park of “La Lékédi” (LEK), the “Gorilla Protection Project” (GPP) and the Primatology Center (Centre de Primatologie, CDP) of the Centre International de Recherches Médicales de Franceville, CIRMF. All sites are located in the province of Haut-Ogooue in the East of Gabon.

The park of “La Lékédi” is located in the southeast of Haut-Ogooue, about 100 km from Franceville. The park is 20 km long and 7 km wide and occupies 14,000 hectares. It is completely enclosed. The natural vegetation in this park is constituted by primary, secondary forests and savannas. The Park is divided into three modules, among which the activity of occupation and the management are different. This park is one possible place of reception of great apes, chimpanzees and gorillas seized by the Waters and Forests Ministry to private individuals during anti-poaching operations. In the park, young orphans are gradually rehabilitated to the life in forest. It is also frequented by tourists who come to visit the park. This park contains two groups of chimpanzees and one group of gorillas. This study

considered exclusively two groups. First of all, one orphan group of chimpanzees which count 15 young chimpanzees and secondly a group of gorillas which counted only two young lowland gorillas. A team of seven persons takes care of the animals to feed them and monitor them during day until 5 pm. In this park, great apes were sampled during 4 years during routine sanitary control and keepers were sampled two consecutive years. All keepers were informed of the aim of the project and signed an informed consent. Details of sampling are given in Table 1.

The Gorilla Protection Project (GPP) is a project that was launched in 1997 which aim is to reintroduce gorillas from European zoos in their natural habitat. In Gabon, the site chosen for reintroduction is located in the “Batéké Plateaux”. In this region, the vegetation is a mosaic of grassland and shrubby savannas, interspersed with humid gallery forests. The sanctuary includes two groups of gorillas composed, respectively, by 4 and 13 individuals. Individuals of the second group were released in the forest. For our study, we focused on the first group. Studied gorillas are four young gorillas that are progressively re-habituated to a wild life. This program involves 9 persons who work in close contact with the animals. Blood samples were collected on six persons (2013) and eight persons (2014) for this study.

CDP is located in the city of Franceville. This primate center has more than 350 NHPs belonging to ten species among which 55 chimpanzees, 4 gorillas (one is dead in 2011) and 250 mandrills. Other NHPs are African and Asian monkeys (Supplementary Table 1). The CDP counts a team of 22 persons who take care of the animals, feed and monitor them during day until 5 pm. CDP is located in an anthropized environment, the first habitations being situated at less than 300m. More details are given in (15). In the CDP, blood samples from gorillas, chimpanzees and humans were systematically studied between 2012 and 2014. Some samples coming from an existing biobanks, collected from 2005 to 2011 were also analyzed (Table 1 for details).

In each site, for humans, blood samples were collected by the CIRMF medical team with a voluntary participation of workers in agreement with the recommendations of the Gabonese National Ethics Committee (Authorization N°PROT/0020/2013I /SG/CNE). For NHPs, blood samples were taken during sanitary controls each year, for a follow-up of the health of primates of sanctuaries. The criteria of animal well-being are guaranteed by the CDP vets who proceeded to the sampling of blood. 7ml of blood were collected within EDTA tube for humans and 2 to 7 ml of blood for animals according to their weight. Tubes were then preserved in an icebox and transported to laboratories, where samples were conserved at -20°C.

Extraction of DNA and PCR

DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Courteboeuf, France) as previously described (8) and *Plasmodium* infections were determined after amplification of a portion of *Plasmodium* mitochondrial genome (*cytochrome b: cyt-b*) as described in Prugnolle *et al.*(2). To confirm the species origin of samples, a region of the DNAm genome (D loop) was amplified as previously described (5, 16) by using primers L15997 (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3') and H16498 (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3') (16). All amplified products (10 µl) were run on 1.5% agarose gels in TAE buffer. The PCR-amplified products were used as templates for sequencing. DNA sequencing was performed by Eurofin MWG (France).

Procedures for contamination avoidance

All molecular analyzes (extraction, PCR) were repeated and verified in three separate laboratories at the CIRMF, among which two of them never manipulated *Plasmodium* DNA. In each laboratory, molecular analyses were performed by a distinct experimenter. Identical results were obtained by all experimenters.

Phylogenetic analyses

To examine the relationship of the *cyt-b* sequences obtained with the different *Plasmodium* species known so far, we constructed a phylogenetic tree using a set of reference sequences belonging to different *Plasmodium* species. All analyses were done as described in (2, 5).

Microscopic analyses and parasitemia estimates

To determine the various parasitic forms and parasitaemia in the infected animals, microscopic analyses were performed. The microscopic analysis was done by thick smear and thin blood smear after preparation with kit-rall according to the manufacturer's instructions. For NHPs infected with *Plasmodium* species, we observed microscopically the different parasite forms using thin smears (Figure 2) and parasitaemias (number of parasite per microliter) were estimated using thick smears. We estimated the parasitaemias of different animals as described in (17).

Results

Blood samples from humans (n=85) and NHPs (mandrills, gorillas chimpanzees and others Monkeys) (n=709) from three sites were analyzed. In the park of La Lékédi, 74.6% (47/63) of the samples from chimpanzees were infected with *Plasmodium*, 100% (9/9) of the gorilla and 14.29% (5/35) of the human ones. In the PPG, 50% (2/4) of the gorilla samples were infected and 21.43% (3/14) of the human ones. Finally, in the CDP, 3.4% (3/88) of the chimpanzee blood samples were infected, 33.33% (3/9) of the gorilla and 19.44% (7/36) of the human ones. For the monkeys, this was 0.56% (3/536) of the collected samples that were positive. Table 2 shows the different infection rates by species. Global rates of infection found in this study were 31.78% for chimpanzees, 72.72% for gorillas, 17.64% for humans, 0.47% for mandrill and 0.86% for other monkeys.

Most host/parasite associations found during the survey were coherent with observations made *in natura*. Thus, most chimpanzees were infected either with *P. gaboni* or *P. reichenowi*, gorillas with *P. adleri*, *P. praefalciparum* or *P. blacklocki* and humans with *P. falciparum*. *P. vivax*-like and *P. malariae*-like parasites were also found in chimpanzees and gorillas (Figure 1 supplementary data and Table 3). Nevertheless, ~ 11% of the parasites were found in unexpected hosts (we will hereafter refer to these infections as Unexpected Infections - UI) (Table 2). Thus, we found: (i) three *P. falciparum* in three chimpanzees (LEK and CDP) and one in a mandrill (CDP); (ii) One *P. praefalciparum* in a chimpanzee (LEK); (iii) One *P. reichenowi* in a gorilla (CDP), (iiii) three *P. adleri* in three chimpanzees (Figure 2). All unexpected infections (UI) were confirmed at least three times by three different experimenters, in three different laboratories, thus excluding possible contaminations during manipulations. For all these unexpected infections, the host was also confirmed using molecular tools as described in the section material and methods.

Our study reveals therefore at least three transfers of *Plasmodium* from humans toward chimpanzees and one to mandrills, four transfers from gorillas toward chimpanzees and one from chimpanzees to gorillas (Figure 1). No simian *Plasmodium* was observed in humans.

We analyzed thin blood smears in search of the different forms of parasites in these Unexpected infections (UI). The aim was to determine whether these unexpected infections (UI) could develop properly in the unexpected host. These analyses revealed the presence of different parasitic forms among which some mature forms like schizont and gametocytes

(Figure1). The microscopic analysis also revealed parasitaemias of the UI similar to the ones found in expected hosts (Table 3). Thus, in the UI parasitaemias varied between 400 and 1919 p/μl for chimpanzees, between 754.6 and 1891 p/μl for gorillas and the mandrill has a parasitaemia of 1401.78 p/μl.

Discussion

In the last few years, several new *Plasmodium* species belonging to the subgenus *Laverania* were discovered in African non-human primates especially great apes (2, 4, 7, 11, 18). Until today, no species of this group has been found to infect both hosts (gorillas and chimpanzees) *in natura* (3, 5, 7), thus suggesting the existence of genetic barriers precluding the passage from one host to another (7, 10).

Several previous studies have shown however that the barrier was not completely impermeable as infections of apes (bonobos and chimpanzees) with *P. falciparum* were observed in areas where humans and apes lived in close proximity (sanctuaries) (11-13).

We hypothesized that this is the proximity of the different host species that increases the likelihood of transfers. In our study, we specifically analyzed *Plasmodium* infections in humans and NHPs living at proximity in sanctuaries or primatology centers in Gabon. Our results confirm those of Krief et al. (11), Duval et al (12) and Pacheco et al.(13), showing that transfers are indeed possible when different host species live at proximity. The novelty of our results resides in the spectrum of hosts and parasites involved in these transfers. Thus, while previous studies on *Laveranias* have only documented transfers of *P. falciparum* from humans to bonobos or chimpanzees, we here also demonstrate the possibility of transfers from humans to chimpanzees and mandrills, from gorillas to chimpanzees and from chimpanzees to gorillas.

Our results, in addition to the previous ones, suggest therefore that in conditions where several host species are forced to live at proximity, transfers of parasites are possible. This suggests therefore that: (i) some mosquito species are able to do the bridge between several host species even in strongly anthropogenized environments (like in CIRMF, Franceville) and that (ii) the genetic barrier responsible for host specificity is not fully impermeable.

Mosquitoes as bridge vectors

In our study, inter-species transfers were documented in two very distinct environments. Some occurred in sanctuaries where animals live in natural forest environments like in the Park of La Lékédi (where wild gorillas and chimpanzees naturally live) and some occurred in strongly anthropogenized environments like in the CDP located in the city of Franceville. In these two environments, the communities of anopheles to which the animals are confronted are likely very different.

In forest areas, only little information is available on the potential vectors of ape *Plasmodium* (19) and more generally on the anopheline species that may feed on great apes. Up to date, only two anopheline species were found to be infected with ape *Plasmodium* in the forests of Gabon (19). One species is *Anopheles vinckei*, the other is *Anopheles moucheti*. *An. moucheti* is considered to be mainly anthropophilic in anthropogenized forest environments (i.e., villages) where it is a major human malaria vector (20). However, very little is known about its propensity to bite animals (and particularly non-human primates) because previous studies focused mainly on humans in rural and urban environments and never in sylvan environments where wildlife represents the main blood-source. *An. moucheti* might actually be a zoo-anthropophilic vector that can readily operate *Plasmodium* transfers between apes and humans. Conversely, the role of sylvan *Anopheles* species, such as the strictly zoophilic *An. vinckei*, is probably restricted to the transmission of *Plasmodium* among apes.

In an anthropogenized context, the CDP, the main vector of human malaria, *Anopheles gambiae*, was previously found in the primate center and in a nearby populated area of Franceville. Other species like *An. funestus*, *An. nili* and *An. moucheti* are also known to be involved in malaria transmission in suburban areas in Central Africa (20-22). Again, *An. moucheti*, which has been shown to be either anthropophilic or zoophilic depending on the context, might be a good candidate involved in the transfers among species in this primate Center.

A permeable genetic barrier

Invasion of red blood cells by *Plasmodium* parasites depends on a partially redundant set of parasite ligands and erythrocyte receptors. In *P. falciparum*, a number of important erythrocyte binding ligands occur in two families (23), the erythrocyte binding-like (EBL) molecules (the erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175), EBA-140 (also known as

BAEBL), EBA-181 (or JESEBL) and EBL-1 (24-26) and the reticulocyte binding-like (RBL) molecules that include five proteins of the rhoptries (RH) (PfRH1 (PfNBP1), PfRH2a, PfRH2b, PfRH4 and PfRH5) (27-29). Each of these ligands interacts with specific receptors at the surface of the red blood cell. For instance, for PfRH5, the receptor is the Basigin (BSG) and for EBA 175, the receptor is the Glycophorin A (30, 31). Recent studies have suggested that the strong host specificity observed in the *Laveranias* in their natural environments could be the consequence of species-specific differences in the interaction between RH5 and Basigin (BSG) (10). Thus, it was shown that *P. falciparum* RH5 bound chimpanzee BSG with a significantly lower affinity than human BSG and did not bind gorilla BSG, mirroring the known host tropism of *P. falciparum* (10). Further studies demonstrated that only several residues on the BSG were responsible for the species-specificity of PfRH5 binding or that specific mutations on the PfRH5 sequences could modify its ability to infect red blood cells from other host species than humans (e.g. *Aotus* monkeys or rats) (27).

The existence of polymorphisms (more or less rare) within the population of ape *Plasmodium* on RH5 or in the apes on the Basigin at positions affecting their binding affinity is therefore a possible explanation for the existence of transfers among host species. Further molecular studies analyzing the nature of the RH5 protein or of the Basigin in the Unexpected Infections and compare them to the expected infections should reveal the nucleotide positions likely involved in such transfers.

Transfers from NPHs to Humans and vice versa

In our study, we did not observe any transfer of simian *Plasmodium* to humans. Why this absence of transfers of *Plasmodium* from NPHs to humans? Several hypotheses could be proposed. First of all, over the entire study, the sampling size for humans (n= 85) was far lower as for the NPHs (n = 709), which may have limited our ability to detect events that are rare. In addition, our study presents a limit related to the fact that the studied humans do not sleep on the same site as the animals, thus highly reducing the probability of transfer, as anopheles vectors have a nocturnal activity.

Transfers from humans to NHPs were nevertheless observed. This may seem paradoxical in light of what was previously said on the fact that human workers analyzed in our study do not sleep on site. If this is the case, then why transfers would be possible from humans to primates and not the other way around? In fact, transfers from Humans to NPHs

were only observed at the CDP, in Franceville. In this site, although workers do not sleep on site, human habitations are located less than 300 m, which may have favor the transmission of malaria parasites from humans to primates.

Are the Unexpected Infections viable? Can they be transmitted?

One obvious question that comes to mind following the observation of such transfers is obviously whether these Unexpected Infections are viable and if they can be transmitted from one unexpected host to another host. Average parasitemias observed in the UI were equivalent to the ones measured in the expected infections, thus suggesting that the development of the parasite is not restrained within the new host. In addition, the observation of the thin blood smears of the different UI indicated that the infection developed properly in the new host as several mature forms were observed (schizonts) and for at least one of them could potentially be transmitted as we observed some gametocytes.

Implications for conservation

Conservation is a process that aims to promote the preservation of animal species. However, as highlighted by our study, the development of sanctuaries might not be without consequences on the health of humans and animals in particular great apes. Our study brings new evidence of pathogen transfers between humans and animals. However, the ability of pathogens to cross the host barrier is not new. Indeed, studies made on habituated groups of apes have already shown the risk of transmission of infectious diseases from humans to apes (32). These studies revealed the death of many African apes whose causative agent associated with these illnesses was of human origin (32-34).

Even if, the role of humans as source of pathogens for great apes is not well established (35), it is nevertheless a threat for their health. In the case of *Plasmodium*, in light of all the data on transmission of *P. falciparum* to NHPs, it seems that transmission is more frequent in the sense of humans to apes (11-13) than the opposite (36). We believe that the *P. falciparum* propensity to infect a new host is due to its high genetic variability (37). Question is what could be the consequences of such host switches on the conservation of great apes? Recently, we demonstrated that apes may suffer from malaria (17) and the hypothesis that these transfers could also have consequences on their health must not be excluded.

Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Authors' contributions

BN, LB, BVO, FP, APO, NDM, APO, TAT, and AH contributed to the acquisition of samples in field work; LB, BN, BVO, APO, NDM, RS, CA, ELM, DF and FP analysed and interpreted the data; FR, DP, CTB, and FP conducted and supervised this work; LB and BN wrote this paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The study was funded by Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF, Gabon), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France) and Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant ORIGIN JCJC 012). We thank all the persons (CDP, PPG and Bakoumba team for technical assistance) that were involved in the sampling as well as the Gabonese national agency of the national parks (authorization of sampling: N°0020CNE/SG/P).

References

1. WHO. World malaria report 2013. Geneva World Health Organization. 2014:198.
2. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Jan 26;107(4):1458-63.
3. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010 Sep 23;467(7314):420-5.
4. Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, et al. The origin of malignant malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Sep 1;106(35):14902-7.
5. Boundenga L, Ollomo B, Rougeron V, Mouele LY, Mve-Ondo B, Delicat-Loembet LM, et al. Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon. *Malaria journal*. 2015;14(1):111.
6. Snounou G, Escalante A, Kasenene J, Renia L, Gruner AC, Krief S. Malaria in hominids; 2011.

7. Rayner JC, Liu W, Peeters M, Sharp PM, Hahn BH. A plethora of Plasmodium species in wild apes: a source of human infection? Trends in parasitology. 2011 May;27(5):222-9.
8. Ollomo B, Durand P, Prugnolle F, Douzery E, Arnathau C, Nkoghe D, et al. A new malaria agent in African hominids. PLoS pathogens. 2009 May;5(5):e1000446.
9. Duval L, Arieu F. Ape Plasmodium parasites as a source of human outbreaks. Clinical Microbiology & Infection. 2012;18(6):528-32.
10. Wanaguru M, Liu W, Hahn BH, Rayner JC, Wright GJ. RH5-Basigin interaction plays a major role in the host tropism of Plasmodium falciparum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013 Dec 17;110(51):20735-40.
11. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, Andre C, Halbwax M, et al. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of Plasmodium falciparum from Bonobos. PLoS pathogens. 2010 Feb;6(2):e1000765.
12. Duval L, Fourment M, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM, et al. African apes as reservoirs of Plasmodium falciparum and the origin and diversification of the Laverania subgenus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010 Jun 8;107(23):10561-6.
13. Pacheco MA, Cranfield M, Cameron K, Escalante AA. Malarial parasite diversity in chimpanzees: the value of comparative approaches to ascertain the evolution of Plasmodium falciparum antigens. Malaria journal. 2013;12:328.
14. Prugnolle F, Ollomo B, Durand P, Yalcindag E, Arnathau C, Elguero E, et al. African monkeys are infected by Plasmodium falciparum nonhuman primate-specific strains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011 Jul 19;108(29):11948-53.
15. CIRMF. Le departement de primatologie [www.cirmf.org]. 2015.
16. Santiago ML, Lukasik M, Kamenya S, Li Y, Bibollet-Ruche F, Bailes E, et al. Foci of Endemic Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Eastern Chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii). Journal of virology. 2003 Jul;77(13):7545-62.
17. Herbert A, Boundenga L, Meyer A, Moukodoum DN, Okouga AP, Arnathau C, et al. Malaria-like symptoms associated with a natural Plasmodium reichenowi infection in a chimpanzee. Malaria journal. 2015 May 28;14(1):220.
18. Duval L. Plasmodium chez les grands singes africains¹. Revue de primatologie. 2012.
19. Paupy C, Makanga B, Ollomo B, Rahola N, Durand P, Magnus J, et al. Anopheles moucheti and Anopheles vinckei are candidate vectors of ape Plasmodium parasites, including Plasmodium praefalciparum in Gabon. PloS one. 2013;8(2):e57294.

20. Ollomo B, Karch S, Bureau P, Elissa N, Georges AJ, Millet P. Lack of malaria parasite transmission between apes and humans in Gabon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997 Apr;56(4):440-5.
21. Elissa N, Karch S, Bureau P, Ollomo B, Lawoko M, Yangari P, et al. Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooue, Gabon. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999 Mar;15(1):15-23.
22. Ndo C, Simard F, Kengne P, Awono-Ambene P, Morlais I, Sharakhov I, et al. Cryptic genetic diversity within the *Anopheles nili* group of malaria vectors in the equatorial forest area of Cameroon (Central Africa). *PloS one*. 2013;8(3):e58862.
23. Jaśkiewicz E, Graczyk J, Rydzak J. [Proteins involved in invasion of human red blood cells by malaria parasites]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2009;64:617-26.
24. Mayer DCG, Mu JB, Kaneko O, Duan J, Su X, Miller LH. Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand JESEBL/EBA-181 alters its receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Feb 24;101(8):2518-23.
25. Vera-Bravo R, Valbuena John J, Ocampo M, Garcia Javier E, Rodriguez Luis E, Puentes A, et al. Amino terminal peptides from the *Plasmodium falciparum* EBA-181/JESEBL protein bind specifically to erythrocytes and inhibit in vitro merozoite invasion. *Biochimie*. 2005 5//;87(5):425-36.
26. Mayer DCG, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Mar 31;106(13):5348-52.
27. Hayton K, Dumoulin P, Henschen B, Liu A, Papakrivovs J, Wellems TE. Various PfRH5 polymorphisms can support *Plasmodium falciparum* invasion into the erythrocytes of owl monkeys and rats. *Molecular and biochemical parasitology*. 2013 Feb;187(2):103-10.
28. Otto TD, Rayner JC, Bohme U, Pain A, Spottiswoode N, Sanders M, et al. Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. *Nature communications*. 2014;5:4754.
29. Rayner JC, Galinski MR, Ingravallo P, Barnwell JW. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Aug 15;97(17):9648-53.

30. Bei AK, Duraisingh MT. Functional analysis of erythrocyte determinants of Plasmodium infection. *Int J Parasitol.* 2012 May 15;42(6):575-82.
31. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature.* 2011 Dec 22;480(7378):534-7.
32. Kondgen S, Kuhl H, N'Goran PK, Walsh PD, Schenk S, Ernst N, et al. Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Curr Biol.* 2008 Feb 26;18(4):260-4.
33. Kaur T, Singh J, Tong S, Humphrey C, Clevenger D, Tan W, et al. Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *Am J Primatol.* 2008 Aug;70(8):755-65.
34. Woodford MH, Butynski TM, Karesh WB. Habituating the great apes: the disease risks. *Oryx.* 2002;36(02):153-60.
35. Reid MJ, Ursic R, Cooper D, Nazzari H, Griffiths M, Galdikas BM, et al. Transmission of human and macaque Plasmodium spp. to ex-captive orangutans in Kalimantan, Indonesia. *Emerging infectious diseases.* 2006 Dec;12(12):1902-8.
36. Delicat-Loembet L, Rougeron V, Ollomo B, Arnathau C, Roche B, Elguero E, et al. No evidence for ape Plasmodium infections in humans in Gabon. *PloS one.* 2015;10(6):e0126933.
37. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature.* 2002 10/03/print;419(6906):498-511.

Figure 1

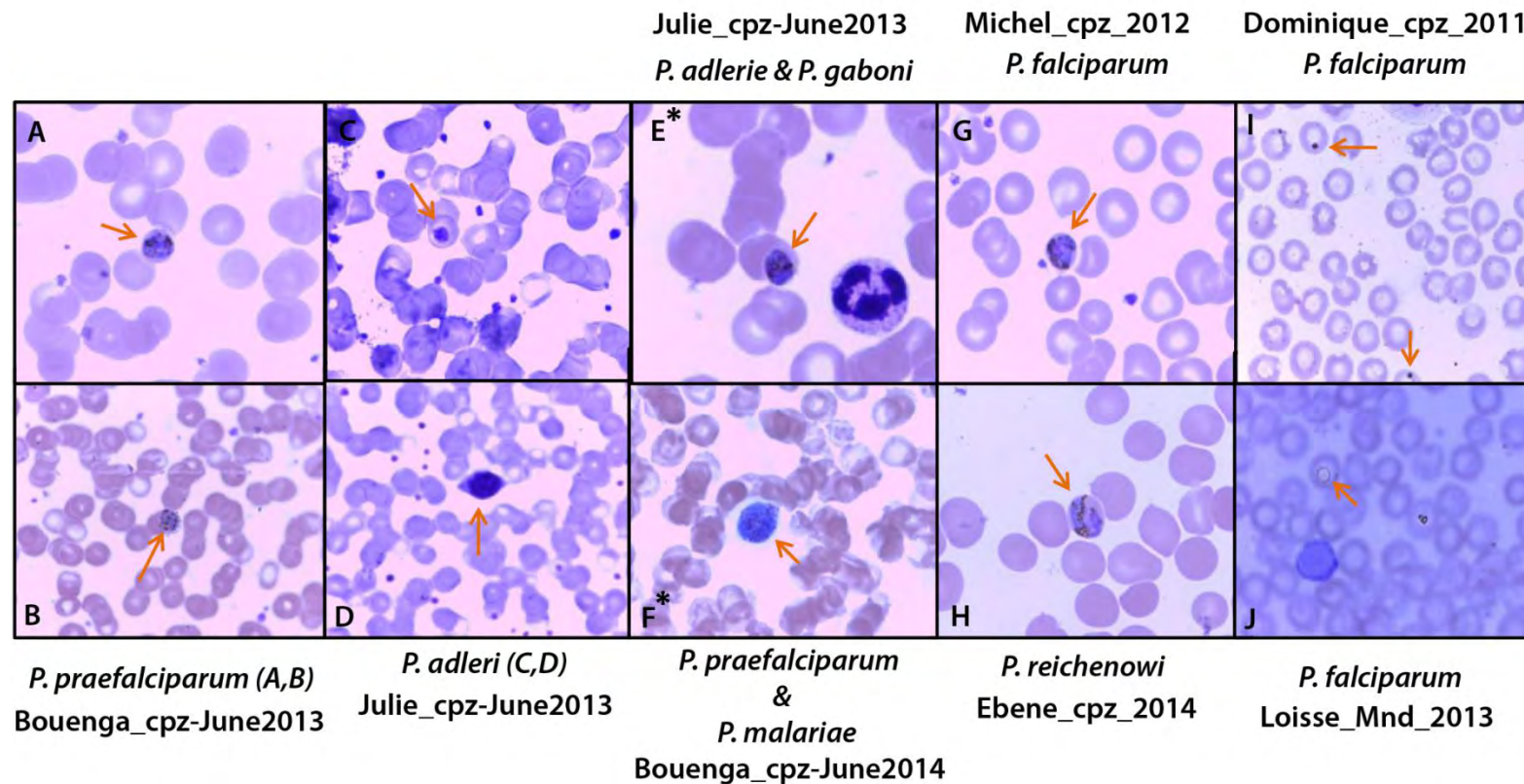


Figure 1 Different parasite forms observed in the Unexpected Infections (UI). Immature forms (trophozoite stage (panel I and J)). Matures forms (schizonts (panels A, B, G) and gametocytes (D)). These pictures were photographed at x100 magnification in representative thin blood smears. Asterisk indicates individuals displaying a co-infection.

Figure 2

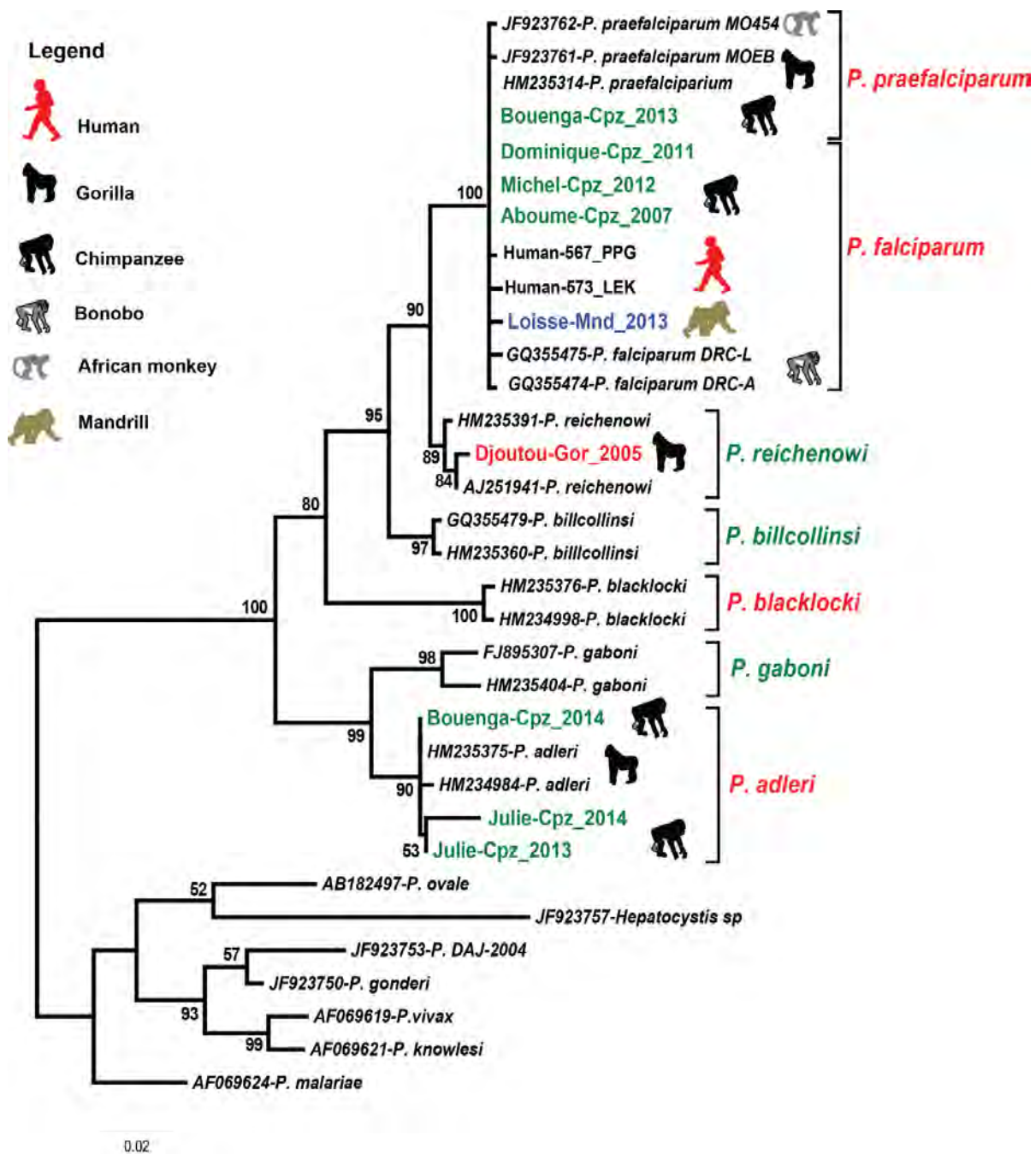


Figure 2: Phylogenetic relationships between the *Plasmodium* Cytochrome *b* sequences obtained from the Unexpected infections and those of known *Plasmodium* species (represented by their accession number). The tree was built based on Cytochrome *b* (Cyt-*b*) sequences of 671 bp. Red indicate sequences obtained from gorillas, blue from Mandrillus and green from chimpanzees. The tree was constructed by using maximum likelihood methods. Bootstrap values are given at each node

Table 1: Date of sampling and number of samples collected in each site for each host species. CDP: Centre de Primatologie (CIRMF). GPP (Gorilla Protection project). LEK (Park of La Lékédi).

	Biobank		Our samples		Sites
	2005-2011	2012	2013	2014	
Chimpanzees	2		51	35	CDP
Gorillas	3		2	4	
Humans			17	19	
Mandrills	13	2	219	186	
Others	1	1	62	52	
Gorillas	1		4	-	GPP
Humans			6	8	
Chimpanzees	10	11	26	16	LEK
Gorillas	1	2	4	2	
Humans			17	18	

Table 2: Distribution of infection (expected and unexpected) by host species.

	Numbers of samples	Numbers of Plasmodium-Positive samples	Expected infections	Unexpected Infections	Percentage of infection
Human	85	15	15	-	17.64% (15/85)
Chimpanzee	151	48	41	7	31.78% (48/151)
Gorilla	22	16	15	1	72.72 % (16/22)
Mandrill	420	2	1	1	0.47% (2/420)
Others	116	1	1	-	0.86% (1/116)

Table 3 Parasites diversity and hosts species. This table shows the different species of *Plasmodium* found in non-human primates and humans during this study. Three sequences obtained in chimpanzees were not usable, because they had mixed infection or were unexploitable.

	Chimpanzees	gorillas	Humans	Mandrills	Others
<i>P. reichenowi</i>	15	1	-	-	-
<i>P. gaboni</i>	17	-	-	-	-
<i>P. billcollinsi</i>	-	-	-	-	-
<i>P. praefalciparum</i>	1	2	-	-	-
<i>P. adleri</i>	3	8	-	-	-
<i>P. blacklocky</i>	-	1	-	-	-
<i>P. falciparum</i>	3	-	15	1	-
<i>P. vivax like</i>	4	2	-	-	-
<i>P. malariae-like</i>	3	1	-	-	-
<i>P. ovale-like</i>	1	1			
<i>P. gonderi</i>	0	0	-	1	-
<i>P. sp-DAJ-2004</i>					
<i>Hepatocystis sp</i>	-	-	-		1

Chapitre 3

Infection naturelle d'un chimpanzé à *P. reichenowi*



Résumé

Contexte

Les grands singes africains sont naturellement infectés par une large diversité des parasites de paludisme. Bien que les infections à *Plasmodium* n'aient jamais été clairement associées à des symptômes chez les primates non-humains, la question de la pathogénicité des parasites du genre *Plasmodium* chez les primates non-humains demeure toujours sans réponse. Un jeune chimpanzé (Wonga), est suivi avant et après sa libération dans un sanctuaire au Sud-Ouest de Franceville (Gabon) en plein forêt équatoriale. Le sanctuaire est une enceinte où vivent en semi-liberté des chimpanzés orphelins dont la santé est suivie chaque année. Avant sa libération, le jeune chimpanzé a été gardé en quarantaine pendant 3 mois au laboratoire du centre de primatologie du CIRMF.

Résultats

Peu après son introduction dans un groupe d'environ 12 chimpanzés orphelin dans le parc de la Lékédi, Wonga a fait de la fièvre avec 39°C, une anémie forte associée à une infection de *P. reichenowi*. Les analyses microscopiques ont révélé une parasitémie de 32474 parasites/μl. Le niveau de parasitémie et l'anémie a baissé avec le temps malgré d'autre infection due à *P. gaboni*.

Conclusion

Tous les symptômes observés chez Wonga sont caractéristiques d'une crise de paludisme forte chez un individu naïf. En effet, Wonga a été maintenue une grande partie de sa vie dans une maison dans un environnement urbain et n'a peut-être jamais été confrontée à une infection à *Plasmodium*.

Wonga n'a pas pu être infecté pendant la quarantaine, qui a duré trois mois, car l'immunité acquise à *Plasmodium* est opérationnelle au bout de dix jours. Ainsi compte tenu de son histoire, les symptômes Wonga exprimées peuvent donc être dus à la réaction d'un animal naïf qui connaît sa première infection à *Plasmodium*.

Mots clefs : *Plasmodium*, chimpanzé, Symptômes, Malaria, Anémie, Hyperthermie, Fièvre

Article-3

**Malaria-like symptoms associated with a natural
Plasmodium reichenowi infection in a chimpanzee**

CASE REPORT

Open Access



Malaria-like symptoms associated with a natural *Plasmodium reichenowi* infection in a chimpanzee

Anaïs Herbert^{1*}, Larson Boundenga^{2,5}, Anne Meyer³, Diamella Nancy Moukodoum², Alain Prince Okouga², Céline Arnathau⁴, Patrick Durand⁴, Julie Magnus², Barthélémy Ngoubangoye¹, Eric Willaume³, Cheikh Tidiane Ba⁵, Virginie Rougeron^{2,4}, François Renaud⁴, Benjamin Ollomo^{2,4*} and Franck Prugnolle^{2,4*}

Abstract

Although *Plasmodium* infections have never been clearly associated with symptoms in non-human primates, the question of the pathogenicity of *Plasmodium* parasites in non-human primates still remains unanswered. A young chimpanzee, followed before and after release to a sanctuary, in a semi-free ranging enclosure located in an equatorial forest, showed fever and strong anaemia associated with a high *Plasmodium reichenowi* infection, shortly after release. The animal recovered from anaemia after several months despite recurrent infection with other *Plasmodium* species. This may be the first description of malaria-like symptoms in a chimpanzee infected with *Plasmodium*.

Keywords: *Plasmodium*, *Pan troglodytes*, Chimpanzee, Symptom, Malaria, Anaemia, Hyperthermia, Fever

Background

Non-human primates and particularly great apes are natural hosts of various *Plasmodium* parasites [1, 2], including species very closely related to human parasites, like *Plasmodium falciparum* (the most virulent agent of human malaria), *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium vivax* (Fig. 1) [3, 4]. Among the species related to *P. falciparum* and classified into the subgenus *Laverania*, three species were shown to infect only chimpanzees (*Plasmodium gaboni*, *Plasmodium billcollinsi* and *Plasmodium reichenowi*) and three only gorillas (*Plasmodium adleri*, *Plasmodium blacklocki* and *Plasmodium praefalciparum*). For the species related to *P. malariae*, *P. ovale* and *P. vivax* and classified in the subgenus *Plasmodium*, they were all shown to infect both chimpanzees and gorillas.

Despite their genetic proximity with human parasite species especially *P. falciparum*, it is still unclear whether ape *Plasmodium* are virulent, that is whether great apes express disease or not when they are infected [5]. A case of a fatal *Plasmodium* infection in a chimpanzee was previously described [6], as well as in a gorilla [7], but the exact nature of the parasite involved was never determined with molecular tools, thus leaving the possibility of an infection with a human parasite (*P. falciparum* in particular). In addition, other pathogens could have caused these deaths and no special efforts were made to reject these possibilities. In contrast, other authors showed that the presence of *Plasmodium* in African great apes was not correlated with any increase of temperature or any other symptoms [1] or that the haematologic and biochemical values, as well as the majority of immunologic parameters, remained unaltered in chimpanzees infected with *P. falciparum* [8].

Some researchers noticed malaria-like symptoms responding to anti-malaria treatment in orangutans but without clear evidence of the presence of the pathogen [9]. In non-human primates other than great apes, studies showed that experimental infections of rhesus macaques with *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium coatneyi*, and less often *Plasmodium cynomolgi*, may be

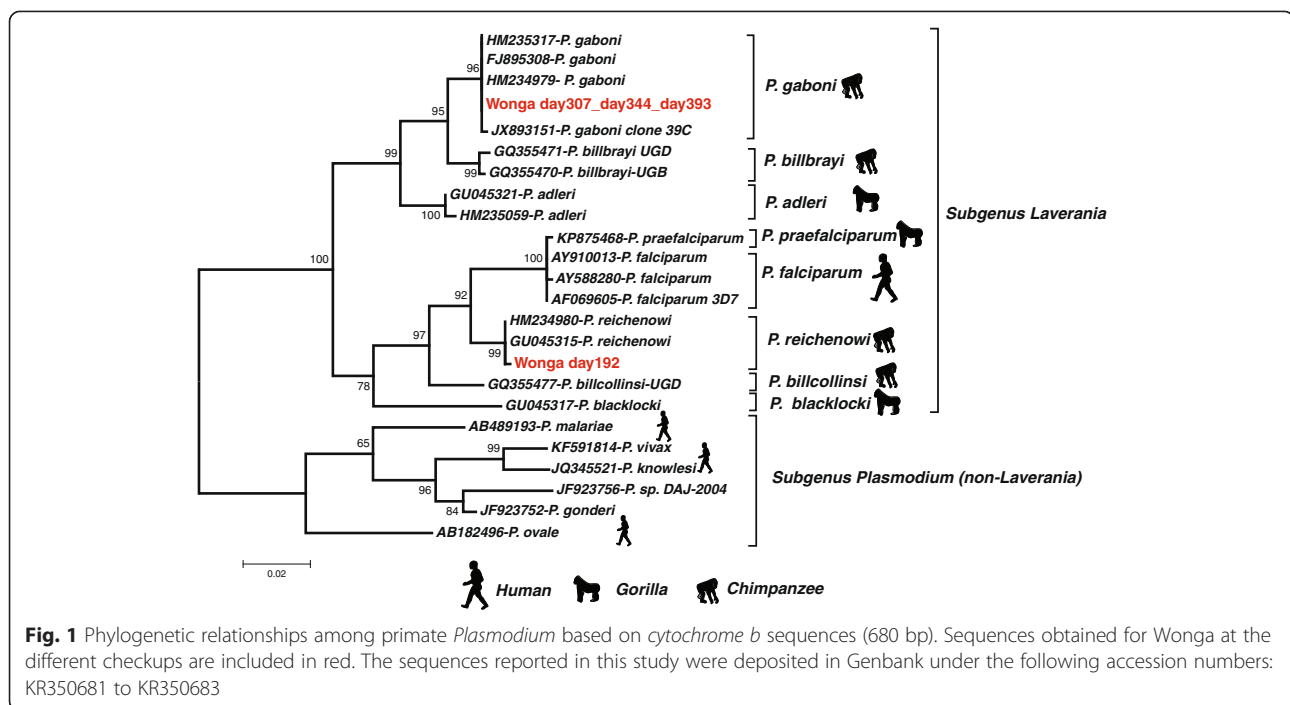
* Correspondence: anaisherbert@hotmail.com; bollomo@yahoo.fr; franck.prugnolle@ird.fr

[†]Equal contributors

¹Centre de Primatologie, Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon

²Unité de Biodiversité, Ecologie et Evolution des Parasites (UBEEP), Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon

Full list of author information is available at the end of the article



characterized by jaundice, anorexia, listlessness, fever, anaemia, and splenomegaly in spleen-intact animals [10]. Moreover, *P. knowlesi*-infected baboons expressed either acute infection with multiple system organ dysfunctions and cerebral involvement, or a chronic infection with spleen enlargement [11].

Therefore, no evidence of symptoms was ever clearly associated with natural *Plasmodium* infection in non-human primates, especially in great apes. This case presents what could be the first description of symptoms associated to a clearly identified natural *Plasmodium* infection in a chimpanzee.

Case presentation

History

A 6-year-old female chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*), named Wonga, was brought to the Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) after being confiscated from illegal owners in Libreville, Gabon. She was captured by the owners after they killed her mother and was kept as a pet for most of her life, living inside the owners' house in an urban environment. She spent her quarantine at CIRMF and cleared out after 90 days. She was then transferred to the sanctuary "Parc de la Lékédi", Bakoumba (Haut-Ogooué, Gabon).

The sanctuary "Parc de la Lékédi", Bakoumba, holds various primates species, including gorillas, chimpanzees and small monkeys, all bushmeat-poaching-issued orphans, which have been confiscated by the Gabonese Government, gone through a quarantine period at the Centre International de Recherches Médicales de

Franceville (CIRMF) and finally released into semi-free ranging enclosures in the sanctuary. Wonga was released into a group of 10 chimpanzees, ranging from 3 to 12 year-old, sharing a 7-ha-semi-free ranging enclosure in dense equatorial forest. The chimpanzees are left in the enclosure nights and days, and sleep in the trees. Food supplementation is offered every day, around 10 am and 2 pm, and consists of fruits and protein cakes. During feeding, keepers monitor animals' global health on site. Contacts with humans are extremely limited, to annual medical check-ups or health-care-needed anesthesia. Chimpanzees are not followed during the day and evolve freely into the enclosure.

Three and a half months after Wonga's release into the group, routine medical annual check-up was performed on all the chimpanzees of the group.

All procedures in this study involving animals were approved by the Government of the Republic of Gabon. This study complied with the relevant national guidelines and with the IUCN Policy Statement on Research Involving Species at Risk of Extinction.

Clinical examinations

During her quarantine, three clinical check-ups were performed on days 0, 22 and 51, following CIRMF quarantine protocol. For every medical check-up, the animal was anaesthetized with ketamine (10 mg/kg) via intramuscular injection. Once asleep, blood was collected from femoral vena into EDTA and dry tubes, on which pathogen screenings were performed. Wonga expressed no clinical symptoms of any disease or infection. Her

temperature was stable over these check-ups (mean = 37.1 °C; SD = 0.25166). She constantly gained weight over the three check-ups, which is expected from an individual recently confiscated and poorly nourished upon arrival at CIRMF (Fig. 2f).

Three and a half months after her transfer to the Parc de la Lékédi, on day 192, annual check-up of all chimpanzees of the group was routinely performed. Four chimpanzees (including this animal) were sampled on the same day. They were anaesthetized with ketamine (10 mg/kg) via intramuscular injection. The veterinarians noticed that Wonga was less active, calmer and sleepier than usual and than the other chimpanzees. Her physical examination revealed no abnormalities, except that her rectal temperature was high (39 °C), unlike her previous temperatures observed during quarantine (Fig. 2d) and unlike the three other chimpanzees examined the same day (mean = 37.56 °C, SD = 0.28868) (Fig. 3e). Veterinarians also noticed that Wonga did not gain any weight since her quarantine (Fig. 2f).

Laboratory tests

The chimpanzee Wonga

Blood count results For each check-up during quarantine and after release, blood counts (serum chemistry and haematology) were performed. Serum chemistry

results showed no strong abnormalities all along check-ups (Table 1) [12]. During her quarantine at CIRMF, Wonga was sampled three times. Her haematologic results were within or slightly below normal ranges for juvenile female chimpanzees (Table 2) [12].

During her first post-release check-up (day 192), correlated with her fever, her haematological results showed anaemia, with low haematocrit, low haemoglobin level and low red blood cell count (Table 2 and Fig. 2).

Plasmodium infection detection Along with blood counts, Wonga was tested for *Plasmodium* infections during quarantine and after release using two distinct diagnostic tests (thick blood smears and *cytochrome b* PCR/sequencing) [13]. The three samples tested during quarantine showed no *Plasmodium* infection (Fig. 2e).

On day 192, correlated with her fever and anaemia, she was tested positive for *P. reichenowi* (Fig. 1), with a high parasitaemia (32,472 parasites/μl of blood) (Fig. 2e). Parasitaemia was determined by counting the number of parasites infecting red blood cells, over a population of 100 white blood cells. Then, knowing the white blood cell count at the same date, the density of *Plasmodium* parasites per microlitre of blood was calculated. Several forms were observed including ring stages and mature forms like schizonts (Fig. 4), indicating that the parasite

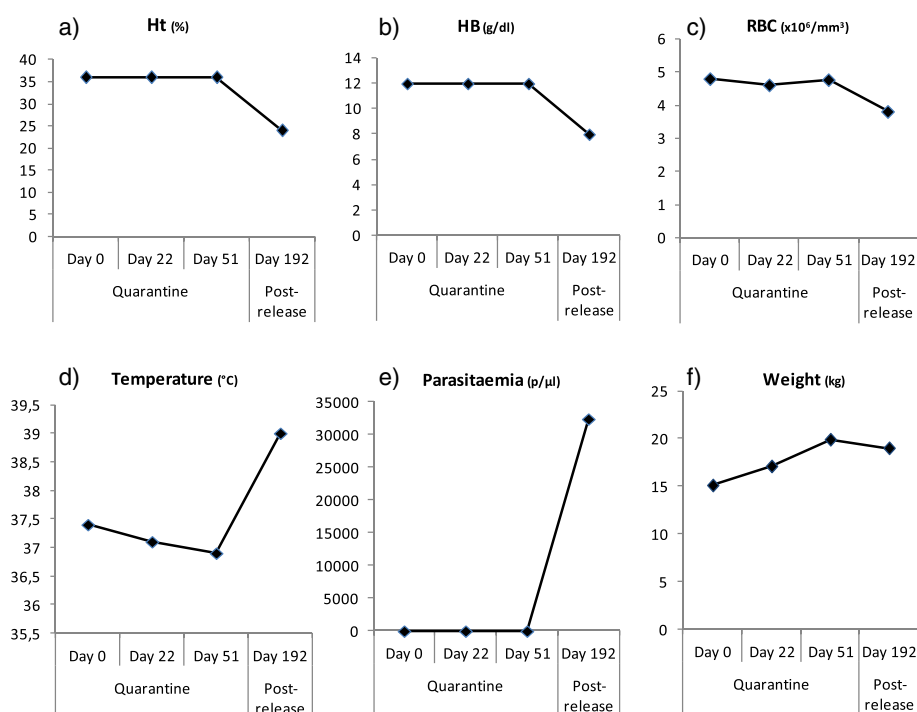
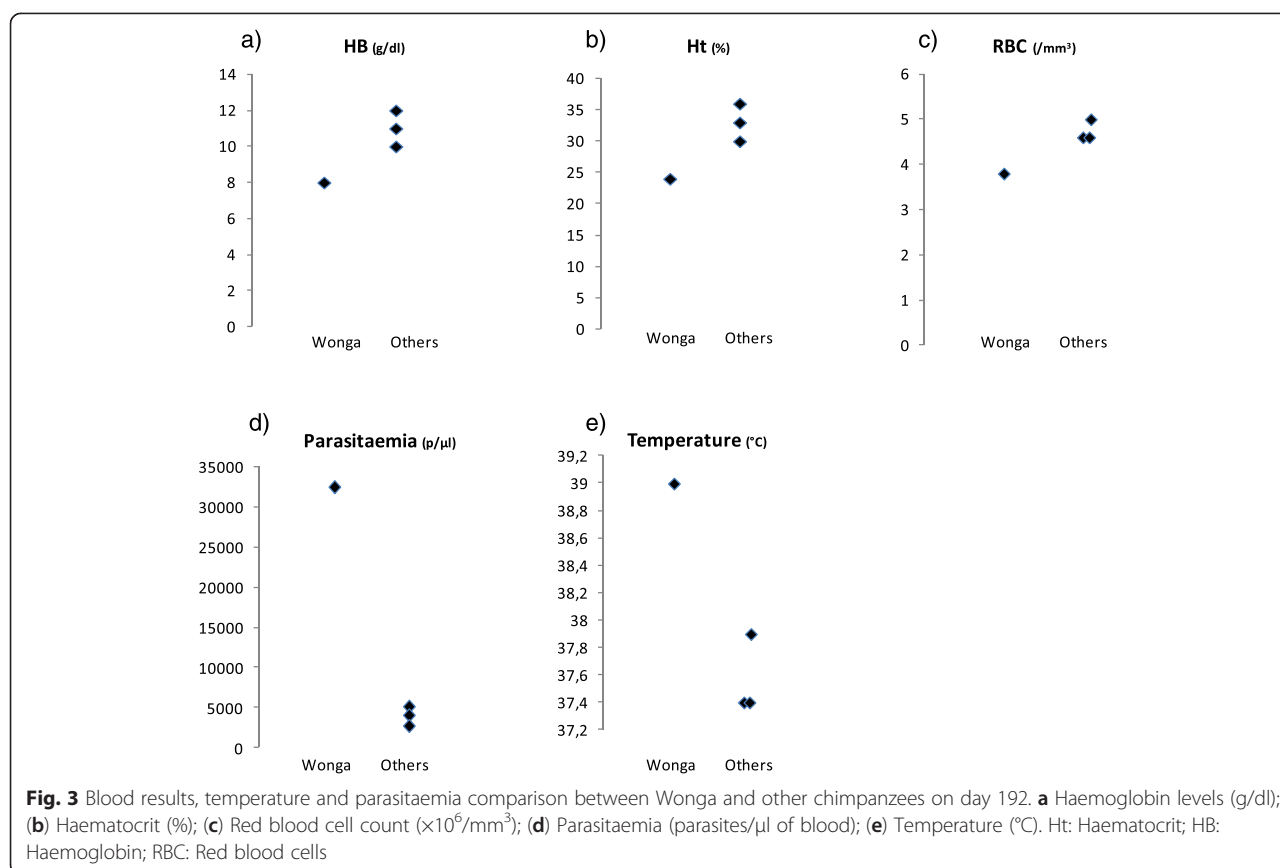


Fig. 2 Evolution of haematology parameters, temperature, parasitaemia and weight between quarantine (days 0, 22 and 51) and first post-release check-up (day 192). **a** Haematocrit (%); **b** Haemoglobin levels (g/dl); **c** Red blood cell count ($\times 10^6/\text{mm}^3$); **d** Temperature (°C); **e** Parasitaemia (parasites/μl of blood); **f** Weight (kg). Ht: Haematocrit; HB: Haemoglobin; RBC: Red blood cells



was clearly developing and could be the origin of the hyperthermia and of the anaemia.

Other infections During quarantine and for the three samples, the chimpanzee was screened for several pathogens. Simian Immunodeficiency Virus (SIV, peptides set), Simian T-Cell Leukaemia Virus (STLV, peptides set), hepatitis B (HBV, serology), hepatitis C (HCV, serology), filariasis (leucoconcentration), bacterial infections (bacterial cultures performed on nasal and anal swabs), tuberculosis (intradermal palpebral test) and gastro-intestinal parasites (Bailenger and flotation techniques) were all tested negative. Nevertheless, anti gastrointestinal parasites drugs were preventively administered.

On day 192, filariasis (leucoconcentration), bacterial infections (bacterial cultures performed on nasal and anal swabs), gastro-intestinal parasites (Bailenger and flotation techniques) and tuberculosis (intradermal palpebral test) were checked negative. Because the other chimpanzees of the group are non-infected with SIV, STLV, HBV and HCV and because animals do not have any contacts with wild chimpanzees, these pathogens were not checked on Wonga on day 192.

Comparison to other chimpanzees

Three other chimpanzees, two juvenile females (5 and 6 years old) and one adolescent male (9 years old), were sampled on day 192. Their haemoglobin levels (HB), haematocrit (Ht), and red blood cell counts (RBC) were within or slightly lower than chimpanzees' normal haematological ranges (for juvenile females: HB = 11.2–15 g/dl; Ht = 34.5–45.9 %; RBC = $4.0\text{--}5.9 \times 10^6/\text{mm}^3$; for adolescent males: HB = 12.4–16.4 g/dl; Ht = 37.9–49.7 %; RBC = $4.5\text{--}6.1 \times 10^6/\text{mm}^3$) [12]. They did not show either anaemia or hyperthermia, unlike Wonga (Fig. 3).

All chimpanzees of the group were infected with *Plasmodium* (two of them with *P. reichenowi* and one with *P. malariae*), but with a much lower parasitaemia than Wonga (2720, 4048 and 5130 parasites/ μl) (Fig. 3d).

Evolution

Wonga stopped showing any abnormal behaviour some days after day 192. On days 307, 344 and 393, she was anaesthetized again for vaccination purposes. The veterinarian took advantage of the anesthesia needed for vaccinations to perform a full clinical examination and to sample the animal. Her temperatures had decreased back to normal (37.9, 37.4 and 37.7 $^{\circ}\text{C}$) (Fig. 5c).

Table 1 Wonga serum chemistry results

Parameters		Alb	Tot	Creat	Urea	GGT	AST	ALT	ALP
		(g/dL)	Prot (g/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(UI/L)
(Normal ranges)		(3.1–4.8)	(6.2–8.1)	(0.4–1)	(4.6–19.9)	(7.3–36.4)	(7.9–33.0)	(18.6–61.1)	(159.1–1080.1)
Quarantine	Day 0	N/A	8.5	0.87	11.5	4.92	16	18	1.5
	Day 22	N/A	8.8	0.78	5.88	10	19	21	40
	Day 51	3.8	6.0	0.9	2.8	N/A	13	15	538
Post-release	Day 192	3	7.6	0.78	5.6	14	40	23	288
	Day 307	2.9	8.1	0.64	1.12	22	24	19	324
	Day 344	3.4	N/A	0.62	N/A	27	24	13	270
	Day 393	3.4	8.4	0.62	11.54	16	19	20	374

Alb albumin, Tot Prot total protein, Creat creatinine, Urea urea nitrogen, GGT γ-glutamyltransferase, AST aspartate transaminase, ALT alanine transaminase,

ALP alkaline phosphatase

Bold values: values out of normal ranges

Plasmodium sequencing showed that she was now infected with *P. gaboni* (Fig. 1). Her parasitaemia was still high but strongly decreased compared to day 192 (Fig. 5f).

On days 307 and 344, her haematological results still showed strong anaemia (Fig. 5). RBC count was back within normal range, but Hb level, Ht, mean cell volume (MCV) and mean cell haemoglobin (MCH) were low, signing a chronic microcytic and hypochromic anaemia. On day 393, Wonga's laboratory results showed that she recovered from her anaemia, with much higher Ht, Hb level, MCV and MCH (Fig. 5).

Follow-up on Wonga's weight was also performed (Fig. 5g); after her release to the sanctuary, she was barely maintaining her weight until day 344. Then, between day 344 and day 393, as she recovered from her anaemia, she spectacularly gained weight in a short period of time.

On day 307, she was tested negative for gastrointestinal infections; however, anti gastrointestinal parasite drug was preventively administered on that day. On days 344 and 393, she was again tested negative for gastrointestinal parasites infections.

Discussion

The case

Some weeks after her release in a dense tropical forest, Wonga, a 6-year-old female chimpanzee, presented a

fever associated with anaemia, characterized by a very low Ht, very low Hb level and a low RBC count, as well as no weight gain since her quarantine. These clinical and laboratory findings were associated with a *Plasmodium* infection at high parasitaemia. All her symptoms (especially high parasitaemia and strong anaemia) are characteristics of a strong malaria attack in a naïve individual. Indeed, Wonga was kept for most of her life inside a house in an urban environment and may never have been confronted to a *Plasmodium* infection. Moreover, Wonga was not infected during quarantine, which lasted 3 months. *Plasmodium*-acquired immunity is believed not to last for a long period of time [14], thus Wonga may be considered naïve regarding *Plasmodium* infection. Given her history, the symptoms Wonga expressed may thus be due to the reaction of a naïve animal experiencing its first *Plasmodium* infection. On the opposite, the other chimpanzees sampled, which have been followed for the past 2 years and have constantly been tested positive for *Plasmodium*, are definitively not naïve regarding *Plasmodium* infection. On day 192, Wonga expressed two features that are seen in humans experiencing their first *Plasmodium* infection: high parasitaemia and severe disease, including severe anaemia. Malaria-naïve patients have significantly higher risk to develop a peak parasitaemia compared to patients born

Table 2 Wonga hematological results

Parameters		RBC	HB	Ht	Plt	MCV	MCH	MCHC
		($\times 10^6/\text{mm}^3$)	(g/dl)	(%)	($/\text{mm}^3$)	(μm^3)	(pg/ml)	(g/dl)
(Normal ranges)		(4.0–5.9)	(11.2–15)	(34.5–45.9)	(171,900–442,000)	(74.0–87.9)	(23.7–28.9)	(30.6–34.5)
Quarantine	Day 0	4.79	12	36	371,000	70	24	35
	Day 22	4.6	12	36	431,000	69	25	36
	Day 51	4.76	12	36	365,000	69	25	37
Post-release	Day 192	3.8	8	24	266,000	68	20	32

RBC red blood cells, HB hemoglobin, Ht hematocrit, Plt platelets, MCV mean cell volume, MCH mean cell hemoglobin, MCHC mean cell hemoglobin concentration

Bold values: values out of normal ranges

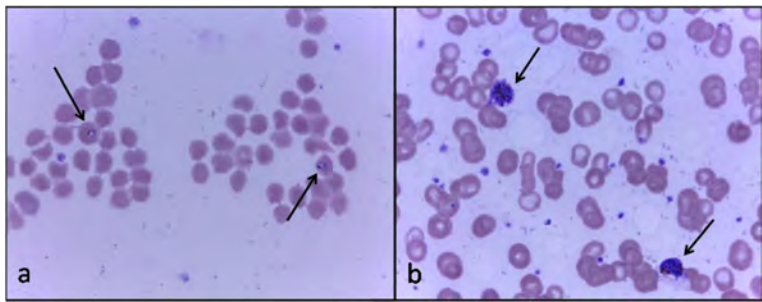


Fig. 4 Wonga's *Plasmodium* sp. forms on day 192. **a** Ring form; **(b)** Mature schizonts. Giemsa stain, 100 x magnification. Arrows point towards the different forms

and resident in malaria-endemic countries of Africa [15]. Wonga, a malaria-naïve chimpanzee, did express a peak parasitaemia compared to other chimpanzees resident in the malaria-endemic sanctuary. High levels of parasitaemia can result in substantial destruction of red blood cells, causing a severe anaemia, particularly in non-immune individuals [16]. However, even if *Plasmodium*-

induced haemolysis contributes to a reduction in haemoglobin levels, low haemoglobin levels in anaemic children may also be explained by ineffective erythropoiesis [16]. Studies demonstrated that patients experiencing acute *falciparum* malaria show bone marrow damage, ineffective erythropoiesis and a reduced rate of erythropoietic proliferation [17]. Therefore, high parasitaemia and

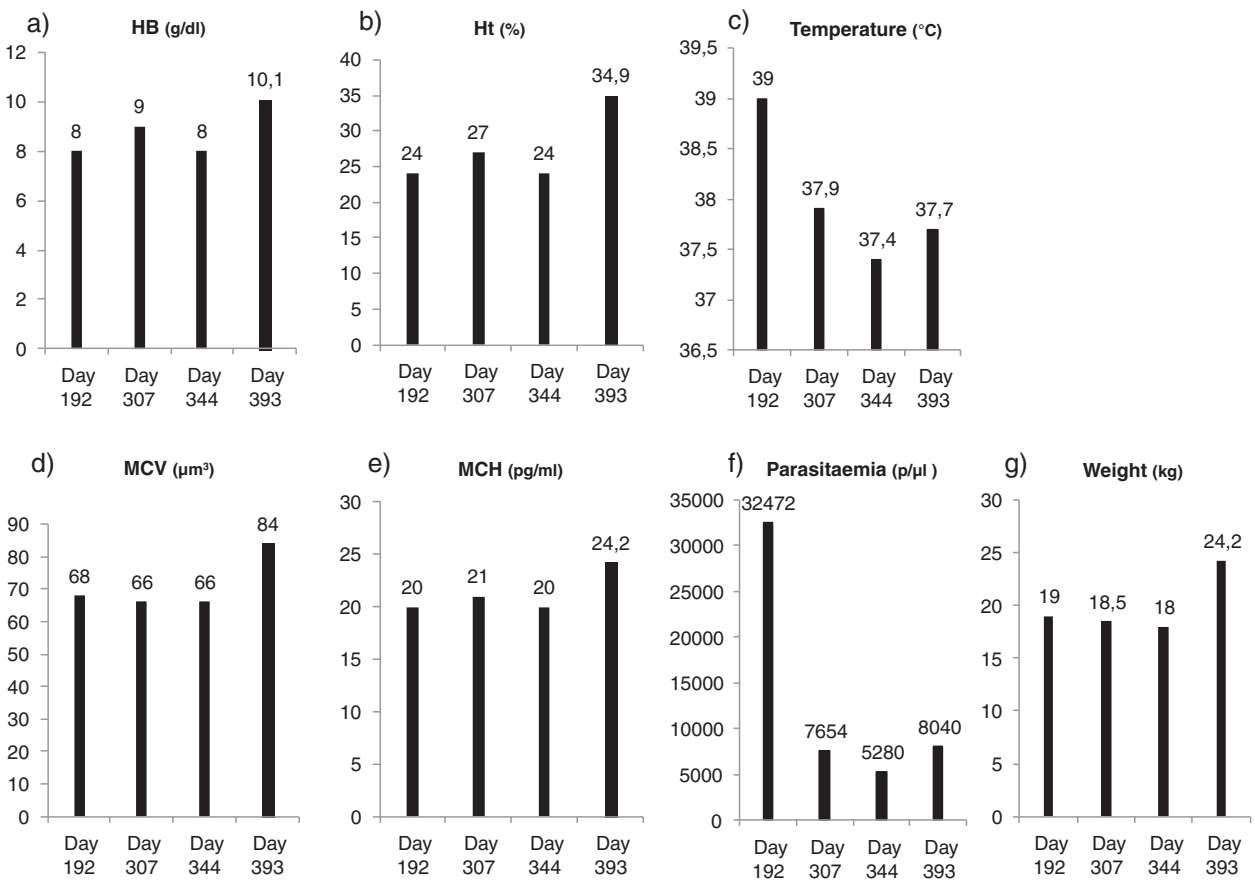


Fig. 5 Evolution of Wonga's haematological parameters, temperature, parasitaemia and weight during post release check-ups (days 192, 307, 344, and 393). **a** Haemoglobin levels (g/dl); **(b)** Haematocrit (%); **(c)** Temperature (°C); **(d)** Mean cell volume (μm³); **(e)** Mean cell haemoglobin (pg/ml); **(f)** Parasitaemia (parasites/μl of blood); **(g)** Weight (kg). Ht: Haematocrit; HB: Haemoglobin; MCV: Mean cell volume; MCH: Mean cell haemoglobin

ineffective erythropoiesis may explain Wonga's anaemia. Severe anaemia is also a feature more often expressed by non-immune individuals infected with *Plasmodium*; it has been shown that non-immune tourists going to *Plasmodium*-endemic areas are at greater risk to develop severe disease than semi-immune residents, who seem at lower risk for severe disease [18]. This is also true for children experiencing their first malaria infection: severe disease with rapid progression to death occurs in young children without acquired immunity [19]. Most of the mortality associated with *P. falciparum* infection occurs in immune-naïve African children under 5 years of age. Symptoms of severe *P. falciparum* malaria include hyperparasitaemia and severe malarial anaemia [16]. Therefore, Wonga's non-acquired immunity to *Plasmodium* may explain the hyperthermia and anaemia she experienced, while semi-immune chimpanzees, living in the area for years, did not show any symptoms. Unfortunately, no other *Plasmodium*-naïve chimpanzees recently introduced in the area was anaesthetized soon after release, thus allowing the same study as Wonga's. Anaesthesia and sampling are necessary to detect anaemia and hyperthermia, which may explain why malaria-like symptoms were never detected on the other chimpanzees previously released. Given the unique aspect of the case observed, further case studies will thus be necessary to assess whether treatment should be administered.

No difference on alimentation, stress or weather could have biased these results. All individuals compared in this study were sampled the same day, with the same technique and conditions, and live in the same enclosure. None of them suffered malnutrition and all presented a good body condition. No difference in capture, anaesthesia or amount of stress could have been the origin of such a raise in temperature. Wonga was also tested for other diseases which could have been responsible for the fever (for example, bacterial infections), and for the anaemia (for instance, gastrointestinal parasites such as *Ancylostoma sp.*).

Evolution of the case

After several months (day 307), *P. reichenowi* had disappeared from Wonga's blood, but another malaria infection with *P. gaboni* was observed, associated to a lower parasitaemia. On days 307 and 344, Wonga did not show any hyperthermia but still had microcytic and hypochromic anaemia. During the same period, she did not gain any weight, confirming that her global health was still not optimum. Gastrointestinal parasites infections which could be responsible for these symptoms were again ruled out.

The clearance of *P. reichenowi* from Wonga could have been due to the development of an immunity of the chimpanzee against this parasite species. The existence of such immunity against chimpanzee parasite was

recently indirectly evidenced in natural ape populations by showing that prevalence of infection was lower in older individuals [20]. Regarding *P. gaboni*, infection was acquired by Wonga any time between day 192 and day 307. Whether this infection induced similar symptoms cannot be told. Further studies should be done to determine if all ape *Plasmodium* species induce similar symptoms or not. It is nevertheless likely that this infection, even at a low parasitaemia, was partly responsible for the maintenance of the anaemia.

Finally, between day 344 and day 393, after several months without any symptoms other than anaemia and no weight gain, the chimpanzee recovered from her haematological condition, recovered usual haemoglobin levels, and resumed gaining weight. Such recovery could be explained by a progressive accommodation of Wonga's physiology to the recurrent *Plasmodium* infections [21], as observed in humans [22].

Conclusions

Wonga expressed hyperthermia and strong anaemia correlated with a high parasitaemia *Plasmodium* infection. Other possible causes of the symptoms observed were ruled out. Then, after several months, and despite recurrent infection with other *Plasmodium* species, the animal gradually recovered from anaemia. Symptoms such as fever and anaemia were consistent with a strong *Plasmodium* infection, and showed first evidence of malaria-like symptoms in a likely naïve-chimpanzee infected with *Plasmodium*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors made substantial contributions to the investigations presented in this manuscript. AH wrote the article, analysed and interpreted the data. LB and DNM performed the molecular diagnosis of the blood samples and estimated parasitaemia. AM collected all samples and performed the clinical exams. LB, DNM, APO, CA, and PD processed the samples and carried out the sequence analysis. JM, CTB, BN, EW, and VR participated in sanitary controls and helped in the acquisition of data. AH drafted the manuscript with contributions of FP, AM, BO, and FR. All authors have critically revised and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the CIRMF, CNRS, IRD as well as Agence Nationale pour la Recherche (ANR JCJC SVSE 7-2012 ORIGIN) which provided financial support to this study. The authors thank COMILOG and SODEPAL for their help in the study. Authors thank the two reviewers for their very constructive comments.

Author details

¹Centre de Primatologie, Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon. ²Unité de Biodiversité, Ecologie et Evolution des Parasites (UBEEP), Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon. ³Société d'Exploitation du Parc de la Lékédi, Bakoumba, Gabon. ⁴Laboratoire MIVEGEC; UM1-CNRS 5290-IRD 224, IRD Montpellier, Montpellier, France. ⁵Laboratoire d'Ecologie et Biologie évolutive, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005 Dakar, Senegal.

Received: 18 February 2015 Accepted: 20 May 2015

Published online: 28 May 2015

References

1. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, André C, Halbwax M, et al. On the diversity of malaria parasites in african apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from bonobos. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000765.
2. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1458–63.
3. Prugnolle F, Durand P, Ollomo B, Duval L, Arieu F, Arnathau C, et al. A fresh look at the origin of *Plasmodium falciparum*, the most malignant malaria agent. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1001283.
4. Rayner JC, Liu W, Peeters M, Sharp PM, Hahn BH. A plethora of *Plasmodium* species in wild apes: a source of human infection? *Trends Parasitol.* 2011;27:222–9.
5. Prugnolle F, Ayala F, Ollomo B, Arnathau C, Durand P, Renaud F. *Plasmodium falciparum* is not as lonely as previously considered. *Virulence.* 2011;2(1):71–6.
6. Tarello W. A fatal *Plasmodium reichenowi* infection in a chimpanzee? *Rev Med Vet.* 2005;156(10):503–5.
7. Fossey D. Gorilla in the mist. 1983.
8. Taylor DW, Wells RA, Vernes A, Rosenberg YJ, Vogel S, Diggs CL. Parasitologic and immunologic studies of experimental *Plasmodium falciparum* infection in nonsplenectomized chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:36–44.
9. Reid MJC. *Plasmodium* sp infections in ex-captive bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*) housed at the orangutan care center and quarantine. Kalimantan Tengah, Indonesia: Pasir Panjang; 2005.
10. Unwin S, Cress D, Colin C, Bailey W, Boardman W. D425 - Pan African sanctuary alliance primate veterinary healthcare manual. 2nd ed. 2009.
11. Ozwara H, Langermans JA, Maamun J, Farah IO, Yole DS, Mwenda JM, et al. Experimental infection of the olive baboon (*Papio anubis*) with *Plasmodium knowlesi*: severe disease accompanied by cerebral involvement. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:188–94.
12. Howell S, Hoffman K, Bartel L, Schwandt M, Morris J, Fritz J. Normal hematologic and serum clinical chemistry values for captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Comp Med.* 2003;53:413–23.
13. Ollomo B, Durand P, Prugnolle F, Douzery E, Arnathau C, Nkoghe D, et al. A new malaria agent in African hominids. *PLoS Pathog.* 2009;5:29.
14. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:13–36.
15. Bunn A, Escombe R, Armstrong M, Whitty CJ, Doherty JF. *Falciparum* malaria in malaria-naïve travellers and African visitors. *QJM.* 2004;97:645–9.
16. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci.* 2011;7:1427–42.
17. Dormer P, Dietrich M, Kern P, Horstmann RD. Ineffective erythropoiesis in acute human *P falciparum* malaria. *Blut.* 1983;46:279–88.
18. Calleri G, Lipani F, Macor A, Belloro S, Riva G, Caramello P. Severe and complicated *Falciparum* malaria in italian travelers. *J Travel Med.* 1998;5:39–41.
19. Malaria in children under five. [http://www.who.int/malaria/areas/high_risk_groups/children/en/]
20. De Nys HM, Calvignac-Spencer S, Thiesen U, Boesch C, Wittig RM, Mundry R, et al. Age-related effects on malaria parasite infection in wild chimpanzees. *Biol Lett.* 2013;9:20121160.
21. Verhoef H, West CE, Kraaijenhagen R, Nzyuko SM, King R, Mbandi MM, et al. Malarial anemia leads to adequately increased erythropoiesis in asymptomatic Kenyan children. *Blood.* 2002;100:3489–94.
22. Sumbele IUN, Nkuo Akenji T, Samje M, Ndzeize T, Ngwa EM, Titanji VPK. Haematological changes and recovery associated with treated and untreated *Plasmodium falciparum* infection in children in the Mount Cameroon Region. *J Clin Med Res.* 2010;2:143–51.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Chapitre 4

Caractérisation des *Plasmodium spp* circulant dans la faune sauvage coexistant avec les primates non-humains au Gabon



Résumé

Contexte et Objectif

L'ordre des *Hémosporidies* regroupe de nombreux parasites protozoaires dont les plus connus sont les agents du paludisme humain, une maladie qui touche chaque année plusieurs millions de personnes vivant dans les régions tropicales et en particulier en Afrique subsaharienne. Une grande diversité d'*Hémosporidies* parasitant un large éventail de vertébrés, y compris les reptiles, les oiseaux et les mammifères, a été historiquement documentée. Les outils moléculaires ont permis de revisiter la diversité de *Plasmodium* infectant les grands singes africains et a révélé l'existence d'une diversité *Plasmodiale* abondante, qui a été largement sous-estimé par les examens microscopiques. Ainsi, l'objectif de étude était de déterminer les espèces plasmodiales en circulation dans les autres animaux de la faune sauvage, afin d'évaluer les transferts de parasites entre animaux partageant les mêmes biotopes. Nous avons analysé environ 450 échantillons de viande de brousse composés de reptiles, d'oiseaux, de mammifères. Tous ces échantillons étaient issus de la bio-banque du CIRMF.

Résultats

Nous avons observé que les ongulés sont infectés par plusieurs parasites appartenant à au moins quatre lignées phylogénétiques distinctes d'*Hémosporidies*. Ces trois lignées (ici visées comme lignées A, B, C et D (Figure 3 article)) forment un groupe monophylétique, avec les *Plasmodium spp* d'oiseaux et parasites du genre *Polychromophilus* (Les parasites de chauves-souris).

La lignée A, infecte trois espèces d'hôtes *Cephalophus monticola*, *C. calliphygus* et *C. nigrifrons* ; La lignée B infecte les *C. monticola* et *C. dorsalis* et sa gamme d'hôtes ne se limite pas aux artiodactyles car elle a été retrouvé chez un pangolin et cercopithèque. Les vecteurs potentiels de ces lignées A et B ont été aussi mis en évidence. La lignée C et la lignée D n'ont été détectées que chez les moustiques anophèles. Ce découverte change la compréhension de que l'on se faisait de l'histoire évolutive des Hémosporidies de mammifères.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons identifié trois nouvelles lignées moléculaires d'*Haemosporidies* infectant le genre *Cephalophus*. Deux de ces lignées pourraient être les *Plasmodium spp* précédent identifié comme *P. cephalophi* et *P. brucei* par Garnham and Kuttle (1908). La détection de ces lignées change complétement ce que nous pensons de l'évolution des Hémosporidies. Au moins, sept espèces d'anophèles assurent la circulation de ces lignées au sein de la faune.

Mots clefs : Hémosporidie, *Plasmodium*, Antilope, Anopheles, Évolution, Écologie,

Article-4

**Haemosporidian parasites of antelopes and other
vertebrates from Gabon, Central Africa**

Haemosporidian parasites of antelopes and other vertebrates from Gabon, Central Africa

Larson Boundenga^{1,2†}, Boris Makanga^{1,3,4†}; Benjamin Ollomo¹, Virginie Rougeron^{1,3}, Bertrand Mve-Ondo¹, Celine Arnathau³, Patrick Durand³, Nancy Diamella-Moukodoum¹, Alain-Prince Okouga¹, Lucretie Loembet-Delicat¹, Lauriane Yacka-Mouele¹, Eric Leroy^{1,3}, Nil Rahola^{1,3}, Cheikh Tidiane BA², Francois Renaud³, Franck Prugnolle^{1,3*}, Christophe Paupy^{3*}.

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

²Laboratory of Evolutionary Biology, Ecology and Management of Ecosystems, Faculty of Sciences and Techniques, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Senegal.

³Laboratoire MIVEGEC, UMR 224-5290 IRD-CNRS-UM, Centre IRD de Montpellier, 34295 Montpellier, France

⁴Institut de Recherche en Ecologie Tropicale, Libreville, Gabon

†Equal contribution

*Co-managed this work

To whom correspondence may be addressed:

Larson Boundenga: larsonamedeo@yahoo.fr

Boris Makanga: makanga.boris@gmail.com

Franck Prugnolle: franck.prugnolle@ird.fr

Christophe Paupy: christophe.paupy@ird.fr

Abstract:

Re-examination, using molecular tools, of the diversity of haemosporidian parasites (among which the agents of human malaria are the best known) has generally led to rearrangements of traditional classifications. In this study, we explored the diversity of haemosporidian parasites infecting vertebrate species (particularly mammals, birds and reptiles) living in the forests of Gabon (Central Africa), by analyzing a collection of 492 bushmeat samples. We found that samples from five mammalian species (four duiker and one pangolin species), one bird and one turtle species were infected by haemosporidian parasites. In duikers (from which most of the infected specimens were obtained), we demonstrated the existence of at least two distinct parasite lineages related to *Polychromophilus* species (i.e. bat haemosporidian parasites) and to sauropsid *Plasmodium* (from birds and lizards). Molecular screening of sylvatic mosquitoes captured during a longitudinal survey revealed the presence of these haemosporidian parasite lineages also in several *Anopheles* species, suggesting a potential role in their transmission. Our results show that, differently from what was previously thought, several independent clades of haemosporidian parasites (family Plasmodiidae) infect mammals and are transmitted by anopheline mosquitoes.

Keywords: Haemosporida, Malaria parasite, duikers, *Anopheles*, evolution, mammals.

Introduction

The order Haemosporida (also called Haemosporidia, Haemospororida or Haemospororina) includes many protozoan parasites among which the best known are the agents of human malaria, a disease affecting every year several millions of people in tropical regions and particularly in sub-Saharan Africa [1]. Within the Haemosporida order, the large family of Plasmodiidae comprises several genera and species that parasitize a wide range of vertebrates, such as fish, reptiles, birds and mammals [2]. All the parasite species that infect mammals belong to this family and are restricted to nine genera (*Biguetiella*, *Bioccala*, *Dionisia*, *Nycteria*, *Hepatocystis*, *Plasmodium*, *Polychromophilus*, *Rayella* and the fossil genus *Vetufebrus*). Although most of these parasites were described during the second half of the twentieth century, a significant number of new taxa has been discovered in wildlife during the last decade [2, 3].

The first taxonomic descriptions of haemosporidian parasites were based on morphological characteristics [4, 5] and relied mainly on the microscopic observations of biological features [6], such as the schizont and gametocyte forms [7-9], and on their life history traits as well as the nature of the host species. This approach was very useful; however, it is not very reliable [10]. Indeed, over time, the morphology of an organism can be modified by the influence of environmental factors [10]. Moreover, the morphological features and life history traits of a parasite species can vary from one host species to another [11, 12]. In addition, some species can display the same morphological features, although they are genetically very different (cryptic species) [10].

Therefore, most taxonomic identifications and classifications are now based on the species genetic characteristics obtained using molecular tools [10]. Particularly, molecular analyses of haemosporidian species have led to major rearrangements of the traditional classifications. For instance, molecular studies on avian malaria parasites revealed much more

diversity than previously assumed based on morphological analyses [13, 14]. Molecular tools also revealed the existence of an abundant diversity of *Plasmodium* species that infect African great apes [15-18]. This diversity was largely underestimated by microscopic examinations [19].

Recently, following a longitudinal survey of sylvan anopheline mosquitoes in Gabon (Central Africa), we discovered several phylogenetic lineages of haemosporidian parasites (based on the sequence characterization of a classical cytochrome B fragment in the mitochondrial genome) for which the closest reference sequence in Genbank was a sequence obtained from an African monkey (isolate S2138 [20]). Except this sequence, the closest reference sequences were from parasites infecting birds (e.g. *Plasmodium* sp_GD2_GD201).

Despite significant screening of malaria parasites in central African monkeys, no other sequences related to S2138 were found in monkeys [20, 21] suggesting that monkeys are accidental hosts. Therefore, to identify the natural vertebrate hosts of these different lineages, we decided to explore or re-explore, with molecular tools, the diversity of haemosporidian parasites in the different groups of sylvatic vertebrates (from reptiles to birds and mammals) present in Gabon (excluding non-human primates and bats the parasite diversity of which was recently revised in Central Africa; see e.g. [6, 15, 20-23]).

We could identify several haemosporidian lineages that infected different groups of vertebrates especially ungulates and that did not correspond to any previously described parasite species. Most of them also infected different sylvan anopheline mosquito species. Their discovery and the phylogenic position of these new lineages bring new information on the evolution of haemosporidian parasites in general and particularly on those infecting mammals. Indeed, our results show that, contrarily to what previously thought (e.g. [24-26]), extant malaria parasites colonized and radiated in mammals and anophelids several times independently.

Results and Discussion

In this study, we investigated the diversity of haemosporidian parasites that circulate among wild vertebrates in Gabon, Central Africa, using molecular tools to analyze the parasite content of bushmeat samples collected in different areas of Gabon (Figure 1) and stored in a biobank. This biobank included bushmeat samples from 13 species of mammals, four species of reptiles and three species of birds that represented mainly species hunted and consumed in Gabon (Table 1). Molecular analyses revealed that different species of mammals, reptiles and birds were infected by haemosporidian parasites (Table 1).

Among these specimens, ungulates from the genus *Cephalophus* were infected by parasites belonging to at least two main and distinct phylogenetic Haemosporida lineages (Figure 2) (hereafter, referred as lineage A and B). We detected lineage A in three ungulate species [*Cephalophus monticola* (blue duiker), *Cephalophus calliphygus* (Peter's Duiker) and *Cephalophus nigrifrons* (black fronted duiker)] and lineage B in two species of duikers [*C. monticola* and *Cephalophus dorsalis* (Bay duiker)] and one pangolin sample (*Phataginus tricuspis*). Lineage B also included one reference sequence obtained from an African monkey of the genus *Cercopithecus* (S2138) [20].

Historically, infections by haemosporidian parasites in ungulates were considered to be uncommon [27]; nevertheless, two haemosporidian species were previously described in African antelopes. Both were classified within the genus *Plasmodium* (*Plasmodium cephalophi* and *Plasmodium brucei*) and were first detected in Grim's duikers (*Sylvicapra grimmia*) [28]. Therefore, the parasites identified in the present study could correspond, or could be related to these two previously described species. However, because of the absence of molecular data on these two previously described species and the lack of morphological descriptions in our study, it is impossible to draw any conclusion.

Analysis of the molecular data from anopheline specimens collected in two forest areas of Gabon during a longitudinal survey (Figure 1 and Figure 3) indicated that they also were infected by parasites from lineages A and B (Figure 2). Specifically, we identified lineage A parasites in the DNA from the abdomen, but not from the salivary glands, of one female mosquito specimen belonging to *Anopheles gabonensis* (a species recently discovered in the Gabonese forest [29]) and in one *Anopheles vinckei* sample (Figure 2). We found parasites from lineage B most frequently (11 times) in mosquitoes belonging to six *Anopheles* species [*Anopheles carnevalei* (one specimen), *Anopheles coustani* (one specimen), *An. gabonensis* (four specimens), *Anopheles obscurus* (three specimens), *An. vinckei* (one specimen) and *An. sp.* (one specimen)]. Two specimens (identified as *An. gabonensis* and *An. obscurus*) harbored the parasites in the salivary glands (Figure 2). This strongly suggests that lineage B parasites can complete their life cycle within *An. gabonensis* and *An. obscurus* and produce infective forms (i.e., sporozoites that can be inoculated in a mammalian host with the saliva during blood feeding). Although we do not have any evidence about the viability of such sporozoites, we hypothesize that these two mosquito species might contribute to the transmission of lineage B parasites.

Moreover, anopheline mosquitoes, but not vertebrate specimens, were infected also by two other Haemosporida lineages (C and D) that are phylogenetically related to lineages A and B (Figure 2). We found lineage C six times in *Anopheles* specimens belonging to three species: *An. coustani* (one specimen), *Anopheles marshallii* (three specimens) and *Anopheles moucheti* (two specimens). The identification of lineage C parasites in the salivary glands of *An. marshallii* (one specimen) and *An. moucheti* (one specimen) suggests a potential role as vectors. Conversely, we detected lineage D only in one *An. obscurus* specimen. For lineages C and D, the nature of their vertebrate host remains to be discovered. However, the parasites were recovered in *Anopheles* species that are known to have mainly a mammalophilic feeding

behavior [30]. This suggests that mosquitoes might have acquired such parasites from mammalian hosts.

Our findings highlight several features of the ecology of these lineages. First, these parasites are not host-specific because they can infect a variety of hosts, including different species of antelopes. The propensity of ungulate haemosporidian parasites to infect different hosts was previously described [27, 31, 32] and led to the hypothesis [27] that *P. cephalophi* and *P. brucei* could be more widely distributed and possibly present also in other African antelopes. Moreover, their host range might not be restricted only to antelopes because lineage B includes parasites detected also in other orders, such as Pholidotas (pangolin) or Primates (*Cercopithecus* sp.) [20]. Whether these non-ungulate species are frequent hosts of these lineages or only accidental hosts remains to be clarified. Previous studies on African monkeys rather support the second hypothesis because only one monkey, among the several hundred individuals studied, was found to be infected by parasites belonging to lineage B [20, 21].

Second, our results suggest that some sylvan *Anopheles* species could serve as vector for these lineages. Indeed, we found that at least four *Anopheles* species (two species for lineage B and two for lineage C) might support the transmission of this group of parasites in forests. Other *Anopheles* species also were infected by these lineages, but we currently have no evidence that they serve as vectors (the parasite *Cyt-b* gene sequence was detected only in the whole body and not in salivary glands). Very little is known about the biting behavior of sylvan *Anopheles* and about the vertebrate hosts that constitute their preferred source of blood [33]. Zoophilic species, such as *An. vinckei* and *An. gabonensis*, were previously shown to transmit zoonotic *Plasmodium* parasites, including those circulating among great apes and rodents [29, 33, 34]. Our study suggests that these species also bite ungulates. This indicates that, concerning their blood meal, *An. vinckei* and *An. gabonensis* are opportunistic rather than specialized. Such a propensity to bite a wide range of hosts is probably an adaptive trait in response to temporal

fluctuations of host diversity and density in forest environments. This feature could enhance the possibility for cross-species transfer of parasites and could explain the parasite propensity to infect different host species. In addition, the panel of *Anopheles* species infected by these newly described haemosporidian lineages encompassed mosquito species with a well-known anthropophilic feeding behavior (sometimes very pronounced, such as in *An. marshallii* or *An. mouchetii* [33]).

Finally a phylogenetic analysis of the relationship between the *Cyt-b* sequences of the haemosporidian parasites obtained in our study and reference sequences (Table S1) indicated that the phylogenetic position of the four newly described haemosporidian lineages was closer to bird parasites than to other mammalian parasites (Figure 2). According to the current Haemosporida classification, all species infecting mammals belong to different genera within the Plasmodiidae family [2]. However, molecular data are lacking for several species identified in bats or flying squirrels (e.g., *Biguetiella*, *Dionisia*, *Bioccala* and *Rayella*) and they were never included in modern phylogenies. Previous molecular-based studies proposed that most Plasmodiidae mammalian parasites (i.e., the genera *Plasmodium* and *Hepatocystis*) belong to a single monophyletic clade and are transmitted by anopheles (e.g., [24-26]), with the exception of some bat parasites (genera *Polychromophilus* and *Nycteria*). It was suggested that parasites of the genus *Polychromophilus* in bats could be the result of a secondary invasion of mammals and that they derived from avian or reptile parasites (sauropsid *Plasmodium*) and were transmitted by bat flies [35]. The origin of *Nycteria* parasites is less clear and needs to be further investigated. Particularly, it is unclear whether they represent another case of host switch or an ancient mammalian *Plasmodium* lineage. The surprising phylogenetic position close to bird parasites of the four lineages described in our study suggests that at least one additional invasion of mammals has occurred during the evolutionary history of Plasmodiidae. This invasion occurred in ungulates and could have been congruent with a switch to anopheline mosquitoes.

This scenario is robust because we observed a globally similar phylogenetic position of this new ungulate clade inside the *Polychromophilus*/sauropsid *Plasmodium* clade also when different rooting strategies were considered (Figure 2 and supplementary Figure 1). Whether this is another independent host switch from sauropsid *Plasmodium* or whether this clade is more related to *Polychromophilus* parasites remains to be further investigated. A remaining question concerns the origin of the four lineages and the roles played by the vertebrate hosts and their vectors in their evolution and diversification.

Besides these four lineages discovered in antelopes and/or sylvan mosquitoes, we identified two additional lineages in the bushmeat samples: one in a bird sample and the other in two tortoise specimens. The bird lineage was related to parasites of the *Haemoproteus* genus [36] and the turtle lineage to the *Haemocystidium* genus [2, 36]. More data on these groups of vertebrates are required to determine whether these last two lineages are new [2, 25, 36]. Indeed, the current data and those available in the literature are too scarce to conclude with confidence.

Conclusion

In this study, we identified four new haemosporidian molecular lineages that belong to the Plasmodiidae family and that might be transmitted by *Anopheles* mosquitoes. Concerning their vertebrate hosts, two of the lineages (A and B) can infect several mammalian species. The vertebrate hosts of the other two lineages (C and D) remain to be identified. None of these four lineages could be matched against reference sequences, although several species of haemosporidian parasites were previously described in African antelopes, but only based on their morphological features. As a consequence, and in agreement with other authors (e.g., [2]), we think that it is now crucial to rapidly undertake a complete re-evaluation of the taxonomy of these protozoa in the different groups of vertebrates with a particular attention to the genus *Plasmodium*. Indeed, this genus includes some species that are more genetically distant between

them than they are with species belonging to other genera. Ideally, this re-evaluation should be done using the different criteria of phenotypic similarities, the concept of biological species and, most importantly, the concept of phylogenetic species [2, 10]. Such a re-evaluation is critical to our understanding of host-pathogen evolution in this group of parasites.

Material and Methods

Wildlife screening

To analyze the diversity of haemosporidian parasites circulating among wild vertebrates in Gabon (Central Africa), we screened several bushmeat samples from wild animal species collected by the CIRMF (Centre International de Recherches Médicales de Franceville) in eight provinces of Gabon (Figure 1) between 2009 and 2013. Most bushmeat samples (n=347) were obtained from officers of the provincial direction of the Gabon Ministry of Water Affairs and Forestry after their seizure because of illegal hunting and 145 from bushmeat salesmen during hunting periods. Species identification was performed by visual inspection according to the Kingdom Field Guide to African Mammals [37] and the “Guide des Reptiles du Gabon” [38]. Biological samples of interest (whole blood, liver or spleen) were taken and kept in liquid nitrogen until delivery to the CIRMF where they were stored at -80°C for molecular analyses. For each selected animal, total DNA was extracted from approximately 200µl of blood or 100mg of liver/spleen according to the procedures described in [21] and [39], respectively.

Ethic statement

The study was conducted in Gabon outside protected areas. All samples were collected from dead animals only (bushmeat). Some animal carcasses confiscated from poachers by Gabonese authorities (Fauna and Hunting Department, Ministry of Water Affairs and Forestry,

Environment and Sustainable development of Gabon) belonged to protected species (e.g., water chevrotain). Samples obtained from bushmeat salesmen were all collected during the authorized hunting season of non-protected species only and only in public markets. No money was given to the salesmen in exchange of the pieces of tissues from the animals. All samples were collected for a CIRMF project aiming at identifying the natural reservoir of Ebola virus. New samples were not collected for this study. All work was carried out with the authorization from the Gabonese Ministry of Water Affairs and Forestry (Département de la Faune et de la Chasse - Authorization N°005/MEFEDD /SG/DGEF/PEFWN, N°001/MEFEDD/SG/DGEF/PEENY, N°108/MEFEDD/SG/DGEF/ PEFOL and N°016/MEFEDD/SG/DGEF/PEFMO) and the Gabonese Ministry of Higher Education, Scientific Research and Innovation (Centre National de la Recherche Scientifique et Technique - Authorization N°AR0031/09 /MENESRESI/CENAREST/CG/CST/CSAR).

Mosquito sampling

Mosquitoes were sampled in two wildlife reserves in Gabon: the Lopé National Park (Ogooué-Ivindo province) and the private park of La Lékédi, near Bakoumba (Haut-Ogooué province). At both sites (Figure 1), we carried out a longitudinal survey of sylvan *Anopheles* using CDC light traps placed in several sites of the forest between 5pm to 7am from October 2012 to December 2013. Mosquitoes were morphologically identified using identification keys [40]. Salivary glands of females *Anopheles* were separated from the rest of the body. All samples were stored in liquid nitrogen and transferred to the CIRMF where they were kept at -80°C. In total, 2,184 females of *Anopheles* were collected that belonged to 17 species. *An. marshallii* (47.9%), *An. vinckei* (20.7%) and *An. moucheti* (15.1%) mosquitoes constituted most of the captures. The other *Anopheles* (14%) belonged to other species and only 2.3% of *Anopheles* could not be identified (Figure 3).

Molecular analyses

Total DNA was extracted from bushmeat tissues, mosquito bodies and salivary glands with the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) and used as template for the PCR-based detection of haemosporidian parasites. For this, we used a previously described protocol [16] based on the amplification and sequencing of a portion of the parasite *Cyt-b* gene. All amplified products (10 µl) were run on 1.5% agarose gels in TBE buffer. Amplicons were then sequenced by Eurofins MWG (Germany).

For species identification, each sequence was compared to a list of reference sequences obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) (Supplementary Table 1). Because amplicons with chimeric sequences can form during PCR amplification of DNA from samples with multiple infections, similarity plot analyses were performed on the nucleotide alignments generated with the new and all reference sequences using the SIMPLOT package version 2.5 [41] and a sliding window of 80 nucleotides (nt) moved in steps of 10 nt. Once verified that the amplicons did not contain chimeric sequences, phylogenetic analyses were done after multiple alignments of the obtained partial *Cyt-b* sequences (705 nucleotides) and of the Genbank reference sequences using ClustalW (v 1.8.1 in BioEdit v.7.0.9.0. Software) [42]. Maximum Likelihood (ML) methods were used for tree construction [16]. The best-fitting ML model based on the Akaike Information Criterion was GTR (General Time Reversible) + Gamma + I (invariant sites), as determined using ModelTest [43]. The highest-likelihood DNA tree and the corresponding bootstrap support values were obtained by using PhyML [44, 45] (freely available at the ATGC bioinformatics platform <http://www.atgc-montpellier.fr/>) using NNI (Nearest Neighbor Interchange) + SPR (Subtree Pruning Regrafting) branch swapping and 100 bootstrap replicates. Recently, the choice of outgroup to use to root the tree of haemosporidian species has been a matter of debate. In our study, ML trees were rooted: (i)

using *Toxoplasma* spp. and *Eimeria* spp.; and (ii) using *Leucocytozoon* spp. Finally, BEAST [46] was used to implement a Bayesian outgroup-free method to construct the tree with relaxed molecular clock assumptions with the following priors: GTR+G [four categories] + I, Yule tree prior, 10 000 000 generations, sampling every 1000th tree with 10% Burn in. One advantage of estimating a phylogeny using a relaxed clock is that an estimate of the position of the tree root can be obtained.

Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Authors' contributions

LB, BO, FP, VB, VR, BMO, EL, BM and CP contributed to the acquisition of samples in fieldwork; LB, APO, NDM, LDL, LYM, CA, PD, CTB, BM, CP, and FR analysed and interpreted the data; LB, BM, BO, CTB, FR, FP and CP conducted and supervised this work; LB, BM, FP, and CP wrote this paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Authors thank the four reviewers for their comments on a previous version of the manuscript as well as Philippe Christe for helpful discussions. The study was funded by the Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF, Gabon), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), the Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant ORIGIN JCJC 012). We thank all the people involved in sampling and the Gabonese National Agency of the National Parks. L.B. was financed by an ANBG scholarship.

References

1. WHO. WORLD MALARIA REPORT. 2013. Geneva World Health Organization 2013.
2. Perkins SL. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. *The Journal of parasitology*. 2014;100(1):11-25. Epub 2013/09/26. doi: 10.1645/13-362.1. PubMed PMID: 24059436.
3. Keeling PJ, Rayner JC. The origins of malaria: there are more things in heaven and earth. *Parasitology*. 2014;1-10. Epub 2014/06/26. doi: 10.1017/S0031182014000766. PubMed PMID: 24963725.
4. Valkiunas G, Sehgal RN, Iezhova TA, Smith TB. Further observations on the blood parasites of birds in Uganda. *Journal of wildlife diseases*. 2005;41(3):580-7. Epub 2005/10/26. doi: 10.7589/0090-3558-41.3.580. PubMed PMID: 16244068.
5. Garnham PC. Immunity against the different stages of malaria parasites. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1966;59(4):549-57. Epub 1966/07/01. PubMed PMID: 6014215.
6. Duval L, Mejean C, Maganga GD, Makanga BK, Mangama Koumba LB, Peirce MA, et al. The chiropteran haemosporidian *Polychromophilus melanipherus*: a worldwide species complex restricted to the family Miniopteridae. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(7):1558-66. Epub 2012/06/23. doi: 10.1016/j.meegid.2012.06.006. PubMed PMID: 22721902.
7. Landau I, Miltgen F, Boulard Y, Chabaud AG, Baccam D. Study of gametocytes from the *Plasmodium* "vivax" group: morphology, development in *Anopheles* and infectivity of *Plasmodium yoelii* microgametocytes. *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1979;54(2):145-61. Epub 1979/03/01. PubMed PMID: 539716.
8. Landau I, Miltgen F, Boulard Y, Chabaud AG, Baccam D. New data on the biology of gametocytes of *Plasmodium yoelii yoelli* gathered from morphological characteristics

indicating their age. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences Serie D, Sciences naturelles*. 1979;288(5):521-2. Epub 1979/02/05. PubMed PMID: 108020.

9. Landau I, Chabaud AG, Miltgen F, Baccam D. *Dionisia bunoi* n. g. n. sp., Haemoproteidae parasite of the microchiropteran bat *Hipposideros cyclops* in Gabon *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1980;55(3):271-80. Epub 1980/05/01. PubMed PMID: 6773461.

10. Perkins SL. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2000;267(1459):2345-50. Epub 2001/06/21. doi: 10.1098/rspb.2000.1290. PubMed PMID: 11413654; PubMed Central PMCID: PMC1690816.

11. MANWELL RD. Malaria infections by four species of *plasmodium* in the duck and chicken, and resulting parasite modifications. *American Journal of Epidemiology*. 1943;38(2):211-22.

12. JORDAN HB. The Effect of Host Constitution on the Development of *Plasmodium floridense**. *The Journal of protozoology*. 1975;22(2):241-4.

13. Martinsen ES, Waite JL, Schall JJ. Morphologically defined subgenera of *Plasmodium* from avian hosts: test of monophyly by phylogenetic analysis of two mitochondrial genes. *Parasitology*. 2007;134(Pt 4):483-90. Epub 2006/12/07. doi: 10.1017/S0031182006001922. PubMed PMID: 17147839.

14. Bensch S, Waldenstrom J, Jonzen N, Westerdahl H, Hansson B, Sejberg D, et al. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J Anim Ecol*. 2007;76(1):112-22. Epub 2006/12/23. doi: 10.1111/j.1365-2656.2006.01176.x. PubMed PMID: 17184359.

15. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010;467(7314):420-5.

Epub 2010/09/25. doi: 10.1038/nature09442. PubMed PMID: 20864995; PubMed Central PMCID: PMC2997044.

16. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1458-63. Epub 2010/02/06. doi: 10.1073/pnas.0914440107. PubMed PMID: 20133889; PubMed Central PMCID: PMC2824423.

17. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, Andre C, Halbwax M, et al. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS pathogens*. 2010;6(2):e1000765. Epub 2010/02/20. doi: 10.1371/journal.ppat.1000765. PubMed PMID: 20169187; PubMed Central PMCID: PMC2820532.

18. Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, et al. The origin of malignant malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(35):14902-7. Epub 2009/08/12. doi: 10.1073/pnas.0907740106. PubMed PMID: 19666593; PubMed Central PMCID: PMC2720412.

19. Prugnolle F, Ayala F, Ollomo B, Arnathau C, Durand P, Renaud F. *Plasmodium falciparum* is not as lonely as previously considered. *Virulence*. 2011;2(1):71-6. Epub 2011/01/13. PubMed PMID: 21224722.

20. Ayoub A, Mouacha F, Learn GH, Mpoudi-Ngole E, Rayner JC, Sharp PM, et al. Ubiquitous *Hepatic* infections, but no evidence of *Plasmodium falciparum*-like malaria parasites in wild greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*). *International journal for parasitology*. 2012;42(8):709-13. Epub 2012/06/14. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.05.004. PubMed PMID: 22691606; PubMed Central PMCID: PMC3751399.

21. Prugnolle F, Ollomo B, Durand P, Yalcindag E, Arnathau C, Elguero E, et al. African monkeys are infected by *Plasmodium falciparum* nonhuman primate-specific strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(29):11948-53. Epub 2011/07/07. doi: 10.1073/pnas.1109368108. PubMed PMID: 21730135; PubMed Central PMCID: PMC3141972.
22. Schaer J, Perkins SL, Decher J, Leendertz FH, Fahr J, Weber N, et al. High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(43):17415-9. Epub 2013/10/09. doi: 10.1073/pnas.1311016110. PubMed PMID: 24101466; PubMed Central PMCID: PMC3808598.
23. Boundenga L, Ollomo B, Rougeron V, Mouele L, Mve-Ondo B, Delicat-Loembet L, et al. Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon. *Malaria journal*. 2015;14(1):111.
24. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(14):8124-9. Epub 1998/07/08. PubMed PMID: 9653151; PubMed Central PMCID: PMC20940.
25. Perkins SL, Schall JJ. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *The Journal of parasitology*. 2002;88(5):972-8. Epub 2002/11/19. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0972:ampomp]2.0.co;2. PubMed PMID: 12435139.
26. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2008;47(1):261-73. Epub 2008/02/06. doi: 10.1016/j.ympev.2007.11.012. PubMed PMID: 18248741.

27. Garnham PC, Kuttler KL. A malaria parasite of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and its relation with known species of *Plasmodium* in other ungulates. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society (Great Britain)*. 1980;206(1165):395-402. Epub 1980/01/17. PubMed PMID: 6102388.
28. Keymer IF. Investigations on the duiker (*Sylvicapra grimmia*) and its blood protozoa in Central Africa. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1969;255(798):33-108.
29. Rahola N, Makanga B, Yangari P, Jiolle D, Fontenille D, Renaud F, et al. Description of *Anopheles gabonensis*, a new species potentially involved in rodent malaria transmission in Gabon, Central Africa. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014. Epub 2014/05/21. doi: 10.1016/j.meegid.2014.05.012. PubMed PMID: 24840150.
30. Bruce-Chwatt LJ, Garrett-Jones C, Weitz B. Ten years' study (1955-64) of host selection by anopheline mosquitos. *Bulletin of the World Health Organization*. 1966;35(3):405-39. Epub 1966/01/01. PubMed PMID: 5297635; PubMed Central PMCID: PMCPMC2476083.
31. Garnham PC. Malaria as a medical and veterinary zoonosis. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1969;62(2):325-32. Epub 1969/01/01. PubMed PMID: 4397210.
32. Keymer IF. Studies on *Plasmodium* (*Vinckeia*) *cephalophi* of the grey duiker (*Sylvicapra grimmia*). *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1966;60(2):129-38. Epub 1966/06/01. PubMed PMID: 5962467.
33. Paupy C, Makanga B, Ollomo B, Rahola N, Durand P, Magnus J, et al. *Anopheles moucheti* and *Anopheles vinckei* are candidate vectors of ape *Plasmodium* parasites, including *Plasmodium praefalciparum* in Gabon. *PloS one*. 2013;8(2):e57294. Epub 2013/02/26. doi:

10.1371/journal.pone.0057294. PubMed PMID: 23437363; PubMed Central PMCID: PMC3577705.

34. Gilles HM. Malaria. Tropical diseases bulletin. 1968;65(3):213-8. Epub 1968/03/01. PubMed PMID: 4869999.

35. Witsenburg F, Salamin N, Christe P. The evolutionary host switches of *Polychromophilus*: a multi-gene phylogeny of the bat malaria genus suggests a second invasion of mammals by a haemosporidian parasite. Malaria journal. 2012;11:53. Epub 2012/02/24. doi: 10.1186/1475-2875-11-53. PubMed PMID: 22356874; PubMed Central PMCID: PMCPmc3342143.

36. Pineda-Catalan O, Perkins SL, Peirce MA, Engstrand R, Garcia-Davila C, Pinedo-Vasquez M, et al. Revision of hemoproteid genera and description and redescription of two species of chelonian hemoproteid parasites. The Journal of parasitology. 2013;99(6):1089-98. Epub 2013/09/17. doi: 10.1645/13-296.1. PubMed PMID: 24032642.

37. Kingdon J. The kingdon Field Guide to africain Mammals. Academic Press. 1997.

38. Pauwels Olivier S. G. VwJP. Les Reptiles Du Gabon (French)Paperback use preformatted date that complies withlegalrequirementfrom media matrix 2008;(978-1893912014):298 pages.

39. Maganga GD, Verrier D, Zerbinati RM, Drosten C, Drexler JF, Leroy EM. Molecular typing of PPRV strains detected during an outbreak in sheep and goats in south-eastern Gabon in 2011. Virology journal. 2013;10:82. Epub 2013/03/19. doi: 10.1186/1743-422x-10-82. PubMed PMID: 23497402; PubMed Central PMCID: PMCPmc3599724.

40. Coetzee GMT. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg. 1987;55:1-139.

41. Ray S. SimPlot for Windows 95/98/NT, 2.5 edn. Distributed by the author: <http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/>. 1999.
42. Hall TA, editor BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series; 1999.
43. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14(9):817-8. Epub 1999/01/27. PubMed PMID: 9918953.
44. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010;59(3):307-21. Epub 2010/06/09. doi: 10.1093/sysbio/syq010. PubMed PMID: 20525638.
45. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008/04/22. doi: 10.1093/nar/gkn180. PubMed PMID: 18424797; PubMed Central PMCID: PMC2447785.
46. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*. 2012;29(8):1969-73. Epub 2012/03/01. doi: 10.1093/molbev/mss075. PubMed PMID: 22367748; PubMed Central PMCID: PMC3408070.

Figure legends

Figure 1. Location of the Gabon provinces where bushmeat samples were collected (OL: Ogooue-Lolo; OM: Ogooue-Maritime, OI: Ogooue-Ivindo, NG: Ngounie; NY: Nyanga; HO: Haut-Ogooue; MO: Moyen-Ogooue; WN: Woleu-Ntem) and of the two wildlife reserves where the longitudinal survey of sylvan *Anopheles* was carried out (LOP: La Lopé and LEK: La Lékédi).

Figure 2. Phylogenetic relationships between the *Cyt-b* sequences of haemosporidian parasites obtained in our study and reference *Cyt-b* sequences (names in black) from existing databases. The tree was constructed using a Bayesian outgroup-free method with relaxed molecular clock assumptions. The names of our isolates include: 1) the abbreviation of the sampling site (LOP: La Lopé and LEK: Lékédi) or province (OL: Ogooue-Lolo; OM: Ogooue-Maritime, OI: Ogooue-Ivindo, NG: Ngounie; NY: Nyanga; HO: Haut-Ogooue; MO: Moyen-Ogooue; WN: Woleu-Ntem), 2) the sample number, 3) the name of the host species in which it was found (vertebrate host or anopheles) (for instance, OL115-*Cephalophus monticola*), 4) SG if the parasite was detected in the salivary glands (for anopheles only). The tree was built based on 757 bp-long *Cyt-b* sequences. Branch colors indicate different groups of vertebrates. More details on the different reference sequences can be found in Supplementary Table 1.

Figure 3. Diversity of *Anopheles* mosquitoes collected in the two wildlife reserves (La Lopé and La Lékédi) in Gabon from October 2012 to December 2013. Only species representing more than 1% of the entire population are indicated. The other species are grouped in the “other species” category.

Figure 1

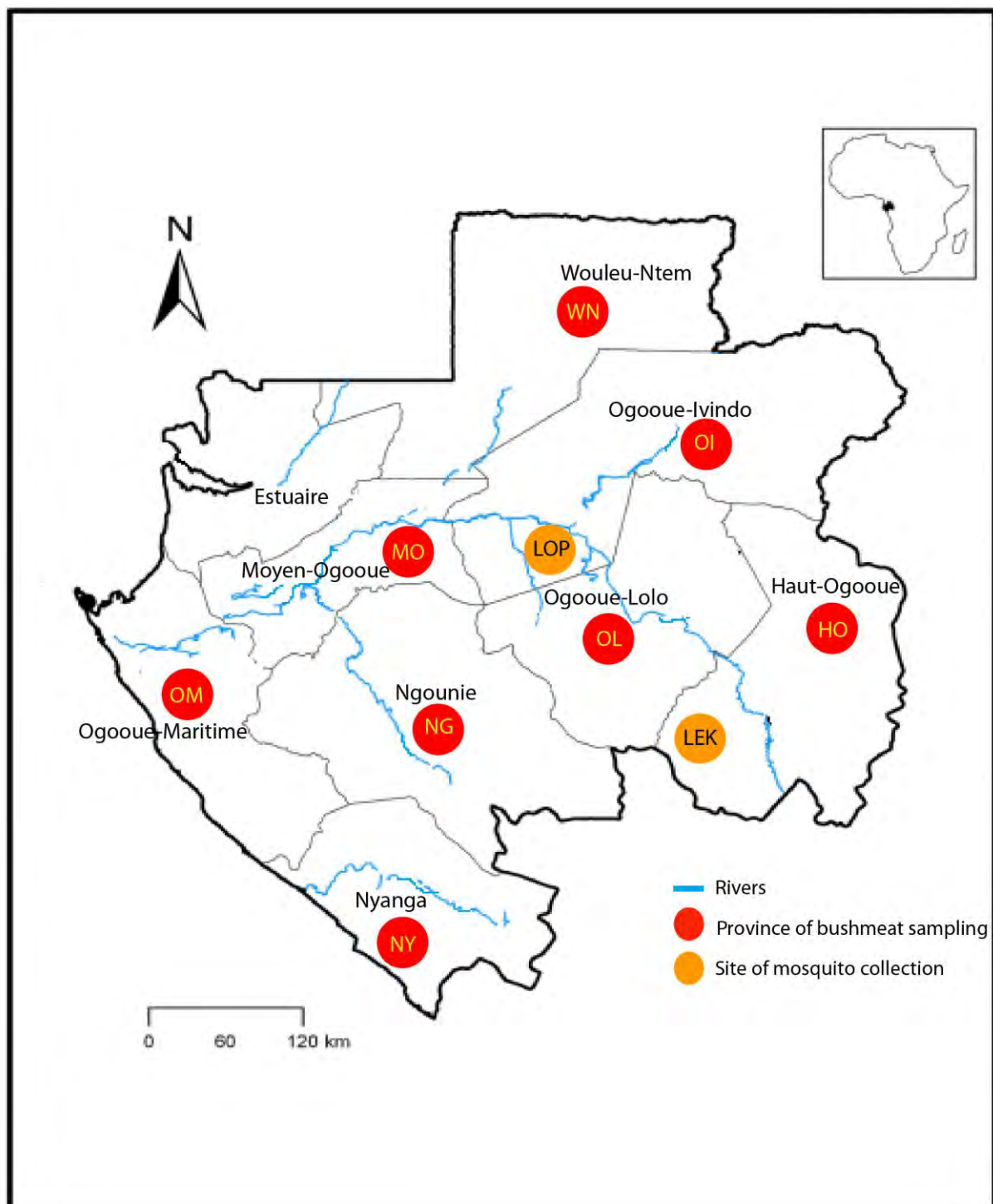


Figure 2

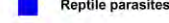


Figure 3

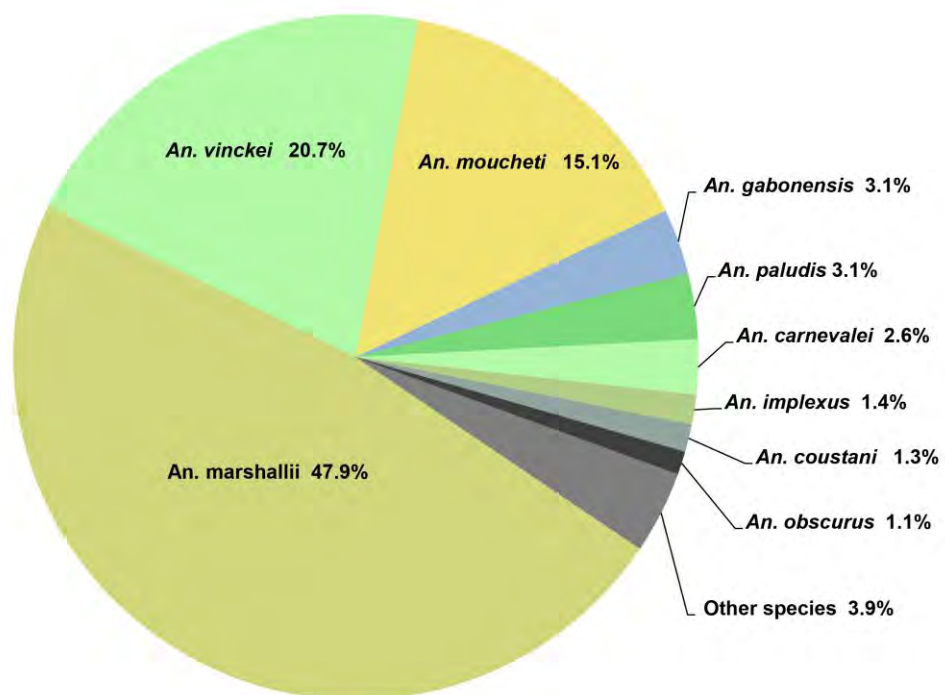


Table 1. Host species screened for the presence of haemosporidian parasites, number of tested vertebrate samples and number of specimens harboring a parasitic cytochrome B (*Cyt-b*) gene sequence and parasite lineage.

Vertebrate class	Common Name	Host species	Tested specimens	<i>Cyt-b</i> -positive specimens	Haemosporidian lineage (n. of positive samples)
Mammals	Peters's duiker	<i>Cephalophus callipygus</i>	19	1	Lineage A (1)
	Black-fronted duiker	<i>Cephalophus nigrifrons</i>	6	1	Lineage A (1)
	Blue duiker	<i>Cephalophus monticola</i>	170	13	Lineage A (7)
					Lineage B (6)
	Bay duiker	<i>Cephalophus dorsalis</i>	59	12	Lineage B (12)
	Pangolin	<i>Phataginus tricuspis</i>	38	1	Lineage B (1)
	Sitatunga	<i>Tragelaphus spekei</i>	10	-	
	Red river hog	<i>Potamochoerus porcus</i>	10	-	-
	African brush-tailed porcupine	<i>Atherurus africanus</i>	68	-	-
	African civet	<i>Civettictis civetta</i>	8	-	-
	African palm civet	<i>Nandinia binotata</i>	25	-	-
	Water chevrotain	<i>Hyemoschus aquaticus</i>	9	-	-
	African bush squirrel	<i>Paraxerus poensis</i>	6	-	-
Birds	Gambian pouched rat	<i>Cricetomys gambianus</i>	10	-	-
	Black guineafowl	<i>Agelastes niger</i>	10	-	-
	Black-casqued hornbill	<i>Ceratogymna atrata</i>	9	1	<i>Haemoproteus</i> -like (1)
Reptiles	African collared dove	<i>Streptopelia roseogrisea</i>	2	-	-
	Forest hinge-back tortoise	<i>Kinixys erosa</i>	14	2	<i>Haemocystidium</i> -like (2)
	Nile monitor	<i>Varanus niloticus</i>	4	-	-
	Dwarf crocodile	<i>Osteolaemus tetraspis</i>	7	-	-
	African rock python	<i>Python sebae</i>	6	-	-

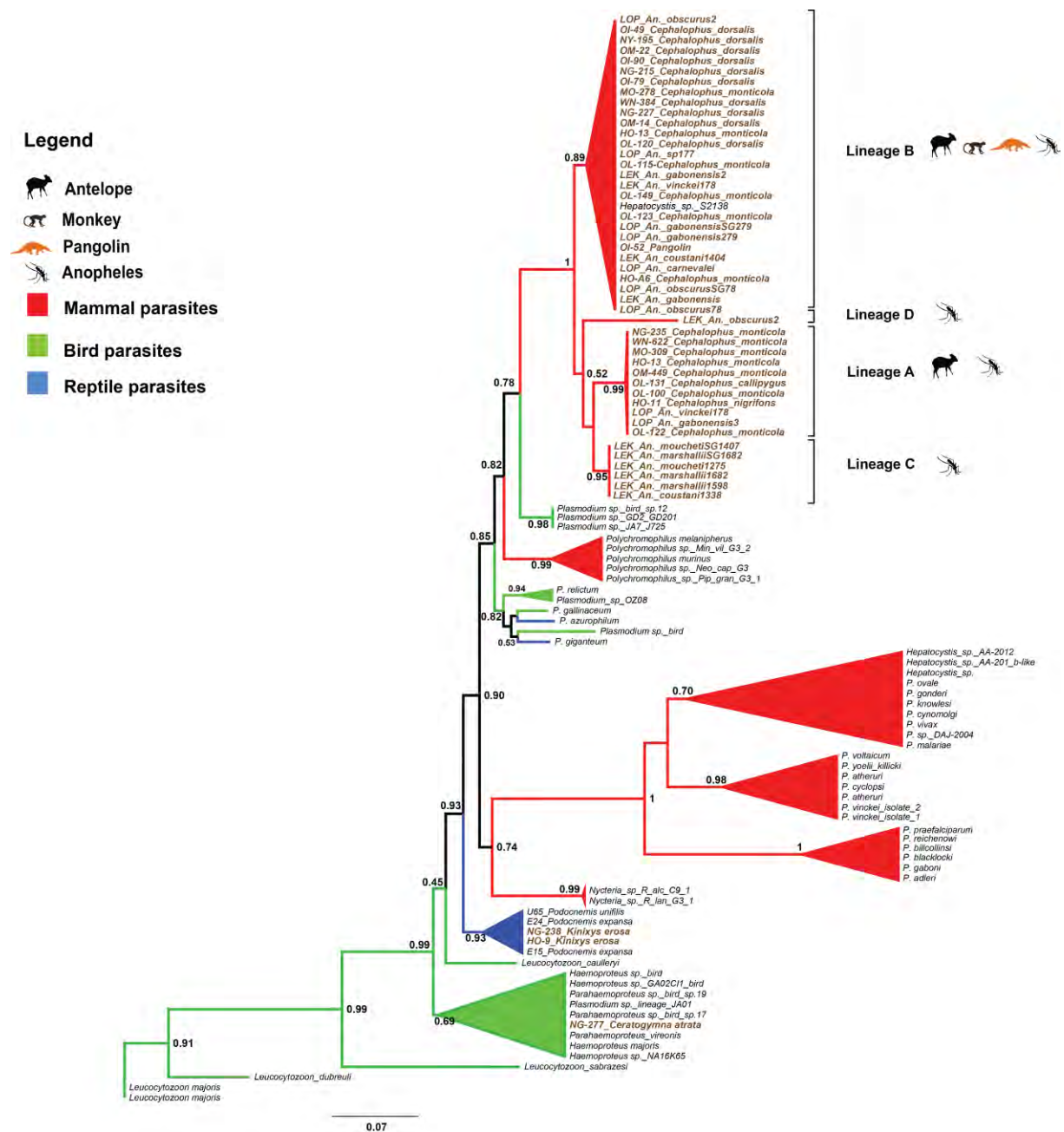
Supplementary data

Figure legend

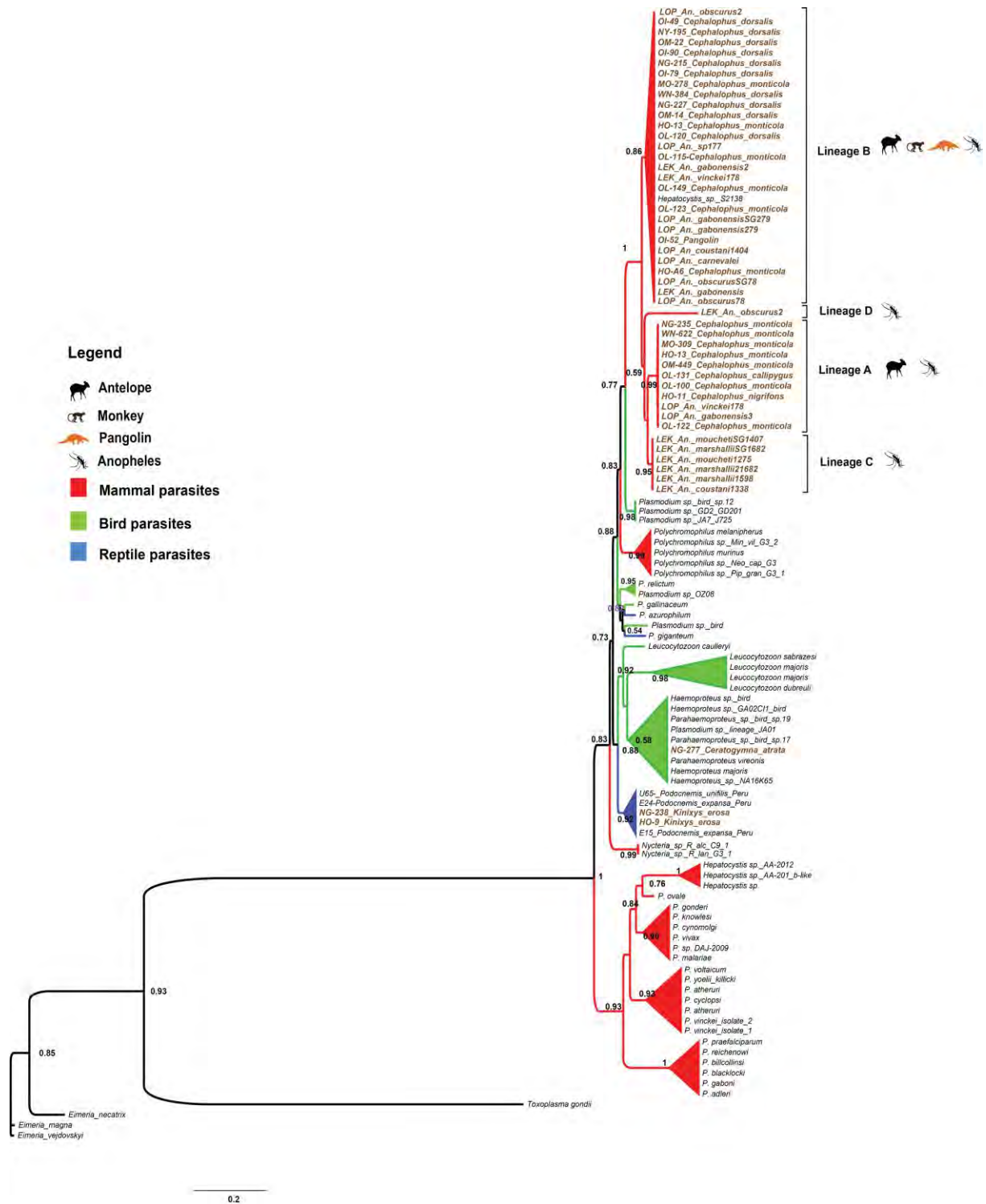
Figure 1

Phylogenetic relationships between the *Cyt-b* sequences obtained in our study (in brown) and reference sequences from existing databases. The trees were built based on 757 bp long cytochrome B (*Cyt-b*) sequences using Maximum Likelihood methods. Branch colors indicate different groups of vertebrates. A) the maximum likelihood tree was rooted using *Leucocytozoon* spp.. B) the tree was rooted using *Eimeria* spp. The names of our isolates include: 1) the abbreviation of the sampling site (LOP: La Lopé and LEK: Lékédi) or province (OL: Ogooue-Lolo; OM: Ogooue-Maritime, OI: Ogooue-Ivindo, NG: Ngounie; NY: Nyanga; HO: Haut-Ogooue; MO: Moyen-Ogooue; WN: Woleu-Ntem), 2) the sample number and 3) the name of the host species in which it was found (vertebrate host or anopheles) (for instance, OL115-*Cephalophus monticola*), 4) SG if the parasite was detected in the salivary glands (for anopheles only).

Supplementary Figure 1 A



Supplementary Figure 1 B



QUATRIEME PARTIE

***DISCUSSION ET
CONCLUSION***

DISCUSSION GÉNÉRALE

Mon travail de thèse qui avait pour but de «Déterminer la diversité plasmodiale chez les PNH du Gabon, de comprendre leur écologie et de mettre en évidence les éventuels transferts inter-espèce» a été mené sur des populations de primates non-humains (sauvages, en semi-liberté et en captivité) et sur des populations humaines vivant en contact étroit avec ces PNH. Il a également porté sur d'autres espèces de la faune sauvage du Gabon. Elle apporte une pierre à l'édifice pour une meilleure compréhension de ces agents pathogènes, leur distribution et leur transmission. Il doit inciter à la mise en place d'une veille sanitaire dans cette région d'Afrique malheureusement «riche» en pathogènes en général et en particulier en *Plasmodium*. Les principaux résultats obtenus lors de ce travail de thèse sont discutés ci-dessous.

Diversité de *Plasmodium* en circulation chez les primates non humains

À l'aide des méthodes non-invasives et invasives de collecte d'échantillons combinées aux outils moléculaires, nous avons mis en évidence la diversité des *Plasmodium spp* en circulation chez les primates non-humains au Gabon (**Articles 1 et 2**). Les lignées plasmodiales répertoriées appartiennent à deux sous genres, le sous genre *Laverania* et le sous genre *Plasmodium* (Gonzalez et al., 2013).

Six espèces au minimum de *Laverania* circulent chez les primates non-humains, notamment chez les grands singes (gorilles et chimpanzés) du Gabon : *P. gaboni*, *P. reichenowi* et *P. billcollinsi* pour les chimpanzés et chez les gorilles nous avons également trois espèces : *P. adleri*, *P. blacklocki* et *P. praefalciparum* qui est le plus proche parent de *P. falciparum* qui infecte les hommes. Le sous genre *Plasmodium* est représenté par les variants de trois lignées qui infectent l'Homme, il s'agit notamment de *P. ovale-like*, *P. malariae-like* et *P. vivax-like* qui infectent gorilles et chimpanzés, mais aussi, deux espèces (*P. gonderi* et *P. sp. Daj-2004*) de ce sous genre circulent chez les petits singes du Gabon. Ainsi, au moins 11 lignées plasmodiales circulent chez les PNH du Gabon.

Nos résultats sont en accord avec les études récentes qui décrivent une diversité plasmodiale exceptionnelle chez les singes africains (Rayner et al., 2011, Liu et al., 2010, Prugnolle et al., 2010, Kaiser et al., 2010). Cette diversité est plus prononcée chez les grands singes avec environ 9 espèces plasmodiales en circulation au Gabon, tandis que les petits singes sont infectés par deux espèces du sous genre *Plasmodium*. Il a été rapporté une infection à *P. praefalciparum* chez un *Cercopithecus nictitans* au Gabon en 2011 (Prugnolle et al., 2011d).

Comment s'est mise en place une si grande diversité chez les grands singes au cours de leur histoire évolutive ?

Concernant l'origine de la diversité des espèces du sous-genre *Laverania*, nous pensons que l'existence d'une telle diversité plasmodiale serait le résultat d'une très longue histoire évolutive entre *Plasmodium* et hôtes (Anophèles et vertébrés). En effet la dépendance de ce parasite à ses hôtes induit nécessairement que son évolution est intimement liée à celle de ces derniers. Ainsi au cours de l'évolution du système hôte/parasite, les protagonistes vont évoluer, se diversifier et voir leur association se pérenniser ou être perdue. Nous pensons que la situation actuelle observée chez les grands singes pourrait s'expliquer par trois événements évolutifs : la cospéciation, un changement d'hôtes et encore la duplication (spéciation indépendante) (Prugnolle et *al.*, 2011a, Giraud et *al.*, 2008).

La (i) cospéciation peut être à l'origine d'une telle diversité, dans le cas d'une spéciation de l'hôte qui entraîne également une spéciation concomitante⁹ du parasite. Cette situation peut se produire lors d'une spéciation allopatrique¹⁰ de l'hôte qui est le fruit d'une barrière géographique conduisant à un isolement des populations. Mais elle peut s'étendre à toutes barrières extrinsèques comme par exemple le vecteur qui a un rôle important dans la circulation des parasites. En effet, si les vecteurs sont des espèces de moustiques différentes suivant les espèces hôtes, les *Plasmodium* ne pourront pas changer d'espèces hôtes même si plusieurs espèces sont sympatriques¹¹ (Giraud, 2006a, Giraud, 2006b).

Le deuxième événement qui pourrait être à l'origine de cette diversité est (ii) un changement d'hôtes c'est-à-dire à la colonisation d'un nouvel hôte par un parasite. Le troisième et dernier événement évolutif pouvant expliquer la diversité du sous genre *Laverania* est (iii) la duplication ou encore spéciation indépendante qui se réfère à une spéciation du parasite au sein d'un hôte, en absence de spéciation de l'hôte. Cette situation peut se produire lorsque le flux de gènes entre populations de parasites est moindre qu'entre populations d'hôtes.

Ainsi, ces phénomènes énumérés au-dessus peuvent être à l'origine de l'extraordinaire diversité de *Plasmodium* rencontré chez les grands singes africains. Toutefois, selon nous le phénomène de cospéciation ne pourrait pas être à l'origine de cette diversité, car si la cospéciation était à l'origine de cette diversité, la phylogénie des parasites répondrait à la

⁹ Concomitante : qui se produit en même temps

¹⁰ Allopatrie est l'isolement géographique de deux populations d'une même espèce

¹¹ Sympatrique : désigne l'existence de deux espèces phylogénétiquement proches, vivant sur un même territoire, mais n'ayant pas de descendance.

phylogénie des hôtes, ce qui n'est pas le cas au regard de phylogénie actuelles (voir (Boundenga et al., 2015, Prugnolle et al., 2011b, Prugnolle et al., 2010)). Cette diversité serait alors, le résultat d'évènements plus complexe qui se seraient produit il y a très longtemps. Les évènements évolutifs comme le saut d'hôte (changement d'hôtes) et la spéciation allopatrique expliqueraient mieux cela. Néanmoins des études poussées de datation par exemple des différents évènements seraient adaptés pour éclairer cette hypothèse. Il faudrait également mieux comprendre l'histoire évolutive des différentes espèces hôtes (gorilles, chimpanzés et vecteurs).

Du point de vue écologique, pour ce qui est des parasites du sous genre *Laverania*, aucune espèce n'a été trouvée capable d'infecter les deux hôtes (chimpanzés et gorilles) en milieu naturel. L'hypothèse défendue par certains est qu'il existe une spécificité d'hôte apparente chez les parasites dudit groupe (Wanaguru et al., 2013, Rayner et al., 2011, Liu et al., 2010) et que celle-ci serait régit par des mécanismes d'interaction entre certaines protéines qui seraient situées à la surface du parasite et d'autre protéines situées à la surface des cellules hôtes (Wright and Rayner, 2014).

Il a été suggéré que c'est l'antigène majeur-175 (*EBA-175*) du parasite et les glycophorines-A de l'hôte qui seraient à l'origine de cette spécificité d'hôte (Martin et al., 2005). Cette hypothèse a toutefois été remise en cause par des études récentes qui suggèrent que c'est l'interaction entre RH5 (Reticulocyte binding protein homologue 5) chez le parasite et BSG (la basiginine) chez l'hôte qui serait impliquée dans la spécificité d'hôte (Otto et al., 2014, Wright and Rayner, 2014, Wanaguru et al., 2013). Nous pensons que, les facteurs génétiques ne seraient pas les seuls facteurs responsables de la spécificité hôtes chez les *Laverania*, mais que des facteurs écologiques comme l'occupation du milieu par les espèces hôtes, ou les préférences trophiques des vecteurs pourraient avoir un rôle à jouer dans cette spécificité (Boundenga et al., 2015, Paupy et al., 2013, Prugnolle et al., 2011a).

Curieusement, pour ce qui est des parasites du sous-genre *Plasmodium* (non-*Laverania*), ils semblent ne pas présenter de difficultés à infecter les gorilles et les chimpanzés. Une étude récente fait ainsi état de la capacité de *P. knowlesi* à s'adapter pour infecter les globules rouges de tout âge, pour permettre leur prolifération au sein de l'hôte (Paul et al., 2015, Lim et al., 2013). Au regard des données actuelles sur *P. vivax* dont l'invasion de globule rouge est déterminé par la présence de récepteurs Duffy (Choe et al., 2005, Chitnis and Miller, 1994) qui sont les seuls portes d'entrée de ce parasites connue. Si *P. vivax* est trouvé chez les gorilles,

chimpanzés ou même chez les populations caucasiennes comme le révèle une étude récente (Prugnolle et *al.*, 2013), cela suggérerait que ces hôtes possèdent les récepteurs qui facilitent son introduction dans les hématies. *P. malariae* et *P. ovale* restent peu connues et aucune étude n'a examiné leurs caractéristiques moléculaires (Délicat-Loembet et *al.*, 2015). Nous en connaissons peu sur l'interaction de ces parasites avec les cellules de l'hôte, alors nous pensons que des études complémentaires doivent être faites afin d'estimer leur potentiel zoonotique et avoir une meilleure compréhension de ces parasites qui semblent être négligés.

Transfert inter espèce chez les hominidés

Cependant malgré la spécificité d'hôte observée chez les *Plasmodium spp* du sous-genre *Laverania* en milieu naturel, nous avons mis en évidence des échanges de parasites entre chimpanzés et gorilles, entre homme et chimpanzé et mais aussi entre Homme et mandrill (Figure 34).

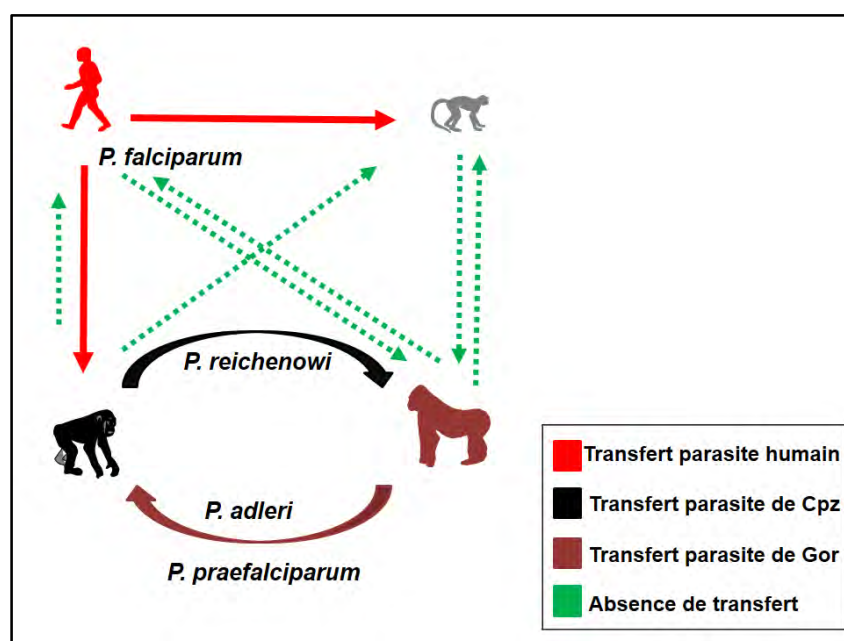


Figure 34: Schéma retraçant les transferts observés durant l'étude

Sachant que le transfert d'un parasite d'un hôte à l'autre dépend d'une combinaison de plusieurs facteurs tant écologiques que génétiques. En effet, cela nécessite (i) tout d'abord, d'avoir un contact de l'hôte receveur avec le nouvel agent infectieux, (ii) la transmission de l'espèce hôte donneur vers l'hôte receveur. Dans le cas des espèces de *Plasmodium*, cette étape

nécessite l'intervention d'un hôte de médiation qui est un moustique vecteur. (iii) enfin, le passage de la barrière d'espèces.

Des études, en plus de la nôtre (**Article 2**), montrent que le franchissement de barrière d'hôte par *P. falciparum* dans un environnement où PNH et Homme sont contraints à vivre ensemble est possible (Pacheco et al., 2013, Duval et al., 2010, Krief et al., 2010). Nous pensons que l'aptitude qu'a ce parasite à franchir les barrières d'hôtes est due à sa forte variabilité génétique, qui lui confère une capacité d'adaptation extraordinaire à de nouveaux environnements hétérogènes (Mackinnon and Marsh, 2010, Gardner et al., 2002) (Gardner et al., 2002, Mackinnon and Marsh, 2010). L'absence d'infection à *P. falciparum* chez les gorilles s'expliquerait par le fait que la BSG (Basigin) qui détermine le tropisme de ce parasite serait trop différente de celle qu'on trouve chez l'homme chez cette espèce (Wanaguru et al., 2013) conduisant à une interaction (PfRH5-BSG_{gorille}) de mauvaise qualité.

Pour ce qui est des échanges entre grands singes, l'absence de transferts en milieux naturels serait due au fait que ces conditions énumérées au-dessus ne sont que très rarement réunies. Par contre dans les environnements confinés type sanctuaires, il est possible d'enregistrer des échanges de pathogènes car les espèces sont contraintes de vivre ensembles. Ce qui pourrait soutenir le rôle de facteurs écologiques dans le transfert de *Plasmodium* entre anthropoïdes (Boundenga et al., 2015, Délicat-Loembet et al., 2015, Paupy et al., 2013).

Dans le cas de l'existence d'une barrière génétique qui déterminerait les interactions ligand/récepteur dans l'invasion d'hôte vertébré (Otto et al., 2014, Wright and Rayner, 2014, Wanaguru et al., 2013), le passage de parasites de gorilles vers les chimpanzés et vice versa ne seraient possible que si: (i) une mutation se serait produite sur la protéine localisée à la surface du parasite le conduisant à se fixer au récepteur de l'hôte et permettre ainsi son invasion ; (ii) les mécanismes de défense de l'hôte pourraient être défaillants et auraient permis l'invasion des érythrocytes, (iv) mais également, les vecteurs comme *An. vinckei* auraient pu jouer le rôle de pont dans cet échange des parasites comme suggérer par (Paupy et al., 2013). Ainsi, cette barrière génétique n'est pas totalement imperméable, et pourrait être franchie par les *Laveranias* lorsque toutes les conditions favorisant les transferts sont remplies.

Pour ce qui est des transferts singes vers l'Homme, notre étude consolide les résultats des études récemment réalisée au Cameroun et Gabon dans lesquelles aucune preuve de *Plasmodium* simiens circulant dans la population humaine n'a été détectée (Délicat-Loembet et al., 2015, Sundararaman et al., 2013). Cette absence de souches simiennes dans la population

gabonaise pourrait s'expliquer premièrement par le fait qu'il n'y ait pas des vecteurs qui soient susceptibles de jouer le rôle de pont entre les deux espèces hôtes. Ce qui semble être en contradiction avec les observations faites dans la même région décrivant le rôle potentiel d'*Anopheles mouchetii* et *Anopheles vinckei* qui sont les seuls moustiques sylvestres trouvés infectés par des *Plasmodium* simiens (Paupy et al., 2013).

Deuxièmement, l'absence d'infection d'origine simienne chez les populations humaines pourrait également s'expliquer par la spécificité d'hôte (Otto et al., 2014, Wright and Rayner, 2014, Wanaguru et al., 2013, Martin et al., 2005). Toutefois, au-delà du groupe des *Laverania*, les grands singes sont également naturellement infectés par les parasites du sous-genre *Plasmodium*¹², à savoir *P. malariae*-Like, *P. ovale*-Like et *P. vivax*-Like (Liu et al., 2014, Prugnolle et al., 2013, Kaiser et al., 2010, Duval et al., 2009) qui sont connus pour être naturellement plus enclins à infecter une multiplicité d'espèces hôtes (Délicat-Loembet et al., 2015). L'absence de ces espèces chez l'homme nous amène à conclure que, vu le nombre décroissant de grands singes, ces derniers ne constituent pas de réservoirs de *Plasmodium* pour les humains.

Ainsi la proximité créée par la cohabitation de plusieurs espèces hôtes favoriserait les échanges des *Plasmodium spp* entre les différentes espèces. Sachant que dans les milieux naturels les PNH partagent leur habitat avec d'autres animaux, pourrait-il y avoir des échanges de parasites entre ces animaux et les PHN. En d'autres termes, seraient-ils capables d'échanger des lignées plasmodiales avec les autres animaux de la faune sauvage? Autre question demeure notamment celle de savoir si les infections à *Plasmodium* chez les grands singes ont des effets délétère sur ces derniers, en d'autre terme quelles sont les effets des infections à *Plasmodium* sur la santé de grands singes ? Ces questions sont discutées à la suite.

Virulence des *Plasmodium* simiens

Les grands singes sont porteurs d'une large diversité de protozoaires du genre *Plasmodium* dont au moins six espèces appartiennent aux *Laveranias* (Boundenga et al., 2015, Prugnolle et al., 2011c), sous-genre auquel appartient *P. falciparum*, l'agent le plus virulent chez l'homme. La question de la pathogénicité des *Plasmodium spp* et de leurs effets sur la santé des grands singes reste sans réponse. Il est encore difficile de savoir si les *Plasmodium spp* des singes sont virulents ou si les singes font la maladie ou pas quand ils sont infectés

¹² Sous genre *Plasmodium* équivaut aux *Plasmodium* non-*Laverania* : GONZALEZ, J. P., PRUGNOLLE, F. & LEROY, E. 2013. Men, primates, and germs: an ongoing affair. *Curr Top Microbiol Immunol*, 365, 337-53.

(Prugnolle et *al.*, 2011a). La proximité génétique de ces *Plasmodium spp* avec des parasites humains, en particulier *P. falciparum*, soulève des inquiétudes quant à l'effet de ces parasites sur la santé des gorilles et chimpanzés. Au cours de notre étude, un jeune chimpanzé a été trouvé infecté par *P. reichenowi* et présentait tous les symptômes d'un sujet naïf (Herbert et *al.*, 2015). Ce qui est décrit ici comme la première infection naturelle de *Plasmodium* simien associé à des symptômes de paludisme aigu (**Article 3**), semble être en accord avec les observations faites chez les primates non-humains lors des infections expérimentales avec *P. knowlesi* (Unwin et *al.*, 2005), sachant que certains parasites entraînent une morbidité et ou une mortalité de leur hôte (Zsolt 2006). Ainsi nous pouvons conclure que les infections à *Plasmodium* ont des effets délétères chez les grands singes. Il reste toutefois à déterminer si ces symptômes sont fréquents et s'ils peuvent entraîner la mort, comme c'est le cas pour *P. falciparum* chez l'homme.

Nouvelles lignées des parasites du paludisme dans la faune sauvage et potentiels transferts.

La recherche d'*Haemosporidies* dans la faune sauvage coexistant avec les primates non-humains nous a permis de mettre en évidence quatre nouvelles lignées jusqu'à ce jour inconnues (**Article 4**). Ces quatre lignées dont deux lignées ont été identifiées en même temps chez les artiodactyles du genre *Cephalophus* et chez les anophèles (Lignée A et Lignée B) et les deux autres lignées ont été identifiées chez les anophèles (Lignée C et Lignée D). En outre, au cours de la même étude nous avons identifié les vecteurs ou les vecteurs potentiels (au moins 8 espèces d'*Anopheles*) responsables de la circulation de ces lignées en milieu naturel. Aucun *Plasmodium* d'origine simienne n'a été détecté chez les autres animaux de la faune sauvage.

D'un point de vue évolutif, la découverte de ces lignées et leur position phylogénétique change complètement ce que nous savions sur l'évolution de *Hémosporidies* des mammifères (Martinsen et *al.*, 2008, Perkins and Schall, 2002, Escalante et *al.*, 1998). En effet, plusieurs études avaient proposé que les *Hémosporidies* avaient colonisé et connue une radiation évolutive une seule fois chez les mammifères. Cette radiation avait coïncidé avec l'utilisation des anophèles, des insectes mammalophiles, comme vecteur. Les parasites du genre *Polychromophilus* de chauves-souris transmis par des *Nycteribiidae* ont été suggérés comme étant la seule invasion secondaire de mammifères, provenant de parasites aviaires et de reptiles (Schaer et *al.*, 2013, Martinsen et *al.*, 2008). Nos résultats suggèrent que cette invasion secondaire fut en fait suivie par une seconde radiation chez les mammifères ongulés avec pour vecteurs les anophèles. Ce qui nous amène à penser que le succès de ces parasites à infecter les

mammifères est très probablement en grande partie lié à l'intervention des anophèles comme vecteurs. La question qui demeure concerne l'origine des trois lignées et les rôles joués par les hôtes vertébrés ou les vecteurs dans leur évolution.

D'un point de vue écologique, plusieurs aspects de l'écologie de ces lignées ont été révélés. Tout d'abord, elles ne sont pas spécifiques à un hôte et peuvent infecter une variété d'espèces hôtes, y compris les différentes espèces d'antilopes. Une telle propension à infecter différents hôtes avait déjà été remarquée dans les études antérieures (Garnham and Kuttler, 1980, Garnham, 1969, Keymer, 1966). Nous pensons que deux de ces lignées pourraient bien être *Plasmodium cephalophi* et *Plasmodium brucei* qui ont été observés chez les antilopes, mais aucune donnée nous permet de l'affirmer. Deuxièmement, au vu de nos résultats, nous pensons que la distribution de ces lignées couvre celle des hôtes. Garnham et Kuttler (1980) faisaient état d'une distribution plus large de *P. cephalophi* et *P. brucei* et que leur présence dans d'autres antilopes africaines étaient très probable (Garnham and Kuttler, 1980).

Toutefois, le spectre d'hôtes n'est pas limité aux antilopes. En effet, la Lignée B qui semble être la plus diversifiée a été trouvée chez les pangolins, et une souche retrouvée chez *Cercopithecus nictitans*, un petit singe, au Cameroun (Ayoub et al., 2012) est quasi identique génétiquement aux souches de cette Lignée B. Que ces espèces hôtes non-ongulés soient des hôtes naturels et fréquents de ces lignées ou représentent des hôtes accidentels reste néanmoins à être déterminé. Cependant, des études antérieures réalisées sur des singes africains pourraient soutenir l'hypothèse qu'il s'agirait plutôt d'une infection accidentelle car seulement un singe a été signalé infecté par cette lignée sur plusieurs centaines d'individus étudiés (Ayoub et al., 2012, Prugnolle et al., 2011d).

Implication dans la conservation et dans l'éco-tourisme

La conservation est un processus qui vise à promouvoir la préservation des espèces animales (Christoff, 1996). Toutefois, ces systèmes établis pour la préservation de la faune sauvage, à la lumière des données actuelles, ne sont pas sans conséquences sur la santé humaine et animale en général et des grands singes en particulier du fait du passage possible d'agents infectieux entre ces différents compartiments hôtes (Woodford et al., 2002). Cependant, la capacité des agents pathogènes à franchir la barrière d'hôte n'est pas un phénomène nouveau. Le contact accru entre l'Homme et les grands singes a fait penser à certains que les conséquences engendrées par la conservation emporteraient sur les avantages (Köndgen et al., 2008). Une grande partie des maladies infectieuses qui touchent l'Homme sont d'origines

simiennes (Keita et *al.*, 2014). Des études récentes ont révélées que la mort de plusieurs grands singes en Afrique de l'ouest était liée à des agents infectieux d'origine humaine (Köndgen et *al.*, 2008, Kaur et *al.*, 2008, Woodford et *al.*, 2002). Même si le rôle de l'Homme comme réservoirs d'agents pathogènes n'a pas encore été clairement établi (Reid et *al.*, 2006), celui-ci est susceptible ou capable de transférer ses pathogènes aux grands singes.

Dans le cas relatif aux *Plasmodiums*, au regard de toutes les données sur la transmission de *P. falciparum* aux PNH ou même encore de *P. vivax* comme montré par (Prugnolle et *al.*, 2013), il semblerait que la transmission serait plus probable dans les environnements confinés de l'homme vers les PNH (Pacheco et *al.*, 2013, Duval et *al.*, 2010, Krief et *al.*, 2010). Sachant qu'il a été démontré que les grands singes sont susceptibles de présenter les symptômes dus à une infection à *Plasmodium* (Herbert et *al.*, 2015), l'hypothèse que ces transferts pourraient avoir des conséquences sur leur santé animale ne doit pas être exclue. Ces échanges de pathogènes pourraient causer l'émergence de souches nouvelles dont l'Homme pourrait jouer le rôle de catalyseur et conduirait à des problèmes de santé publique. Ou encore freiner ou avoir des conséquences néfastes sur les processus de conservation. Nous suggérons donc que la réduction des effets des agents infectieux sur la faune sauvage en générale et les grands singes en particulier passe par une meilleure collaboration entre les organismes de conservation et les acteurs de la recherche en maladies infectieuses afin d'établir des stratégies de contrôle visant à réduire la transmission inter-espèces d'agents pathogènes.

Implication des résultats dans le problème de santé publique

La question que l'on pourrait se poser serait de savoir, quelle est l'apport de ce travail dans le processus de lutte contre la maladie infectieuse au Gabon. Pour combattre de manière efficace une maladie, il faut la connaître, essayer en explorant de la comprendre, savoir comment elle se transmet entre espèces, si c'est une zoonose et quels sont les facteurs régissant qui pourraient favoriser sa propagation.

Le Gabon a déjà connu plusieurs épidémies dans le passé qui ont eu de l'impact sur la population humaine. C'est le cas de l'épidémie d'Ébola, de Chikungunya, de dengue ou zika (Labouba and Leroy, 2015, Grard et *al.*, 2014, Caron et *al.*, 2013, Leroy et *al.*, 2004), et nous ne sommes pas à l'abri de l'émergence de nouvelles épidémies tant les contacts entre l'Homme et la faune sauvage deviennent de plus en plus fréquents et permanents. C'est pourquoi, nous pensons qu'une meilleure lutte contre ces maladies infectieuses, dans ce pays, nécessite entre autre la prise en compte de la compréhension de la biologie des agents

infectieux et des facteurs environnementaux ou écologique qui pourraient influencer l'étiologie de certaines pathologies, transmissible ou non.

Il est vrai qu'aujourd'hui il est impossible de prédire où se passera la prochaine pandémie de maladie infectieuse, mais aussi l'on peut savoir que l'agent infectieux sera d'origine d'animal et prospéra dans les grandes villes et peut être après en milieu hospitalisé. Cette approche systémique de compréhension des maladies, nous permet ainsi de comprendre et expliquer pour pouvoir en ce qui nous concerne de prévenir de l'émergence des nouveaux parasites d'origines simiens dans la population humaine comme cela a été le cas en Asie du Sud-Est (Ahmed and Cox-Singh, 2015, Cox-Singh and Culleton, 2015). Nos résultats nous permettent de conclure que les PNH ne font pas courir des risques aux populations humaines en termes de santé publique concernant au moins les nouvelles formes de Paludisme.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Jusqu'à très récemment, aucune donnée sur la diversité plasmodiale des primates non-humains et les transferts inter-espèces entre l'Homme et ces derniers n'était disponible. Notre travail a permis des avancées notables dans ce domaine de recherche en démontrant l'existence d'une large diversité de *Plasmodium* qui circule chez les primates non humains (PNH) du Gabon. Nous avons pu identifier 11 espèces de *Plasmodium* chez les PNH.

Ce travail nous a également permis de mettre en évidence les transferts de parasites de l'Homme vers les PNH, et de constater qu'aucune lignée simienne ne circule dans notre population d'étude. Nous avons pu démontrer également pour la première fois que la barrière génétique qui détermine la spécificité d'hôte chez parasites du sous-genre *Laverania* n'était pas complètement imperméable car dans les milieux confinés c'est-à-dire de milieux où l'homme est contraint de vivre avec les primates non-humains (sanctuaires et centre de primatologie) les transferts sont possibles.

Ces échanges de pathogènes pourraient causer l'émergence de souches nouvelles ce qui pourrait conduire à de nouveaux problèmes en santé publique ou encore freiner ou avoir des conséquences néfastes sur les processus de conservation. Notre travail a permis de démontrer pour la première fois que les grands singes pouvaient présenter des symptômes caractéristiques du paludisme à la suite d'une infection naturelle. Enfin, durant ce travail nous avons pu

caractériser aussi quatre nouvelles lignées d'Hémosporidies qui circulent chez les céphalophes en milieu sauvage et mais aussi les vecteurs potentiels de ces lignées.

Il n'en demeure pas moins que ces travaux sur la diversité de *Plasmodium* en circulation au Gabon doivent être capitalisés tant les perspectives et piste de recherches sont nombreuses. En perspective, il serait maintenant nécessaire de

1) mieux comprendre l'origine et l'évolution des parasites du sous-genre *Plasmodium* (*P. ovale* et *P. malariae*) qui possèdent une habilité à franchir les barrières d'hôtes.

2) Comprendre la dynamique d'infection au sein des groupes de primates non humains, c'est-à-dire déterminer la relation qui existe entre l'infection à *Plasmodium* et les traits d'histoire de vie (sexe, âge et rang social).

3) Comprendre les événements évolutifs à l'origine de la diversité de *Laverania* par des études poussées de datation des différents événements de spéciation.

4) Caractériser tous les *Plasmodium* de la faune sauvage afin de proposer une classification des hémosporidies qui prenne en compte les aspects tant morphologiques que phylogénétiques.

Références

- ACKERMANN, R. R. & CHEVERUD, J. M. 2004. Morphological integration in primate evolution. *Phenotypic integration: Studying the ecology and evolution of complex phenotypes*, Oxford University press, Katherine Preston, pp302-319.
- ADLER, S. 1923. Malaria in chimpanzees in Sierra Leone. *Annals of Tropical Medecine and Parasitology*, 17, 13-19.
- AHMED, M. A. & COX-SINGH, J. 2015. an emerging pathogen. *ISBT Sci Ser*, 10, 134-140.
- ALMÉCIJA, S., TALLMAN, M., ALBA, D. M., PINA, M., MOYÀ-SOLÀ, S. & JUNGERS, W. L. 2013. The femur of *Orrorin tugenensis* exhibits morphometric affinities with both Miocene apes and later hominins. *Nature communications*, 4.
- ANDERSON, R. M. & MAY, R. 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85, 411-426.
- ANDRADE, B. B., REIS-FILHO, A., SOUZA-NETO, S. M., CLARÊNCIO, J., CAMARGO, L., BARRAL, A. & BARRAL-NETTO, M. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, 9, 1475-2.
- AUZIAS, D. & LABOURDETTE, J.-P. 2011. *Gabon-Sao Tomé et Principe 2012-13*, Petit Futé.
- AYOUBA, A., MOUACHA, F., LEARN, G. H., MPOUDI-NGOLE, E., RAYNER, J. C., SHARP, P. M., HAHN, B. H., DELAPORTE, E. & PEETERS, M. 2012. Ubiquitous Hepatocystis infections, but no evidence of *Plasmodium falciparum*-like malaria parasites in wild greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*). *International Journal of Parasitology*, 42, 709-13.
- BAFORT, J. 1969. Etude du cycle biologique. *Annale de la Societe Belge de Médecine. tropicale*, 49, 533-628.
- BALDING, D. J. 2003. Likelihood-based inference for genetic correlation coefficients. *Theoretical population biology*, 63, 221-230.
- BALDING, D. J., BISHOP, M. & CANNINGS, C. 2008. Handbook of statistical genetics, *John Wiley & Sons*, 1540p.
- BALLARD, J. W. & WHITLOCK, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, 729-44.
- BAMBA, I., BARIMA, Y. S. S. & BOGAERT, J. 2010. Influence de la densité de la population sur la structure spatiale d'un paysage forestier dans le bassin du Congo en RD Congo. *Tropical Conservation Science*, 3, 31-44.

- BATTY, E., MCGRAW, W. S. & KOUASSI, P. K. 2007. Répertoire postural du singe *Cercopithecus nictitans stampflii*, dans le Parc National de Taï (Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 4, 131-136.
- BAUDA, P. & MONFORT, P. 2004. Agents pathogènes et modifications des environnements: quels risques actuels et futurs? *Environnement, Risques & Santé*, 3, 165-172.
- BELL, B. R., MCDANIEL, B. & ROBISON, O. 1985. Effects of cytoplasmic inheritance on production traits of dairy cattle. *Journal of dairy science*, 68, 2038-2051.
- BIRTLES, R. J., HARRISON, T. G. & MOLYNEUX, D. H. 1994. *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88, 317-27.
- BLACKLOCK, B. & ADLER, S. 1924. A malaria parasite of the chimpanzee. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 18, 1-2.
- BOUHALLIER, J. & BERGE, C. 2006. Analyse morphologique et fonctionnelle du pelvis des primates Catarrhiniens: conséquences pour l'obstétrique. *Comptes Rendus Palevol*, 5, 551-560.
- BOUNDENGA, L., OLLOMO, B., ROUGERON, V., MOUELE, L. Y., MVE-ONDO, B., DELICAT-LOEMBET, L. M., MOUKODOUM, N. D., OKOUGA, A. P., ARNATHAU, C., ELGUERO, E., DURAND, P., LIEGEOIS, F., BOUE, V., MOTSCH, P., LE FLOHIC, G., NDOUNGOUE, A., PAUPY, C., BA, C. T., RENAUD, F. & PRUGNOLLE, F. 2015. Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon. *Malaria Journal*, 14, 111.
- BRACK, M. 1987. Mollicutes. *Agents Transmissible from Simians to Man*. Springer Berlin Heidelberg.
- BRACK, M. 2012. *Agents transmissible from simians to man*, Springer Science & Business Media.
- BRAY, R. 1958. Studies on malaria in chimpanzees. V. The sporogonous cycle and mosquito transmission of *Plasmodium vivax schwetzi*. *The Journal of parasitology*, 46-51.
- BRAY, R. 1963. The malaria parasites of anthropoid apes. *The Journal of parasitology*, 888-891.
- BRAY, R. & GARNHAM, P. 1964. Anopheles as vectors of animal malaria parasites. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 143.
- BRETELIER, F. 1996. Tropical Africa, especially Gabon.
- BRUCE-CHWATT, L. J. 1980. *Essential malariology*, William Heinemann Medical Books Ltd.

- BRUMPT, E. 1939. Les parasites du paludisme des chimpanzés. *CR Societe de Biologie*, 130, 837-840.
- CALVIGNAC-SPENCER, S., LEENDERTZ, S. A., GILLESPIE, T. R. & LEENDERTZ, F. H. 2012. Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 521-7.
- CAMERON, K. R., GREGORY, V., BANKS, J., BROWN, I. H., ALEXANDER, D. J., HAY, A. J. & LIN, Y. P. 2000. H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. *Virology*, 278, 36-41.
- CARNEVALE, P., ROBERT, V., MANGUIN, S., CORBEL, V., FONTENILLE, D., GARROS, C., ROGIER, C. & ROUX, J. 2009. *Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle* : Marseille : IRD, 2009, 391p..
- CARNEVALE, P., ROBERT, V., MOLEZ, J.-F. & BAUDON, D. 1984. Epidémiologie générale: faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique subsaharienne. *Etudes médicales*, 123-133.
- CARON, M., GRARD, G., PAUPY, C., MOMBO, I. M., BIKIE BINSO, B., KASSA KASSA, F. R., NKOGHE, D. & LEROY, E. M. 2013. First evidence of simultaneous circulation of three different dengue virus serotypes in Africa. *PLoS One*, 8, e78030.
- CARROLL, S. B. 2003. Genetics and the making of *Homo sapiens*. *Nature*, 422, 849-857.
- CARTER, R. & MENDIS, K. N. 2002. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews*, 15, 564-594.
- CARTMILL, M., GHAZANFAR, A. & PLATT, M. 2010. Primate classification and diversity. *Primate Neuroethology*, 10-30.
- CARVALHO, L. S., DAVIES, W. L., ROBINSON, P. R. & HUNT, D. M. 2011. Spectral tuning and evolution of primate short-wavelength-sensitive visual pigments. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20110782.
- CHAPMAN, C. A., GILLESPIE, T. R. & GOLDBERG, T. L. 2005. Primates and the Ecology of their Infectious Diseases: How will Anthropogenic Change Affect Host-Parasite Interactions? *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 14, 134-144.
- CHARLES-DOMINIQUE, P. 1974. Vie sociale de *Perodicticus potto* (Primates, Lorisidés). Etude de terrain en forêt équatoriale de l'Ouest Africain au Gabon. *Mammalia*, 38, 355-380.
- CHARLES-DOMINIQUE, P. 1977. *Ecology and behaviour of nocturnal primates: prosimians of equatorial West Africa*, Columbia University Press.

- CHIPPAUX, J., VIEILLEFOSSE, S., SALL, O., MAFOUTA, R. & DIALLO, A. 2005. ENVENIMATIONS. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 98, 263-268.
- CHITNIS, C. E. & MILLER, L. H. 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 497-506.
- CHOE, H., MOORE, M. J., OWENS, C. M., WRIGHT, P. L., VASILIEVA, N., LI, W., SINGH, A. P., SHAKRI, R., CHITNIS, C. E. & FARZAN, M. 2005. Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Molecular microbiology*, 55, 1413-1422.
- CHRISTOFF, P. 1996. Ecological modernisation, ecological modernities. *Environmental politics*, 5, 476-500.
- COATNEY, G. R. 1971. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 20, 795-803.
- COATNEY, G. R., COLLINS, W. E., WARREN, M. & CONTACOS, P. G. 1971. The primate malarias. *The primate malarias*.
- COLLINS, W. E. & JEFFERY, G. M. 2005. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews*, 18, 570-581.
- COLYN, M. & DELEPORTE, P. 2002. Biogeographic analysis of central African forest guenons. *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys*. Springer.
- COMBES, C. 2001. *Parasitism: the ecology and evolution of intimate interactions*, University of Chicago Press.
- CONWAY, D. J., FANELLO, C., LLOYD, J. M., BAN, M.-S., BALOCH, A. H., SOMANATH, S. D., ROPER, C., ODUOLA, A. M., MULDER, B. & POVOA, M. M. 2000. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Molecular and biochemical parasitology*, 111, 163-171.
- COOPER, N., GRIFFIN, R., FRANZ, M., OMOTAYO, M. & NUNN, C. L. 2012. Phylogenetic host specificity and understanding parasite sharing in primates. *Ecology Letters*, 15, 1370-1377.
- COQUOZ, R. & TARONI, F. 2006. *Preuve par l'ADN: la génétique au service de la justice*, PPUR presses polytechniques.
- COREN, R. L. 2003. *The evolutionary trajectory: the growth of information in the history and future of earth*, CRC Press.

- CORMIER, L. A. 2013. The Ten Thousand Year Fever: Rethinking Human and Wild-Primate Malaria. *Archaeology and Cultural Mixture: Creolization, Hybridity and Mestizaje*, 341.
- CORNEJO, O. E. & ESCALANTE, A. A. 2006. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends in parasitology*, 22, 558-563.
- COX-SINGH, J. & CULLETON, R. 2015. *Plasmodium knowlesi*: from severe zoonosis to animal model. *Trends in Parasitology*, 31, 232-8.
- COX-SINGH, J., DAVIS, T. M., LEE, K.-S., SHAMSUL, S. S., MATUSOP, A., RATNAM, S., RAHMAN, H. A., CONWAY, D. J. & SINGH, B. 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases*, 46, 165-171.
- CRACRAFT, J. 1983a. Cladistic Analysis and Vicariance Biogeography: Evolutionary biology gains a new dimension from the reconstruction of systematic and biogeographic patterns. *American Scientist*, 273-281.
- CRACRAFT, J. 1983b. Species concepts and speciation analysis. *Current ornithology*. Springer.
- CRESPI, B. J. 2001. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in ecology & evolution*, 16, 178-183.
- CSERTI, C. M. & DZIK, W. H. 2007. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, 110, 2250-2258.
- D'ARC, M., AYOUBA, A., ESTEBAN, A., LEARN, G. H., BOUÉ, V., LIEGEOIS, F., ETIENNE, L., TAGG, N., LEENDERTZ, F. H., BOESCH, C., MADINDA NÈ, F., ROBBINS, M. M., GRAY, M., COUNIL, A., OOMS, M., LETKO, M., SIMON, V. A., SHARP, P. M., HAHN, B. H., DELAPORTE, E., MPOUDI NGOLE, E. & PEETERS, M. 2015. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A*, 112, E1343-52.
- DAS, A., BAJAJ, R., MOHANTY, S. & SWAIN, V. 2007. Genetic diversity and evolutionary history of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-, 92, 1516.
- DAUSSET, J. 1998. Les liens eau santé. *APRES DEMAIN*, 10-13.
- DAWSON, G., ASHMAN, S. B. & CARVER, L. J. 2000. The role of early experience in shaping behavioral and brain development and its implications for social policy. *Development and psychopathology*, 12, 695-712.

- DE BENEDICTIS, G., ROSE, G., CARRIERI, G., DE LUCA, M., FALCONE, E., PASSARINO, G., BONAFE, M., MONTI, D., BAGGIO, G. & BERTOLINI, S. 1999. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *The FASEB Journal*, 13, 1532-1536.
- DEHNE, K. L., KHODAKEVICH, L., HAMERS, F. F. & SCHWARTLÄNDER, B. 1999. The HIV/AIDS epidemic in eastern Europe: recent patterns and trends and their implications for policy-making. *Aids*, 13, 741-749.
- DEL PORTILLO, H. A., FERNANDEZ-BECERRA, C., BOWMAN, S., OLIVER, K., PREUSS, M., SANCHEZ, C. P., SCHNEIDER, N. K., VILLALOBOS, J. M., RAJANDREAM, M.-A. & HARRIS, D. 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature*, 410, 839-842.
- DÉLICAT-LOEMBET, L., ROUGERON, V., OLLOMO, B., ARNATHAU, C., ROCHE, B., ELGUERO, E., MOUKODOUM, N. D., OKOUGHA, A. P., MVE ONDO, B., BOUNDENGA, L., HOUZÉ, S., GALAN, M., NKOGHÉ, D., LEROY, E. M., DURAND, P., PAUPY, C., RENAUD, F. & PRUGNOLLE, F. 2015. No Evidence for Ape *Plasmodium* Infections in Humans in Gabon. *PLoS One*, 10.
- DEPUTTE, B., L. 1998. Primate. in *Encyclopædia Universalis*.
- DEREEPER, A., GUIGNON, V., BLANC, G., AUDIC, S., BUFFET, S., CHEVENET, F., DUFAYARD, J. F., GUINDON, S., LEFORT, V., LESCOT, M., CLAVERIE, J. M. & GASCUEL, O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36, W465-9.
- DOBSON, A. 2004. Population dynamics of pathogens with multiple host species. *The American Naturalist*, 164, S64-S78.
- DOUCET, J.-L. 2003. L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon. *Doctorat. Faculté Universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux*.
- DOUCET, J.-L. & BRUGIÈRE, D. 1999. Etude de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon: méthode et implications pour la gestion forestière. *Rapport final au WWF-Belgique, Bruxelles, Belgique*.
- DOUMENGE, C., GARCIA-YUSTE, J.-E., GARTLAN, S., LANGRAND, O. & NDINDA, A. 2001. Conservation de la biodiversité forestière en Afrique centrale atlantique: le réseau d'aires protégées est-il adéquat? *Bois et forêts des tropiques*, 5-28.
- DOUNIAS, E. 1999. Le câble pris au piège de la conservation. Technologie du piégeage et production cynégétique chez les Mvae du sud Cameroun forestier. *L'homme et la forêt*

- tropicale. S. Bahuchet, D. Bley, H. Pagezy and N. Vernazza-Licht. Chateauneuf de Grasse, 281-300.
- DROUINEAU, S. & NASI, R. 1999. L'aménagement forestier au Gabon: historique, bilan, perspectives. CIRAD-Foret, Montpellier, France.
- DUBOST, G. & FEER, F. 1992. Saisons de reproduction des petits ruminants dans le nord-est du Gabon, en fonction des variations des ressources alimentaires. *Mammalia*, 56, 25-44.
- DUVAL, L. 2012. Plasmodium chez les grands singes africains. *Revue de primatologie*.
- DUVAL, L. & ARIEY, F. 2012. Ape *Plasmodium* parasites as a source of human outbreaks. *Clinical microbiology and infection*, 18, 528-532.
- DUVAL, L., FOURMENT, M., NERRIENET, E., ROUSSET, D., SADEUH, S. A., GOODMAN, S. M., ANDRIAHOLINIRINA, N. V., RANDRIANARIVELOJOSIA, M., PAUL, R. E. & ROBERT, V. 2010. African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the Laverania subgenus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 10561-10566.
- DUVAL, L., NERRIENET, E., ROUSSET, D., SADEUH MBA, S. A., HOUZE, S., FOURMENT, M., LE BRAS, J., ROBERT, V. & ARIEY, F. 2009. Chimpanzee malaria parasites related to *Plasmodium ovale* in Africa. *PLoS One*, 4, e5520.
- EHARDT, C. L. & BUTYNSKI, T. M. 2006. The recently described highland mangabey, *Lophocebus kipunji* (*Cercopithecoidea*, *Cercopithecinae*): Current knowledge and conservation assessment. *Primate Conservation*, 81-87.
- EPSTEIN, P. R. 1995. Emerging diseases and ecosystem instability: new threats to public health. *American journal of public health*, 85, 168-172.
- ESCALANTE, A. A. & AYALA, F. J. 1994. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 11373-11377.
- ESCALANTE, A. A. & AYALA, F. J. 1995. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 5793-5797.
- ESCALANTE, A. A., CORNEJO, O. E., FREELAND, D. E., POE, A. C., DURREGO, E., COLLINS, W. E. & LAL, A. A. 2005. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102, 1980-1985.

- ESCALANTE, A. A., FREELAND, D. E., COLLINS, W. E. & LAL, A. A. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 95, 8124-9.
- ESTRADA, A. & BUTLER, R. 2008. Recognizing the role of tropical scientists in tropical research.
- FARGEOT, C. & DU CASTEL, C. 2009. Gestion de la chasse villageoise et préservation des Ressources cynégétiques dans le bassin du Congo. *XIII Congrès Forestier Mondial, Buenas Aires, Argentina*.
- FELINER, G. N. & ROSSELLÓ, J. A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular phylogenetics and evolution*, 44, 911-919.
- FELSENSTEIN, J. 1973. Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic zoology*, 240-249.
- FONTENILLE, D., COHUET, A., AWONO-AMBENE, P. H., ANTONIO-NKONDJIO, C., WONDJI, C., KENGNE, P., DIA, I., BOCCOLINI, D., DUCHEMIN, J. B., RAJAONARIVELO, V., DABIRE, R., ADJA-AKRE, M., CEAINU, C., LE GOFF, G. & SIMARD, F. 2003. Systematics and biology of *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Africa, recent data. *Medecine Tropicale (Mars)*, 63, 247-53.
- FOSSEY, D. 1974. Observations on the home range of one group of mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*). *Animal Behaviour*, 22, 568-581.
- FOUGERE, A. 2012. Caractérisation des carboxypeptidases B d'*Anopheles gambiae* et analyse de leurs rôles sur le développement de *Plasmodium falciparum* et sur la reproduction des moustiques. These de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- GALAT-LUONG, A., GALAT, G. & LUONG, T. M. 2000. Les primates des monts Nimba. *Opération perturbation et grande faune, Rapport UNESCO, Paris*.
- GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D. L., CHEN, Y., RODENBURG, C. M., MICHAEL, S. F., CUMMINS, L. B., ARTHUR, L. O., PEETERS, M., SHAW, G. M., SHARP, P. M. & HAHN, B. H. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397, 436-41.
- GARDNER, M. J., HALL, N., FUNG, E., WHITE, O., BERRIMAN, M., HYMAN, R. W., CARLTON, J. M., PAIN, A., NELSON, K. E., BOWMAN, S., PAULSEN, I. T., JAMES, K., EISEN, J. A., RUTHERFORD, K., SALZBERG, S. L., CRAIG, A., KYES, S., CHAN, M. S., NENE, V., SHALLOM, S. J., SUH, B., PETERSON, J., ANGIUOLI,

- S., PERTEA, M., ALLEN, J., SELENGUT, J., HAFT, D., MATHER, M. W., VAIDYA, A. B., MARTIN, D. M., FAIRLAMB, A. H., FRAUNHOLZ, M. J., ROOS, D. S., RALPH, S. A., MCFADDEN, G. I., CUMMINGS, L. M., SUBRAMANIAN, G. M., MUNGALL, C., VENTER, J. C., CARUCCI, D. J., HOFFMAN, S. L., NEWBOLD, C., DAVIS, R. W., FRASER, C. M. & BARRELL, B. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498-511.
- GARNHAM, P. 1966a. Locomotion in the parasitic protozoa. *Biological Reviews*, 41, 561-586.
- GARNHAM, P. C. 1969. Malaria as a medical and veterinary zoonosis. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales*, 62, 325-32.
- GARNHAM, P. C. & KUTTLER, K. L. 1980. A malaria parasite of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and its relation with known species of *Plasmodium* in other ungulates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 206, 395-402.
- GARNHAM, P. C. C. 1966b. Malaria parasites and other haemosporidia. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*.
- GAUTIER-HION, A. 1975. Dimorphisme sexuel et organisation sociale chez les cercopithecines forestiers africains. *Mammalia*, 39, 365-374.
- GAUTIER-HION, A. & BRUGIÈRE, D. 2005. Significance of riparian forests for the conservation of Central African primates. *International journal of primatology*, 26, 515-523.
- GAUTIER-HION, A., COLYN, M., GAUTIER, J.-P., DEWYNTER, M. & BOUCHAIN, C. 1999. *Histoire naturelle des primates d'Afrique Centrale*, Ecofac Libreville, Gabon.
- GAUTIER, J.-P., MOYSAN, F., FEISTNER, A., LOIREAU, J.-N. & COOPER, R. 1992. The distribution of *Cercopithecus (lhoesti) solatus*, an endemic guenon of Gabon.
- GAZIN, P. 2001. Epidémiologie du paludisme en Afrique tropicale et en Asie du Sud-Est. *Développement et Santé*, 26-31.
- GILLESPIE, T. R., NUNN, C. L. & LEENDERTZ, F. H. 2008. Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health. *American Journal of Physical Anthropology*, 137, 53-69.
- GIRAUD, T. 2006a. Selection against migrant pathogens: the immigrant inviability barrier in pathogens. *Heredity*, 97, 316-318.
- GIRAUD, T. 2006b. Speciation in parasites: host switching does not automatically lead to allopatry. *Trends in parasitology*, 22, 151-151.
- GIRAUD, T., REFRÉGIER, G., LE GAC, M., DE VIENNE, D. M. & HOOD, M. E. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 791-802.

- GONZALEZ, J. P., PRUGNOLLE, F. & LEROY, E. 2013. Men, primates, and germs: an ongoing affair. *Current Topic in Microbiology and Immunology*, 365, 337-53.
- GRARD, G., CARON, M., MOMBO, I. M., NKOGHE, D., MBOUI ONDO, S., JOLLE, D., FONTENILLE, D., PAUPY, C. & LEROY, E. M. 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2681.
- GRASSÉ, P. P. 1953. *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. T. 1: Fasc. 2. Protozoaires: Rhizopodes, Actinopodes, Sporozoaires, Cnidosporidies*, Masson.
- GRENFELL, B. T. & DOBSON, A. P. 1995. *Ecology of infectious diseases in natural populations*, Cambridge University Press.
- GROVES, C. & HARDING, J. 2003. Morphology, morphometrics and taxonomy. *Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide*, 140-157.
- GROVES, C. P. 2007. The taxonomic diversity of the *Colobinae* of Africa. *Journal of Anthropological Sciences*, 85, 7-34.
- GUÉGAN, J.-F., RENAUD, F. & CHAPITRE, V. 2005. Vers une écologie de la santé. *Biodiversité et changements globaux: enjeux de société et défis pour la recherche, Ministère des Affaires Etrangères-ADPF, Paris*, 100-116.
- GUERRA, C. A., HOWES, R. E., PATIL, A. P., GETHING, P. W., VAN BOECKEL, T. P., TEMPERLEY, W. H., KABARIA, C. W., TATEM, A. J., MANH, B. H. & ELYAZAR, I. 2010. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, e774.
- GUINDO, N. 2007. *Paludisme pendant la grossesse dans une zone de faible transmission du Mali (Tombouctou et Niafunké)*. Thèse de médecine, FMPOS, 2007, 82p.
- GUINDON, S., DUFAYARD, J.-F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W. & GASCUEL, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59, 307-321.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52, 696-704.
- HADDOW, A. 1954. Studies of the biting-habits of African mosquitos. An appraisal of methods employed, with special reference to the twenty-four-hour catch. *Bulletin of Entomological Research*, 45, 199-242.
- HARCOURT, A. & SCHREIER, B. 2009. Diversity, body mass, and latitudinal gradients in primates. *International journal of primatology*, 30, 283-300.

- HARRISON, M. J. 1988. A new species of guenon (genus *Cercopithecus*) from Gabon. *Journal of Zoology*, 215, 561-575.
- HARVELL, D. 2004. Ecology and Evolution of Host-Pathogen Interactions in Nature. *The American Naturalist*, 164, S1-S5.
- HAUREZ, B., PETRE, C.-A. & DOUCET, J.-L. 2013. Impacts de l'exploitation forestière et de la chasse sur les populations de gorille des plaines de l'Ouest (*Gorilla gorilla gorilla*) et conséquences pour la régénération forestière (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 17, 364-372.
- HERBERT, A., BOUNDENGA, L., MEYER, A., MOUKODOUM, D. N., OKOUGA, A. P., ARNATHAU, C., DURAND, P., MAGNUS, J., NGOUBANGOYE, B., WILLAUME, E., BA, C. T., ROUGERON, V., RENAUD, F., OLLOMO, B. & PRUGNOLLE, F. 2015. Malaria-like symptoms associated with a natural *Plasmodium reichenowi* infection in a chimpanzee. *Malaria Journal*, 14, 220.
- HLADIK, C. M. 2002. Le comportement alimentaire des primates: de la socio-écologie régime éclectique des hominidés.
- HOFFSTETTER, R. 1977. Phylogénie des Primates. Confrontation des résultats obtenus par les diverses voies d'approche du problème. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, 4, 327-346.
- HOMSY, J. 1999. Ape tourism and human diseases: how close should we get. *International Gorilla Conservation*.
- HUDSON, P. J., DOBSON, A. P. & LAFFERTY, K. D. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 381-385.
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-5.
- HURST, G. D. & JIGGINS, F. M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272, 1525-1534.
- HUSON, D. H. & BRYANT, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23, 254-267.
- JABLONSKI, N. G. 2005. Primate homeland: forests and the evolution of primates during the Tertiary and Quaternary in Asia. *Anthropological Science*, 113, 117-122.

- JEAN WICKINGS, E., AMBROSE, L. & K BEARDER, S. 1998. Sympatric populations of *Galagoides demidoff* and *Galagoides thomasi* in the Haut-Ogooué region of Gabon. *Folia Primatologica*, 69, 389-393.
- JIRKU, M., VOTYPKA, J., PETRZELKOVA, K. J., JIRKU-POMAJBIKOVA, K., KRIEGOVA, E., VODICKA, R., LANKESTER, F., LEENDERTZ, S. A., WITTIG, R. M., BOESCH, C., MODRY, D., AYALA, F. J., LEENDERTZ, F. H. & LUKES, J. 2015. Wild chimpanzees are infected by *Trypanosoma brucei*. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4, 277-82.
- JORDE, L. & SPUHLER, J. 1974. A statistical analysis of selected aspects of primate demography, ecology, and social behavior. *Journal of Anthropological Research*, 199-224.
- JOY, D. A., FENG, X., MU, J., FURUYA, T., CHOTIVANICH, K., KRETTLI, A. U., HO, M., WANG, A., WHITE, N. J. & SUH, E. 2003. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 300, 318-321.
- KAESSMANN, H., WIEBE, V., WEISS, G. & PAABO, S. 2001. Great ape DNA sequences reveal a reduced diversity and an expansion in humans. *Nature Genetics*, 27, 155-6.
- KAISER, M., LOWA, A., ULRICH, M., ELLERBROK, H., GOFFE, A. S., BLASSE, A., ZOMMERS, Z., COUACY-HYMAN, E., BABWETEERA, F., ZUBERBUHLER, K., METZGER, S., GEIDEL, S., BOESCH, C., GILLESPIE, T. R. & LEENDERTZ, F. H. 2010. Wild chimpanzees infected with 5 *Plasmodium* species. *Emerging Infectious Disease*, 16, 1956-9.
- KARSENTY, A. 2005. Les enjeux des réformes dans le secteur forestier en Afrique centrale. *Cahiers du GEMDEV*, 30.
- KAUR, T., SINGH, J., TONG, S., HUMPHREY, C., CLEVINGER, D., TAN, W., SZEKELY, B., WANG, Y., LI, Y., ALEX MUSE, E., KIYONO, M., HANAMURA, S., INOUE, E., NAKAMURA, M., HUFFMAN, M. A., JIANG, B. & NISHIDA, T. 2008. Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *American Journal of Primatology*, 70, 755-65.
- KAWAI, S., SATO, M., KATO-HAYASHI, N., KISHI, H., HUFFMAN, M. A., MAENO, Y., CULLETON, R. & NAKAZAWA, S. 2014. Detection of *Plasmodium knowlesi* DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Malaria Journal*, 13, 373.

- KAWASHIMA, T. & THORINGTON JR, R. W. 2011. Comparative morphological configuration of the cardiac nervous system in lorises and galagos (Infraorder Lorisiformes, Strepsirrhini, Primates) with evolutionary perspective. *The Anatomical Record*, 294, 412-426.
- KEELE, B. F., VAN HEUVERSWYN, F., LI, Y., BAILES, E., TAKEHISA, J., SANTIAGO, M. L., BIBOLLET-RUCHE, F., CHEN, Y., WAIN, L. V., LIEGEOIS, F., LOUL, S., NGOLE, E. M., BIENVENUE, Y., DELAPORTE, E., BROOKFIELD, J. F. Y., SHARP, P. M., SHAW, G. M., PEETERS, M. & HAHN, B. H. 2006. Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science*, 313, 523-6.
- KEELING, P. J. & PALMER, J. D. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9, 605-618.
- KEITA, A. K., SOCOLOVSKI, C., AHUKA-MUNDEKE, S., RATMANOV, P., BUTEL, C., AYOUBA, A., INOGWABINI, B. I., MUYEMBE-TAMFUM, J. J., MPOUDINGOLE, E., DELAPORTE, E., PEETERS, M., FENOLLAR, F. & RAOULT, D. 2013. Molecular evidence for the presence of *Rickettsia Felis* in the feces of wild-living African apes. *PLoS One*, 8, e54679.
- KEITA, M. B., HAMAD, I. & BITTAR, F. 2014. Looking in apes as a source of human pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 77, 149-54.
- KEYMER, I. 1966. Studies on *Plasmodium (Vincetia) cephalophi* of the grey duiker (*Sylvicapra grimmia*). *Annals of tropical medicine and parasitology*, 60, 129.
- KHAN, S. M., FRANKE-FAYARD, B., MAIR, G. R., LASONDER, E., JANSE, C. J., MANN, M. & WATERS, A. P. 2005. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*, 121, 675-687.
- KINGSTON, W. 1985. Conservation of the *Callitrichidae*. *Laboratory Primate Newsletter*, 24.
- KNOTT, C. D. 2005. 12 Energetic responses to food availability in the great apes: implications for hominin evolution. *Seasonality in primates: Studies of living and extinct human and non-human primates*, 44, 351.
- KÖNDGEN, S., KÜHL, H., N'GORAN, P. K., WALSH, P. D., SCHENK, S., ERNST, N., BIEK, R., FORMENTY, P., MÄTZ-RENSING, K. & SCHWEIGER, B. 2008. Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Current Biology*, 18, 260-264.
- KOOPMAN, K., WILSON, D. & REEDER, D. 1993. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*.

- KRIEF, S., ESCALANTE, A. A., PACHECO, M. A., MUGISHA, L., ANDRE, C., HALBWAX, M., FISCHER, A., KRIEF, J. M., KASENENE, J. M., CRANDFIELD, M., CORNEJO, O. E., CHAVATTE, J. M., LIN, C., LETOURNEUR, F., GRUNER, A. C., MCCUTCHAN, T. F., RENIA, L. & SNOUNOU, G. 2010. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS Pathogens*, 6, e1000765.
- KUHLMANN, N. 2007. Le premier rayon de la main et du pied chez les primates (I). Anatomie descriptive. *Morphologie*, 91, 149-158.
- LABOUBA, I. & LEROY, E. M. 2015. Ebola outbreaks in 2014. *J Clin Virol*, 64, 109-10.
- LACAN, A. 1963. Le *Plasmodium ovale* dans les territoires africains d'expression française. *Bulletin of the World Health Organization*, 29, 415.
- LARSSON, N. G. & CLAYTON, D. A. 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annual Review of Genetics*, 29, 151-78.
- LEE, M. E., ALONSO, A., DALLMEIER, F., CAMPBELL, P. & PAUWELS, O. S. 2006. Le Complexe d'Aires Protégées de Gamba: une illustration de la biodiversité du Gabon. *Gamba, Gabon: biodiversité d'une forêt équatoriale africaine*, 1.
- LEROY, E. M., GONZALEZ, J. P. & BAIZE, S. 2011. Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 964-76.
- LEROY, E. M., LABOUBA, I., MAGANGA, G. D. & BERTHET, N. 2014. Ebola in West Africa: the outbreak able to change many things. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, O597-O599.
- LEROY, E. M., ROUQUET, P., FORMENTY, P., SOUQUIERE, S., KILBOURNE, A., FROMENT, J.-M., BERMEJO, M., SMIT, S., KARESH, W. & SWANEPOEL, R. 2004. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science*, 303, 387-390.
- LIM, C., HANSEN, E., DESIMONE, T. M., MORENO, Y., JUNKER, K., BEI, A., BRUGNARA, C., BUCKEE, C. O. & DURAISINGH, M. T. 2013. Expansion of host cellular niche can drive adaptation of a zoonotic malaria parasite to humans. *Nature Communication*, 4, 1638.
- LIU, W., LI, Y., LEARN, G. H., RUDICELL, R. S., ROBERTSON, J. D., KEELE, B. F., NDJANGO, J. B., SANZ, C. M., MORGAN, D. B., LOCATELLI, S., GONDER, M. K., KRANZUSCH, P. J., WALSH, P. D., DELAPORTE, E., MPOUDI-NGOLE, E., GEORGIEV, A. V., MULLER, M. N., SHAW, G. M., PEETERS, M., SHARP, P. M.,

- RAYNER, J. C. & HAHN, B. H. 2010. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 467, 420-5.
- LIU, W., LI, Y., SHAW, K. S., LEARN, G. H., PLENDERLEITH, L. J., MALENKE, J. A., SUNDARARAMAN, S. A., RAMIREZ, M. A., CRYSTAL, P. A., SMITH, A. G., BIBOLLET-RUCHE, F., AYOUBA, A., LOCATELLI, S., ESTEBAN, A., MOUACHA, F., GUICHET, E., BUTEL, C., AHUKA-MUNDEKE, S., INOGWABINI, B. I., NDJANGO, J. B., SPEEDE, S., SANZ, C. M., MORGAN, D. B., GONDER, M. K., KRANZUSCH, P. J., WALSH, P. D., GEORGIEV, A. V., MULLER, M. N., PIEL, A. K., STEWART, F. A., WILSON, M. L., PUSEY, A. E., CUI, L., WANG, Z., FARNERT, A., SUTHERLAND, C. J., NOLDER, D., HART, J. A., HART, T. B., BERTOLANI, P., GILLIS, A., LEBRETON, M., TAFON, B., KIYANG, J., DJOKO, C. F., SCHNEIDER, B. S., WOLFE, N. D., MPOUDI-NGOLE, E., DELAPORTE, E., CARTER, R., CULLETON, R. L., SHAW, G. M., RAYNER, J. C., PEETERS, M., HAHN, B. H. & SHARP, P. M. 2014. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature Communication*, 5, 3346.
- LIWOUWOU, J., MONTCHO, S. A., CHIKOU, A., ADANDEDJAN, D., MBEGA, J. & LALEYE, A. 2014. Le régime alimentaire de *Schilbe multitaeniatus* (Pellegrin, 1913)(*Siluriforme, Schilbeidae*) de la rivière Rembo Bongo au Gabon (Afrique Centrale). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7, 1853-1865.
- LORENZ, J. G., JACKSON, W. E., BECK, J. C. & HANNER, R. 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1869-1877.
- LUCHAVEZ, J., ESPINO, F., CURAMENG, P., ESPINA, R., BELL, D., CHIODINI, P., NOLDER, D., SUTHERLAND, C., LEE, K.-S. & SINGH, B. 2008. Human infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerging infectious diseases*, 14, 811.
- LUPIEN, S. J., MCEWEN, B. S., GUNNAR, M. R. & HEIM, C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 434-445.
- LYONS, S., SHARP, C., LEBRETON, M., DJOKO, C. F., KIYANG, J. A., LANKESTER, F., BIBILA, T. G., TAMOUFE, U., FAIR, J., WOLFE, N. D. & SIMMONDS, P. 2012. Species association of hepatitis B virus (HBV) in non-human apes; evidence for recombination between gorilla and chimpanzee variants. *PLoS One*, 7, e33430.
- LYSENKO, A. J. & BELJAEV, A. 1969. An analysis of the geographical distribution of *Plasmodium ovale*. *Bulletin of the World Health Organization*, 40, 383.

- M.E.F 2000. Rapport du Ministere de l'Economie et Finance Gabon,.
- MACKINNON, M. J. & MARSH, K. 2010. The selection landscape of malaria parasites. *Science*, 328, 866-71.
- MADDISON, W. P., DONOGHUE, M. J. & MADDISON, D. R. 1984. Outgroup analysis and parsimony. *Systematic zoology*, 83-103.
- MAINGUY, J. & BERNATCHEZ, L. 2007. L'analyse de l'ADN sans manipulation des animaux: un outil incontournable pour la gestion et la conservation des espèces rares et élusives. *Le naturaliste canadien*, 31, 51-59.
- MAIOLINO, S., BOYER, D. M., BLOCH, J. I., GILBERT, C. C. & GROENKE, J. 2012. Evidence for a grooming claw in a North American adapiform primate: implications for anthropoid origins. *PloS one*, 7, e29135.
- MAIOLINO, S., BOYER, D. M. & ROSENBERGER, A. 2011. Morphological correlates of the grooming claw in distal phalanges of platyrrhines and other primates: a preliminary study. *The Anatomical Record*, 294, 1975-1990.
- MAKUNGU, M., GROENEWALD, H. B., DU PLESSIS, W. M., BARROWS, M. & KOEPEL, K. N. 2014. Osteology and Radiographic Anatomy of the Pelvis and Hind Limb of Healthy Ring-Tailed Lemurs (*Lemur catta*). *Anatomia, histologia, embryologia*, 43, 190-202.
- MALLOCH, D. 1995. Fungi with heteroxenous life histories. *Canadian journal of botany*, 73, 1334-1342.
- MANGUIN, S., CARNEVALE, P., MOUCHET, J., COOSEMANS, M., JULVEZ, J., RICHARD-LENOBLE, D. & SIRCOULON, J. 2008. Biodiversity of malaria in the world.
- MAPUA, M. I., QABLAN, M. A., POMAJBIKOVA, K., PETRZELKOVA, K. J., HUZOVA, Z., RADROVA, J., VOTYPKA, J., TODD, A., JIRKU, M., LEENDERTZ, F. H., LUKES, J., NEEL, C. & MODRY, D. 2015. Ecology of malaria infections in western lowland gorillas inhabiting Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *Parasitology*, 142, 890-900.
- MARSHALL, A. J. & WRANGHAM, R. W. 2007. Evolutionary consequences of fallback foods. *International Journal of Primatology*, 28, 1219-1235.
- MARTENS, P. & MCMICHAEL, A. J. 2002. *Environmental change, climate and health: issues and research methods*, Cambridge University Press.
- MARTIN, J.-M. 1981. Chronique sur l'énergie: les investissements des compagnies pétrolières et l'évolution des approvisionnements. *Revue d'économie industrielle*, 15, 92-110.

- MARTIN, M. J., RAYNER, J. C., GAGNEUX, P., BARNWELL, J. W. & VARKI, A. 2005. Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: relationship to human genetic loss of N-glycolylneuraminic acid. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 102, 12819-24.
- MARTINSEN, E. S., PERKINS, S. L. & SCHALL, J. J. 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47, 261-273.
- MARTINY, N., DESSAY, N., YAKA, P., TOURE, O., SULTAN, B., REBAUDET, S., BROUTIN, H., PIARROUX, R., CHIAPELLO, I. & SAGARA, I. 2012. Le climat, un facteur de risque pour la santé en Afrique de l'Ouest.
- MAVOUNGOU, J., ACAPOVI-YAO, G., KOHAGNE TONGUE, L., ZINGA KOUMBA, R., MBANG NGUEMA, O., OBAME ONDO, P., M'BATCHI, B., GILLES, J. & DUVALLET, G. 2013. Influence du degré de perturbation du milieu sur l'Activité journalière des stomoxys spp. (*Diptera: Muscidae*) au Nord-Est du Gabon. *Science de la vie, de la terre et agronomie*, 1.
- MAWILI-MBOUMBA, D. P., BOUYOU-AKOTET, M. K. & KOMBILA, M. 2012. Usage des antipaludiques en automédication pour le traitement de la fièvre chez les enfants au Gabon. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 21, 127-131.
- MAYAUX, P., BARTHOLOMÉ, E., MASSART, M., VAN CUTSEM, C., CABRAL, A., NONGUIERMA, A., DIALLO, O., PRETORIUS, C., THOMPSON, M. & CHERLET, M. 2003. A land cover map of Africa. Carte de l'occupation du sol de l'Afrique. *European Commission, Joint Research Center, EUR*, 20665.
- MCMICHAEL, A. J. 2001. *Human frontiers, environments and disease: past patterns, uncertain futures*, Cambridge University Press.
- MEGALI, A., YANNIC, G. & CHRISTE, P. 2011. Disease in the dark: molecular characterization of *Polychromophilus murinus* in temperate zone bats revealed a worldwide distribution of this malaria-like disease. *Molecular Ecology*, 20, 1039-48.
- MÉNARD, D., BARNADAS, C., BOUCHIER, C., HENRY-HALLDIN, C., GRAY, L. R., RATSIMBASOA, A., THONIER, V., CAROD, J.-F., DOMARLE, O. & COLIN, Y. 2010. Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 5967-5971.
- MESNIL, F. 1903. Les travaux recents sur les coccidies. *Bulletin Institut Pasteur*, 1, 473-480.

- MLAMBO, G., COPPENS, I. & KUMAR, N. 2012. Aberrant sporogonic development of Dmc1 (a meiotic recombinase) deficient *Plasmodium berghei* parasites. *PLoS One*, 7, e52480.
- MOMBO, I. M., BERTHET, N., BOUCHIER, C., FAIR, J. N., SCHNEIDER, B. S., RENAUD, F., LEROY, E. M. & ROUGERON, V. 2014. Characterization of a genogroup I sapovirus isolated from chimpanzees in the republic of congo. *Genome Announc*, 2.
- MORGAN, B. J. 2007. Group size, density and biomass of large mammals in the Reserve de Faune du Petit Loango, Gabon. *African Journal of Ecology*, 45, 508-518.
- MORSE, S. 2004. Factors and determinants of disease emergence. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 23, 443-452.
- MORSE, S. S. 1993. *Emerging viruses*, Oxford University Press.
- MOTA, M. M. & RODRIGUEZ, A. 2002. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *Bioessays*, 24, 149-156.
- MOTSCH, P., LE FLOHIC, G., LECLERCQ, J. & GONZALEZ, J.-P. 2011. Contribution à la ré-évaluation de l'aire de répartition du singe à queue de soleil (*Cercopithecus solatus*). *Revue de primatologie*.
- MOUCHET, J. 1996. L'écologie du paludisme. *Populations et environnement dans les pays du Sud*, 253.
- MOUCHET, J. 2004. *Biodiversité du paludisme dans le monde*, John Libbey Eurotext.
- MOUCHET, J., CARNEVALE, P., COOSEMANS, M., FONTENILLE, D., RAVAONJANAHARY, C., RICHARD, A. & ROBERT, V. 1993. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 3, 220-238.
- MPOUNZA, M. & SAMBA-KIMBATA, M. 1990. Aperçu sur le climat de l'Afrique centrale occidentale. *Paysages quaternaires de l'Afrique centrale atlantique*, ORSTOM, 31.
- MUSTFA, K. 2011. *Effets des antipaludiques sur les stades hépatiques et les stades sexuels (transmission) des plasmodies murines, Plasmodium yoelii*. Tours.
- NAPIER, J. R., TUTTLE, R. & TUTTLE, R. H. 1993. *Hands*, Princeton University Press.
- NGIMBI, N., WÉRY, M., TIMPERMAN, G., HENDRIX, L. & PEETERS-DE RUYSSER, F. 1979. Communications—Mededeüngen. *Annale de la Societe belge de Médecine tropicale*, 59, 237-250.
- NGUEMA NDOUTOUMOU, P., BOUANGA, E., MASSOUNGA, Y. & BOUSSIENGUI BOUSSIENGU, G. 2013. Étude comparée de trois méthodes de multiplication de

- Jatropha curcas* L. dans les conditions climatiques du sud-est du Gabon. *Journal of Applied Biosciences*, 65, 4989-4998.
- NIEPCERON, A. & LICOIS, D. 2007. Mise au point d'une technique dite de " nested PCR"(PCR nichée) pour la détection de *Clostridium piliforme*, agent de la maladie de Tyzzer. *12èmes Journ. Rech. Cunicole*. 27-28 nov., Le Mans, France, 223-226.
- NWAKANMA, D. C., GOMEZ-ESCOBAR, N., WALTHER, M., CROZIER, S., DUBOVSKY, F., MALKIN, E., LOCKE, E. & CONWAY, D. J. 2009. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. *Journal of Infect Diseases*, 199, 1567-74.
- OATES, J. F. 1984. The niche of the potto, *Perodicticus potto*. *International Journal of Primatology*, 5, 51-61.
- OIJEDRAOGO, R. K. 2008. Mise en évidence de l'alimentation sucrée chez les vecteurs du paludisme dans deux localités de l'Ouest du Burkina Faso.
- OLIVA, C. 2012. *Études biologiques et comportementales de deux espèces de moustiques (Aedes albopictus et Anopheles arabiensis) vectrices de maladies en vue du développement de la Technique de l'Insecte Stérile (TIS) contre ces vecteurs à l'île de la Réunion*. These de doctorat de l'Université de la Réunion.
- OLLOMO, B., DURAND, P., PRUGNOLLE, F., DOUZERY, E., ARNATHAU, C., NKOGHE, D., LEROY, E. & RENAUD, F. 2009. A new malaria agent in African hominids. *PLoS Pathogens*, 5, e1000446.
- OLLOMO, B., KARCH, S., BUREAU, P., ELISSA, N., GEORGES, A. J. & MILLET, P. 1997. Lack of malaria parasite transmission between apes and humans in Gabon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56, 440-5.
- OTTO, T. D., RAYNER, J. C., BOHME, U., PAIN, A., SPOTTISWOODE, N., SANDERS, M., QUAIL, M., OLLOMO, B., RENAUD, F., THOMAS, A. W., PRUGNOLLE, F., CONWAY, D. J., NEWBOLD, C. & BERRIMAN, M. 2014. Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. *Nature Communication*, 5, 4754.
- PACHECO, M., CRANFIELD, M., CAMERON, K. & ESCALANTE, A. A. 2013. Malarial parasite diversity in chimpanzees: the value of comparative approaches to ascertain the evolution of *Plasmodium falciparum* antigens. *Malaria Journal*, 12, 328.
- PAUL, A. S., EGAN, E. S. & DURAISINGH, M. T. 2015. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Current Opinion on Hematology*, 22, 220-6.

- PAUPY, C., MAKANGA, B., OLLOMO, B., RAHOLA, N., DURAND, P., MAGNUS, J., WILLAUME, E., RENAUD, F., FONTENILLE, D. & PRUGNOLLE, F. 2013. *Anopheles moucheti* and *Anopheles vinckei* are candidate vectors of ape *Plasmodium* parasites, including *Plasmodium praefalciparum* in Gabon. *PLoS One*, 8, e57294.
- PEARCE-DUVET, J. 2006. The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease. *Biological Reviews*, 81, 369-382.
- PEDERSEN, A. B. & DAVIES, T. J. 2009. Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *EcoHealth Journal*, 6, 496-508.
- PEIGNOT, P., FONTAINE, B. & WICKINGS, E. 2002. A preliminary study on the social relationships in a semi-free ranging colony of sun-tailed monkeys (*Cercopithecus solatus*), a species recently discovered in Gabon. *Primates*, 43, 139-146.
- PERKINS, S. L. 2014. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. *Journal of Parasitology*, 100, 11-25.
- PERKINS, S. L. & SCHALL, J. J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology*, 88, 972-8.
- PICQ, P. 2009. Existe-t-il des singes obèses? La mal-évolution de l'homme et la mal-bouffe. *Mutations*, 94-111.
- PIMLEY, E. R., BEARDER, S. K. & DIXSON, A. F. 2005. Home range analysis of *Perodicticus potto edwardsi* and *Sciurocheirus cameronensis*. *International Journal of Primatology*, 26, 191-206.
- POURTIER, R. 1989. *Le Gabon: Espace, histoire, société*, l'Harmattan.
- POUYDEBAT, E., BERGE, C., GORCE, P. & COPPENS, Y. 2006. La préhension chez les Primates: précision, outils et perspectives évolutives. *Comptes Rendus Palevol*, 5, 597-602.
- PRUDÊNCIO, M., RODRIGUEZ, A. & MOTA, M. M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 849-856.
- PRUGNOLLE, F., AYALA, F., OLLOMO, B., ARNATHAU, C., DURAND, P. & RENAUD, F. 2011a. *Plasmodium falciparum* is not as lonely as previously considered. *Virulence*, 2, 71-6.
- PRUGNOLLE, F., DURAND, P., NEEL, C., OLLOMO, B., AYALA, F. J., ARNATHAU, C., ETIENNE, L., MPOUDI-NGOLE, E., NKOGHE, D., LEROY, E., DELAPORTE, E., PEETERS, M. & RENAUD, F. 2010. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proceeding of the National Academy of Sci U S A*, 107, 1458-63.

- PRUGNOLLE, F., DURAND, P., OLLOMO, B., AYALA, F. J. & RENAUDA, F. 2011b. Reply to Sharp et al.: Host species sampling bias and *Plasmodium falciparum* origin paradigm shifts. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 108, E873.
- PRUGNOLLE, F., DURAND, P., OLLOMO, B., DUVAL, L., ARIEY, F., ARNATHAU, C., GONZALEZ, J. P., LEROY, E. & RENAUD, F. 2011c. A Fresh Look at the Origin of *Plasmodium falciparum*, the Most Malignant Malaria Agent. *PLoS Pathogens*, 7.
- PRUGNOLLE, F., OLLOMO, B., DURAND, P., YALCINDAG, E., ARNATHAU, C., ELGUERO, E., BERRY, A., POURRUT, X., GONZALEZ, J. P., NKOGHE, D., AKIANA, J., VERRIER, D., LEROY, E., AYALA, F. J. & RENAUD, F. 2011d. African monkeys are infected by *Plasmodium falciparum* nonhuman primate-specific strains. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 108, 11948-53.
- PRUGNOLLE, F., ROUGERON, V., BECQUART, P., BERRY, A., MAKANGA, B., RAHOLA, N., ARNATHAU, C., NGOUBANGOYE, B., MENARD, S., WILLAUME, E., AYALA, F. J., FONTENILLE, D., OLLOMO, B., DURAND, P., PAUPY, C. & RENAUD, F. 2013. Diversity, host switching and evolution of *Plasmodium vivax* infecting African great apes. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 110, 8123-8.
- RAE, T. C. & KOPPE, T. 2003. The term "lateral recess" and craniofacial pneumatization in old world monkeys (Mammalia, Primates, Cercopithecoidea). *Journal of morphology*, 258, 193-199.
- RAGEAU, J. & VERVERT, G. 1959. *Enquête entomologique sur le paludisme aux Nouvelles-Hébrides*, Commission du Pacifique Sud.
- RAHOLA, N., MAKANGA, B., YANGARI, P., JOLLE, D., FONTENILLE, D., RENAUD, F., OLLOMO, B., AYALA, D., PRUGNOLLE, F. & PAUPY, C. 2014. Description of *Anopheles gabonensis*, a new species potentially involved in rodent malaria transmission in Gabon, Central Africa. *Infection Genetec Evolution*, 28, 628-34.
- RANNALA, B. & YANG, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43, 304-311.
- RAYNER, J. C., LIU, W., PEETERS, M., SHARP, P. M. & HAHN, B. H. 2011. A plethora of *Plasmodium* species in wild apes: a source of human infection? *Trends in Parasitology*, 27, 222-9.
- REICHENOW, E. 1917a. Parásitos de la sangre y del intestino de los monos antropomorfos africanos. *Boletín Real Sociedad Española de Historia Natural.*, 17, 312-332.

- REICHENOW, E. 1917b. Sobre el problema de la inmunidad de los negros contra el paludismo, Nicolás Moya.
- REICHENOW, E. 1920. Den Wiederkäuer-Infusorien verwandte Formen aus Gorilla und Schimpanse. *Archiv für Protistenkunde*, 41, 1-33.
- REID, M. J., URSIC, R., COOPER, D., NAZZARI, H., GRIFFITHS, M., GALDIKAS, B. M., GARRIGA, R. M., SKINNER, M. & LOWENBERGER, C. 2006. Transmission of human and macaque *Plasmodium spp.* to ex-captive orangutans in Kalimantan, Indonesia. *Emerging infectious diseases*, 12, 1902.
- RICH, S. M., LEENDERTZ, F. H., XU, G., LEBRETON, M., DJOKO, C. F., AMINAKE, M. N., TAKANG, E. E., DIFFO, J. L., PIKE, B. L. & ROSENTHAL, B. M. 2009. The origin of malignant malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 14902-14907.
- RICKLEFS, R. E. & MILLER, G. L. 2005. *Ecologie*, De Boeck Supérieur.
- ROBERT, V. & BOUDIN, C. 2003. Parasitologie. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 96, 6-20.
- RODHAIN, J. 1948. Contribution à l'étude des *Plasmodiums* des anthropoïdes africains. *Annal de la Societe Belg de Medecine Tropicale*, 28, 39-49.
- RODHAIN, J. Contribution to the study of *Plasmodium schwetzi*, E. Brumpt. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*, 1955. 69.
- RODHAIN, J. Les formes preerythrocytaires du *Plasmodium vivax* chez le chimpanze. *Annales de la Société Belge Médecine Tropicale*, 1956. 99-103.
- RODHAIN, J. & VAN DEN BERGHE, L. 1936. Contribution à l'étude des *Plasmodiums* des singes africains. *Annal de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 16, 237-253.
- ROGERS, M. E., ABERNETHY, K., BERMEJO, M., CIPOLLETTA, C., DORAN, D., MCFARLAND, K., NISHIHARA, T., REMIS, M. & TUTIN, C. E. 2004. Western gorilla diet: a synthesis from six sites. *American Journal of Primatology*, 64, 173-192.
- RONAGHI, M., UHLÉN, M. & NYRÉN, P. 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281, 363-365.
- RUEDA, L. M. 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: *Culicidae*) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*. Springer.
- RUFF, C. 2008. Femoral/humeral strength in early African *Homo erectus*. *Journal of human evolution*, 54, 383-390.
- SABOURDY, F. 2001. *Diagnostic par PCR des rétroviroses félines*.

- SALOMON, J. A. & MURRAY, C. J. 2001. Modelling HIV/AIDS epidemics in sub-Saharan Africa using seroprevalence data from antenatal clinics. *Bulletin of World Health Organisation*, 79, 596-607.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 5463-5467.
- SANTONI, S., FAIVRE-RAMPANT, P., PRADO, E. & PRAT, D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 9, 311-27.
- SAYER, J., HARCOURT, C. & MARK, C. 1992. Conservation Atlas of tropical forests: Africa. *Gland: IUCN*.
- SCHAER, J., PERKINS, S. L., DECHER, J., LEENDERTZ, F. H., FAHR, J., WEBER, N. & MATUSCHEWSKI, K. 2013. High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 110, 17415-9.
- SCHMITT, D. 2010. Primate locomotor evolution: Biomechanical studies of primate locomotion and their implications for understanding primate neuroethology. *Primate neuroethology*, 10-30.
- SCHMITTBUHL, M. 1996. *Différentes techniques d'analyse d'images appliquées à la morphologie faciale des primates hominoïdes*.
- SÉNUT, B. 1979. Comparaison des Hominidés de Gomboré IB et de Kanapoi; deux pièces du genre *Homo*? *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, 6, 111-117.
- SHARP, P. M., RAYNER, J. C. & HAHN, B. H. 2013. Evolution. Great apes and zoonoses. *Science*, 340, 284-6.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87, 651-701.
- SINGH, B., SUNG, L. K., MATUSOP, A., RADHAKRISHNAN, A., SHAMSUL, S. S., COX-SINGH, J., THOMAS, A. & CONWAY, D. J. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 363, 1017-1024.
- SNOUNOU, G., ESCALANTE, A., KASENENE, J., RENIA, L., GRUNER, A. C. & KRIEF, S. 2011. Malaria in hominids. *Bulletin de l'Académie National de Médecine*, 195, 1945-54.

- SNOW, R. W., GUERRA, C. A., NOOR, A. M., MYINT, H. Y. & HAY, S. I. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434, 214-217.
- SOR-SUWAN, S., JARIYAPAN, N., ROYTRAKUL, S., PAEMANEE, A., PHUMEE, A., PHATTANAWIBOON, B., INTAKHAN, N., CHANMOL, W., BATES, P. A., SAEUNG, A. & CHOOCHOTE, W. 2014. Identification of salivary gland proteins depleted after blood feeding in the malaria vector *Anopheles campestris*-like mosquitoes (Diptera: *Culicidae*). *PLoS One*, 9, e90809.
- SOULÉ, C., GUILLOU, J., VALLET, C., PERRET, C. & CALAMEL, M. 1994. Détection, par PCR, de larves de *Trichinella spiralis* dans le sang d'un cheval expérimentalement infesté. *Veterinary Research*, 25, 606-607.
- STAMATAKIS, A., LUDWIG, T. & MEIER, H. 2005. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21, 456-463.
- SUNDARARAMAN, S. A., LIU, W., KEELE, B. F., LEARN, G. H., BITTINGER, K., MOUACHA, F., AHUKA-MUNDEKE, S., MANSKE, M., SHERRILL-MIX, S., LI, Y., MALENKE, J. A., DELAPORTE, E., LAURENT, C., MPOUDI NGOLE, E., KWIATKOWSKI, D. P., SHAW, G. M., RAYNER, J. C., PEETERS, M., SHARP, P. M., BUSHMAN, F. D. & HAHN, B. H. 2013. *Plasmodium falciparum*-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 110, 7020-5.
- SUNNUCKS, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 199-203.
- SUSSMAN, R. W. 1991. Primate origins and the evolution of angiosperms. *American Journal of Primatology*, 23, 209-223.
- TA, T. H., HISAM, S., LANZA, M., JIRAM, A. I., ISMAIL, N. & RUBIO, J. M. 2014. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria Journal*, 13, 68.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28, 2731-2739.
- TAYLOR, A. B. 2006. Diet and mandibular morphology in African apes. *International Journal of Primatology*, 27, 181-201.

- TEMPLETON, A. R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution*, 221-244.
- THALMANN, O., FISCHER, A., LANKESTER, F., PÄÄBO, S. & VIGILANT, L. 2007. The complex evolutionary history of gorillas: insights from genomic data. *Molecular biology and evolution*, 24, 146-158.
- THOMAS, F., RENAUD, F. & GUÉGAN, J.-F. 2005. *Parasitism and ecosystems*, Oxford University Press Oxford.
- TOFT, J. D., 2ND 1982. The pathoparasitology of the alimentary tract and pancreas of nonhuman primates: a review. *Veterinary Pathology Supplement*, 7, 44-92.
- TUTIN, C. E. & FERNANDEZ, M. 1984. Nationwide census of gorilla (*Gorilla g. gorilla*) and chimpanzee (*Pan t. troglodytes*) populations in Gabon. *American Journal of Primatology*, 6, 313-336.
- TUTIN, C. E. & FERNANDEZ, M. 1985. Foods consumed by sympatric populations of *Gorilla g. gorilla* and *Pan t. troglodytes* in Gabon: Some preliminary data. *International Journal of Primatology*, 6, 27-43.
- TUTIN, C. E. & FERNANDEZ, M. 1992. Insect-eating by sympatric Lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*) and chimpanzees (*Pan t. troglodytes*) in the Lopé Reserve, Gabon. *American Journal of Primatology*, 28, 29-40.
- TUTIN, C. E., FERNANDEZ, M., ROGERS, M. E., WILLIAMSON, E. A., MCGREW, W. C., ALTMANN, S. A., SOUTHGATE, D., CROWE, I., TUTIN, C. & WHITEN, A. 1991. Foraging profiles of sympatric lowland gorillas and chimpanzees in the Lopé Reserve, Gabon [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 334, 179-186.
- TUTIN, C. E., PARNELL, R. J., WHITE, L. J. & FERNANDEZ, M. 1995. Nest building by lowland gorillas in the Lopé Reserve, Gabon: environmental influences and implications for censusing. *International Journal of Primatology*, 16, 53-76.
- VALIÈRE, N., FUMAGALLI, L., GIELLY, L., MIQUEL, C., LEQUETTE, B., POULLE, M. L., WEBER, J. M., ARLETTAZ, R. & TABERLET, P. 2003. Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, 6, 83-92.
- VALKIUNAS, G., BENSCH, S., IEZHOVA, T. A., KRIZANAUSKIENE, A., HELLGREN, O. & BOLSHAKOV, C. V. 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction

- diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology*, 92, 418-22.
- VALKIUNAS, G., SEHGAL, R. N., IEZHOVA, T. A. & SMITH, T. B. 2005. Further observations on the blood parasites of birds in Uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, 41, 580-7.
- VERCRUYSSSE, J. 1984. Evaluation de la durée du cycle gonotrophique d'*Anopheles arabiensis* dans une zone urbaine (Pikine, Sénégal). *Cahiers-ORSTOM. Entomologie médicale et parasitologie*, 21, 83-90.
- VERHULST, N. O., SMALLEGANGE, R. C. & TAKKEN, W. 2012. Mosquitoes as potential bridge vectors of malaria parasites from non-human primates to humans. *Frontiers in Physiology*, 3, 197.
- VINCKE, I. 1966. Observations récentes sur la transmission cyclique du *Plasmodium berghei*.
- VLACHOU, D., SCHLEGELMILCH, T., RUNN, E., MENDES, A. & KAFATOS, F. C. 2006. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current opinion in genetics & development*, 16, 384-391.
- VOLKMAN, S. K., BARRY, A. E., LYONS, E. J., NIELSEN, K. M., THOMAS, S. M., CHOI, M., THAKORE, S. S., DAY, K. P., WIRTH, D. F. & HARTL, D. L. 2001. Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science*, 293, 482-4.
- VOROBYEV, M. 2004. Ecology and evolution of primate colour vision. *Clinical and Experimental Optometry*, 87, 230-238.
- WALSH, P. D., ABERNETHY, K. A., BERMEJO, M., BEYERS, R., DE WACHTER, P., AKOU, M. E., HUIJBREGTS, B., MAMBOUNGA, D. I., TOHAM, A. K. & KILBOURN, A. M. 2003. Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. *Nature*, 422, 611-614.
- WALSH, P. D., BREUER, T., SANZ, C., MORGAN, D. & DORAN-SHEEHY, D. 2007. Potential for Ebola transmission between gorilla and chimpanzee social groups. *The American Naturalist*, 169, 684-689.
- WANAGURU, M., LIU, W., HAHN, B. H., RAYNER, J. C. & WRIGHT, G. J. 2013. RH5-Basigin interaction plays a major role in the host tropism of *Plasmodium falciparum*. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 110, 20735-40.
- WANG, Q., FUJIOKA, H. & NUSSENZWEIG, V. 2005. Exit of *Plasmodium* sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein.

- WATERS, A., HIGGINS, D. & MCCUTCHAN, T. 1991. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 3140-3144.
- WEBSTER, R. G., PEIRIS, M., CHEN, H. & GUAN, Y. 2006. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerging Infectious Disease*, 12, 3-8.
- WHITE, F. 1983. The vegetation of Africa, a descriptive memoir to accompany the UNESCO/AETFAT/UNSO vegetation map of Africa (3 Plates, Northwestern Africa, Northeastern Africa, and Southern Africa, 1: 5,000,000). *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris, France*.
- WHO 2015. WORLD MALARIA Report 2014. 242.
- WILCOX, B. A. & ELLIS, B. 2006. Forests and emerging infectious diseases of humans. *UNASYLVA-FAO*, 57, 11.
- WILKS, C. 1990. *La conservation des écosystèmes forestiers du Gabon*, IUCN.
- WILSON, D. E. & REEDER, D. M. 2005. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, JHU Press.
- WILSON, N. O., ADJEI, A. A., ANDERSON, W., BAIDOO, S. & STILES, J. K. 2008. Detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II in saliva of malaria patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 733-5.
- WOLFE, N. D., DASZAK, P., KILPATRICK, A. M. & BURKE, D. S. 2005. Bushmeat hunting, deforestation, and prediction of zoonotic disease. *Emerging infectious diseases*, 11, 1822-1827.
- WOLFE, N. D., DUNAVAN, C. P. & DIAMOND, J. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature*, 447, 279-283.
- WOLFE, N. D., ESCALANTE, A. A., KARESH, W. B., KILBOURN, A., SPIELMAN, A. & LAL, A. A. 1998. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerging infectious diseases*, 4, 149.
- WOODFORD, M. H., BUTYNSKI, T. M. & KARESH, W. B. 2002. Habituating the great apes: the disease risks. *Oryx*, 36, 153-160.
- WOODWARD, H. Exhibitions And Notices: May 23rd, 1916. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1916. Wiley Online Library, 539-551.
- WRIGHT, G. J. & RAYNER, J. C. 2014. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS Pathogens*, 10, e1003943.

- YANG, Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular evolution*, 39, 306-314.
- YILDIRIM, S. 2014. Terrestrial Vertebrate Animal Metagenomics: Non-domesticated Primates, Prosimians. *In*: NELSON, K. E. (ed.) *Encyclopedia of Metagenomics*. Springer New York.
- YOUNG, N. M., WAGNER, G. P. & HALLGRÍMSSON, B. 2010. Development and the evolvability of human limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 3400-3405.

Liste des autres articles scientifiques

A-Articles Publiés

No Evidence for Ape *Plasmodium* Infections in Humans in Gabon

Délicat-Loembet L, Rougeron V, Ollomo B, Arnathau C, Roche B, Elguero E, Moukodoum ND, Okougha AP, Mve Ondo B, **Boundenga L**, Houzé S, Galan M, Nkoghe D, Leroy EM, Durand P, Paupy C, Renaud F, Prugnolle F. (PLoS One. 2015 Jun 3;10(6):.doi: 10.1371).

Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Baka Pygmies and their Bantu neighbours in the north of Gabon

Bertrand Mvé-Ondo; Dieudonné Nkoghe; Céline Arnathau; Virginie Rougeron; Ulrich Bisvigou; Lauriane Yacka Mouele; **Larson Boundenga**; Patrick Durand; Eric Elguero; Simone Lemmers; Lucrèce M Délicat-Loembet; Nancy Diamella Moukodoum; Christophe Paupy; François Renaud; Franck Prugnolle; Benjamin Ollomo (Malar J. 2015 Oct 9;14(1):395. doi: 10.1186/s12936.

B-Articles en cours de soumission et préparation

Phylogeography analysis and molecular evolution patterns of *Hepatocystis* with these hosts

Larson Boundenga, Barthélemy Ngoubangoyi, Illich Mombo, Virginie Rougeron, Dominique Pontier, François Renaud, Benjamin Ollomo, Franck Prugnolle. (**En préparation**)

Dynamic of *Plasmodium* infection among mandrills

Larson Boundenga, Barthélémy Ngoubangoye*, Illich Mombo*, Céline Arnathau*, Lucas Leger, Eric Elguero, Nancy Diamella Moukodoum, Eloïse Suquet, Virginie Rougeron, Cheikh Tidiane BA, Marie Charpentier, François Renaud, Benjamin Ollomo, Franck Prugnolle (**En préparation**)

First identification of an Astrovirus in wild gorilla

Illich M Mombo, **Larson Boundenga**, Barthélémy Ngoubangoye, Céline Arnathau, Patrick Durand, Benjamin Ollomo, Franck Prugnolle, Gael D Maganga, François Renaud, Eric Leroy and Virginie Rougeron (**En cours de soumission**)

African non-human primates as reservoirs of a large diversity of enteroviruses

Illich M. Mombo, Alexander N. Lukashev, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, **Larson Boundenga**, Nicolas Berthet, Barthélemy Ngoubangoye, Gael D. Maganga, Patrick Durand, Céline Arnathau, Vanina Boué, Florian Liegois, Benjamin Ollomo, Franck Prugnolle, Jan F. Drexler, Christian Drosten, François Renaud, Virginie Rougeron, Eric M. Leroy (**En cours de soumission Plos Neglected Tropical Disease**)

Communications :

Orales :

Titre : Diversité plasmodiale chez les grands singes du Gabon et leur distribution.

Larson Boundenga, Benjamin Ollomo, Alain Okouga, Franck Prugnolle (Conférence nationale : Journée mondiale de lutte contre le Paludisme à Libreville, 2014).

Adresse : larson.boundenga@cirmf.ga

Titre : Facteurs de régulation des populations de grands singes : Influence des maladies Infectieuse sur les communautés de grands singes au Gabon.

Larson Boundenga: PhD-student: (2^e Atelier GABalliance USTM 2013)

Résumé

L'émergence des maladies infectieuses est liée à l'anthropisation croissante et la conquête par l'homme du milieu forestier. Les activités humaines augmentent les interactions entre l'Homme et la faune sauvage ce qui a pour conséquences des échanges de pathogènes. Il devient ainsi crucial et urgent de recueillir des données précises sur la diversité des agents pathogènes circulant dans la faune sauvage et en particulier chez les primates non humains (PNHs). Les parasites du genre *Plasmodium*, agent du paludisme chez l'homme, sont des parasites dont l'histoire passée et présente montre qu'ils sont capables d'infecter une large gamme d'hôtes lorsque l'opportunité se présente. Ce travail de thèse a pour but de comprendre les risques d'émergences de nouveaux agents du paludisme au Gabon. Nous nous sommes intéressés à étudier (i) la diversité plasmodiale chez les primates non humains, (ii) d'estimer la possibilité de transfert inter-espèces et (iii) d'évaluer la virulence de ces pathogènes sur la santé de primates. Ces questions ont été abordées à travers différentes approches réunissant des méthodes non-invasives et invasives pour la collecte d'échantillons, des outils de biologie moléculaire ainsi que des analyses phylogénétiques. Les résultats obtenus montrent l'existence de 11 espèces de *Plasmodium* qui circulent chez les PNHs du Gabon : *P. gaboni*, *P. reichenowi*, *P. billcollinsi*, *P. adleri*, *P. blacklocki*, *Praefalciparum*, *P. ovale-like*, *P. vivax-like*, *P. malariae-like*, *P. gonderi* et *P. sp DAJ*. Cette thèse a aussi permis de démontrer pour la première fois que la barrière génétique qui détermine la spécificité d'hôte apparente des *Laverania* (sous-genre de parasites infectant les grands singes africains) n'est pas complètement imperméable, et que des échanges de parasites entre gorilles et chimpanzés sont possibles dans des environnement confinés. Elle montre également que l'Homme peut transmettre *P. falciparum* aux chimpanzés et aux mandrills. Aucun transfert de *P. falciparum* vers les gorilles n'a été documenté. En outre, aucune souche simienne n'a été retrouvée dans la population humaine. L'analyse des parasites circulant dans la faune sauvage au Gabon nous a permis de mettre en évidence quatre nouvelles lignées qui circulent chez les céphalophes et de montrer que celles-ci, d'un point de vue écologique, ne sont pas uniquement spécifiques aux antilopes. Le suivi de santé des primates, nous a également permis de montrer que ces parasites peuvent avoir des effets délétères sur grands singes. L'ensemble de nos résultats démontrent que les grands singes du Gabon sont naturellement infectés par une large diversité de *Plasmodium* qui peuvent provoquer la maladie chez les primates et soulignent le fait que ces échanges des pathogènes entre Homme et primates non-humains pourraient avoir des implications pour la conservation et la santé publique.

PLASMODIUM OF PRIMATES OF GABON: DIVERSITY, INTER-SPECIES TRANSFER AND VIRULENCE.

Abstract

Emergence of infectious diseases is connected to the increasing anthropization and the conquest of man in the forest environment. Human activities increase the interactions between humans and wildlife leading to exchanges of pathogens. Thus, it becomes crucial and urgent to collect accurate data on pathogens diversity which circulate in wildlife and in non-human primates in particular (NHPs). Parasites of the genus *Plasmodium*, agent of malaria in man, are parasites whose past and present history shows that they are able to infect a wide range of hosts when the opportunity arises. The aim of this thesis is to understand the risks of emergence of new malaria agents in Gabon. We were interested in studying (i) *Plasmodium* diversity in non-human primates, (ii) in estimating the possibility of transfer inter-species and (iii) in evaluating the virulence of these pathogens on the health of primates. These questions were approached through various methods combining non-invasive and invasive methods for the collection of samples, tools of molecular biology as well as phylogenetic analyses for pathogens characterization. The results show the existence of 11 species of *Plasmodium* which circulate in apes: *P. gaboni*, *P. reichenowi*, *P. billcollinsi*, *P. adleri*, *P. blacklocki*, *Praefalciparum*, *P. ovale-like*, *P. vivax-like*, *P. malariae-like*, *P. gonderi* and *P. sp DAJ*. This thesis also allowed to demonstrate for the first time that genetic barrier which determines specificity of host of parasites of subgenus of *Laverania* is not completely impermeable, and exchanges of parasites between gorillas and chimpanzee are possible in confined environment. It also shows that Man can transmit *P. falciparum* to chimpanzees and mandrill. No strain of simian *Plasmodium* circulate in human population. The analysis of wildlife animals allowed us to highlight four new lineages of *Haemosporidia* which circulate in duikers. The monitoring of apes' health, also allowed us to show that these parasites can have deleterious effects on great apes. The set of our results shows that great apes in Gabon are naturally infected with a wide variety of *Plasmodium* that can cause disease in primates and underline the fact that these exchanges of pathogens between non-human primates and man could have implications for conservation and public health.

Discipline : Biodiversité et Environnement

Mots clés : Diversité, *Plasmodium*, spécificité hôte, Transferts inter-espèces, Virulence, phylogénie, PNH, Homme, Céphalophes, outils moléculaires.
