

PRÉVALENCE, DIVERSITÉ ANTIGÉNIQUE ET MULTIPLICITÉ D'INFECTIONS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EN MILIEU SCOLAIRE AU CENTRE DE LA CÔTE D'IVOIRE

K. D. SILUE, I. FELGER, J. UTZINGER, H-P. BECK, T.A. SMITH, M. TANNER, E.K. N'GORAN

Med Trop 2006; **66** : 149-156

RÉSUMÉ • Une étude a été conduite à Taabo-village, localité rurale du centre de la Côte d'Ivoire, située à proximité d'un grand lac artificiel. Les objectifs étaient (i) de déterminer le taux d'endémicité du paludisme, la diversité antigénique et la multiplicité des infections à *Plasmodium falciparum* au sein d'écoliers, et (ii) de comparer la performance du diagnostic microscopique à celle de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Au total, 424 élèves âgés de 5 à 15 ans ont eu des examens de sang au microscope et par PCR. La multiplicité d'infection a porté sur 196 (46,2 %) d'entre eux. L'indice plasmodique détecté au microscope est de 54,7 % et de 83,9 % par PCR. Les typages génotypiques déterminés par le polymorphisme des longueurs de fragments de restriction du gène *msp2* des protéines de surface-2 du mérozoïte (*msp2*), ont révélé 86,5 % de cas d'infections multiples, avec une moyenne géométrique de 3,87 génotypes par individu positif. Une corrélation positive significative a été obtenue entre la multiplicité et les densités parasitaires au sein du groupe d'âge 5-6 ans. 50 génotypes dont six observés pour la première fois, ont été dénombrés puis classés en familles de tailles similaires FC27 (n=26 ; 52 %) et 3D7 (n=24 ; 48 %). Comparé à la PCR, la microscopie a montré une sensibilité et une spécificité respectivement de 81,3 % et 88,2 %. Nos données sont discutées au regard d'études similaires en Afrique sub-saharienne et ailleurs, et peuvent servir de base à long terme pour l'évaluation d'impact des grands aménagements d'eau sur la prévalence, la diversité antigénique et la multiplicité des infections à *P.falciparum*.

MOTS-CLÉS • Paludisme - *Plasmodium falciparum* - Microscopie - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) - mérozoïte surface protein-2 (*msp2*) - Multiplicité d'infection - Côte d'Ivoire

PREVALENCE, GENETIC DIVERSITY AND MULTIPLICITY OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* INFECTION IN SCHOOL CHILDREN IN CENTRAL COTE D'IVOIRE

ABSTRACT • A study was carried out in the village of Taabo, located in the vicinity of a large man-made lake in central Côte d'Ivoire. The objectives were (i) to determine the level of prevalence, genetic diversity and multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in schoolchildren and (ii) to compare the diagnostic performance of light microscopy and polymerase chain reaction (PCR). A total of 424 schoolchildren ranging in age from 5 to 15 years underwent diagnostic testing using both light microscopy of blood smears and PCR. Multiplicity of *P. falciparum* infection was investigated in 196 children (46.2%). The prevalence of malaria was 54.7 % based on light microscopy and 83.9% based on PCR. Genotyping based on polymorphism in the length of the restriction fragment of the gene encoding the merozoite surface protein-2 (*msp2*) showed that 86.5% of cases involved multiple infection with a geometric mean of 3.87 genotypes per positive child. There was a strong positive correlation between multiplicity of infection and parasite density in the 5-6-year old age group. A total of 50 genotypes including six observed for the first time were identified and classified into families with similar-sized sequence groups: 26 x FC27 (52%) and 24 x 3D7 (48%). In comparison with PCR, the sensitivity and specificity of light microscopy for diagnosis of *P. falciparum* was 81.3% and 88.2% respectively. Data are discussed in the light of similar studies carried out in sub-Saharan Africa and elsewhere. These findings can serve as a basis for monitoring the long-term effect of major water resource management projects on the prevalence, genetic diversity and multiplicity of *P. falciparum* infection

KEY WORDS • Malaria - *Plasmodium falciparum* - Light microscopy - Polymerase chain reaction (PCR) - Merozoite surface protein-2 (*msp2*) - Multiplicity of infection - Côte d'Ivoire.

Le paludisme est une endémie parasitaire très répandue dans les zones tropicales. On estime que 2,2 milliards d'individus sont exposés au risque d'infection et que 515 millions d'épisodes cliniques de paludisme se sont produits en l'an

- Travail de l'Université d'Abidjan-Cocody (K.D.S. Etudiant en Thèse de Docteur ; E.K.N., Professeur de parasitologie, Responsable de l'Unité de Recherche et de Formation Parasitologie et Ecologie Parasitaire), du Centre Suisse de Recherches Scientifiques, 01 BP 1303, Abidjan 01, Côte d'Ivoire et de l'Institut Tropical Suisse, (I.F., Biologiste moléculaire ; J.U., Epidémiologiste ; H.P.B., Professeur de biologie moléculaire ; T.A.S., Professeur de bio-statistique ; M.T., Professeur d'épidémiologie et Directeur de l'Institut Tropical Suisse) Bâle, Suisse.
- Correspondance : E.K. N'GORAN, Université d'Abidjan-Cocody, 22 BP 770, Abidjan 22, Côte d'Ivoire • Fax: +225 2345-1211.
- Courriel : eliezerngoran@yahoo.fr
- Article reçu le 16/05/2005, définitivement accepté le 31/01/2006.

2002 (1). Au moins 1 million de décès sont enregistrés chaque année, surtout chez les enfants de moins de 5 ans (2). L'Afrique sub-saharienne paye le plus lourd tribut avec environ 90 % du fardeau (2, 3). Le paludisme sévit surtout en milieu rural (4, 5). Cette maladie est fortement influencée par l'environnement et souvent liée aux projets de développement des ressources en eau dont la mise en œuvre ne tient souvent pas compte des retombées négatives sur les écosystèmes (6, 7).

En Côte d'Ivoire, le paludisme continue de demeurer un énorme problème de santé publique. C'est le premier motif de consultation dans les formations sanitaires, particulièrement pendant les périodes de pluies (8). Il est responsable d'au moins 60 % des consultations dans les hôpitaux et de 46 % dans les services de pédiatrie. Il reste la première cause de mor-

talité infantile (21 %). L'absentéisme professionnel dû au paludisme et les pertes du revenu agricole sont énormes (9).

Le diagnostic précoce et précis reste l'une des stratégies cruciales pour le contrôle de cette maladie, ainsi que la prise en charge rapide par un traitement efficace des cas dans les zones endémiques. L'examen microscopique de la goutte épaisse et du frottis mince réalisés à partir du sang périphérique reste la méthode conventionnelle de terrain largement utilisée dans de nombreuses études épidémiologiques et de santé publique dans les régions endémiques (10). Au laboratoire, des techniques moléculaires plus sophistiquées, bien qu'onéreuses, sont souvent utilisées pour le diagnostic des infections parasitaires dans les centres disposant des compétences et des ressources nécessaires. C'est le cas de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette technique est également un important outil de recherche, servant à étudier la diversité antigénique et la multiplicité des infections de *P. falciparum*, qui sont des critères importants pour élucider les infections palustres, et pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie et l'évaluation de programmes de lutte (11). Les individus résidant en zone d'endémie palustre peuvent héberger une à plusieurs souches simultanément et le nombre varie suivant le niveau d'endémicité des sites (12, 14).

Les objectifs de la présente étude conduite dans une localité du centre de la Côte d'Ivoire visent premièrement, à déterminer le taux d'endémicité du paludisme, à évaluer la diversité antigénique et la multiplicité des infections à *P. falciparum* en milieu scolaire, et à explorer les liens entre la multiplicité des infections, les densités parasitaires observées et l'âge des individus hôtes. Deuxièmement, à estimer la sensibilité et la spécificité de la microscopie par rapport à la PCR dans le diagnostic des infections à *P. falciparum*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Site d'étude et participants

L'étude a été menée en Janvier 2001 à Taabo-village, localité située au Sud de la zone centrale de Côte d'Ivoire dans le district de Tiassalé à 150 km au Nord-ouest d'Abidjan, capitale économique Ivoirienne. Ce village est bâti à proximité du barrage hydroélectrique de Taabo, avec une population d'environ 1 500 habitants (15,16). Les autochtones sont essentiellement des planteurs. Les étrangers venant des pays voisins (Burkina Faso, Guinée et Mali) sont des pêcheurs ayant migré après la construction du barrage depuis les années 1980 (17). La saison des pluies s'étend d'Avril à Septembre avec des précipitations annuelles d'environ 1 100 mm.

Des enquêtes parasitologiques préliminaires ont montré une prévalence de paludisme, essentiellement à *P. falciparum*, de 55 % chez un échantillon de 94 enfants d'âge compris entre 5 et 15 ans. Taabo-village est également un important foyer de bilharziose urinaire due à *Schistosoma haematobium* (15, 18). Au cours du premier essai clinique, l'artemether a montré son efficacité dans le contrôle des infections de *S. haematobium* à six doses de 6 mg/kg répétées une fois chaque quatorze semaines (16).

Les conditions d'étude ont été passées en revue et approuvées par les différents comités d'examen institutionnel de l'Institut Tropical Suisse (ITS ; Bâle, Suisse) et du Centre Suisse de Recherches Scientifiques (CSRS ; Abidjan, Côte d'Ivoire) ainsi que par le Ministère de la Santé Publique et de la Population en Côte d'Ivoire pour les questions d'éthique. Les conditions d'étude ont été expliquées aux enseignants et parents d'élèves. Sur les 455 volontaires enregistrés par les enseignants, 424 élèves âgés de 5 à 15 ans ont participé à l'étude. Pour chacun d'eux, des gouttes épaisses et frottis sanguins ont été réalisés et quelques gouttes de sang furent collectées sur des matrices stériles de PCR Isocode™ Dipstick (Schleicher & Schuell ; Dassel, Allemagne) convenablement séchées à la température ambiante puis conservées individuellement dans des sachets plastiques stérilisés pour les études moléculaires.

Examens des prélèvements sanguins

Les échantillons de sang sont colorés dans une solution de GIEMSA à 10 % et les lectures microscopiques effectuées à l'huile à immersion au grossissement 100. Pour les cas positifs, l'identification parasitaire est réalisée sur frottis mince et les densités parasitaires sont évaluées à partir de la goutte épaisse pour 200 ou 500 leucocytes. Les valeurs individuelles obtenues pour la parasitémie sont finalement ramenées à 1 µl de sang sur la base de 8 000 leucocytes (6) en effectuant le produit du nombre de parasites obtenus par 40 ou 16, respectivement pour 200 ou 500 leucocytes (19). Un contrôle de qualité a été effectué avec l'appui du chef technicien pour 10 % des lectures microscopiques choisies au hasard.

Manipulations moléculaires au laboratoire

Une unité de la matrice stérile de PCR Isocode™ Dipstick imbibée de sang est soigneusement lavée et rincée à l'eau selon les prescriptions du fournisseur. Les différents tubes contenant les échantillons individuels reçoivent chacun 100 µl d'une solution « Master Mix » de PCR et sont ensuite disposés dans un thermocycler (Perkin ELMER). Le profil PCR utilisé pour amplifier le gène responsable des protéines de surface-2 du mérozoïte (*mSP2*) s'établit comme suit : 5 min à 94°C, suivis de 30 cycles de 30 sec à 94°C, 2 min 55°C, 2 min 70°C, suivi d'une dernière étape d'extension de 7 min à 72°C. Pour augmenter la sensibilité et la spécificité, deux réactions consécutives de PCR ont été réalisées. Une première PCR (pPCR) et une seconde PCR dite PCR nichée (nPCR). Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *mSP2* sont spécifiques à *P. falciparum* (20). Elles sont sélectionnées dans des régions conservées bordant immédiatement la partie centrale polymorphique du gène. Pour la pPCR, ce sont les amorces S2: 5'- GAA GGT AAT TAA AAC ATT GTC - 3' (sens) et S3: 5'- GAG GGA TGT TGC TGC TCC ACA G - 3' (anti sens). Dans le cas de la nPCR, ce sont les amorces S1: 5'- GAG TAT AAG GAG AAG TAT G - 3' (sens) et S4: 5'- CTA GAA CCA TGC ATA TGT CC - 3' (anti sens). Le produit final de PCR varie en longueur entre 378 bp et 740 bp (21).

Les produits de nPCR sont soumis à migration dans un gel d'agarose 1 % pour vérifier la positivité. 15 µl de chaque produit positif de nPCR subissent des digestions enzymatiques à l'aide d'endonucléases *HinfI* ou *DdeI*. Les fragments de restriction sont ensuite séparés dans un gel de polyacrylamide 10 %. Un marqueur moléculaire (1 kb ladder BRL) a été soumis à migration au voisinage immédiat des différents échantillons pour l'estimation de la taille des différents fragments. Après imprégnation suffisante dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µl/ml), les fragments d'ADN sont visualisés à l'aide d'un dispositif approprié équipé d'un programme *Grab-It*.

Les fragments résultant de la digestion enzymatique sont analysés selon leur poids moléculaire exprimé en nombre de paires de bases d'ADN grâce au marqueur moléculaire 1 kb. Les différents génotypes du gène *msp2* de *P. falciparum* présents par échantillon individuel de sang sont ainsi déterminés puis rangés dans les deux grandes familles alléliques (FC27 et 3D7) selon la structure dimorphique des régions spécifiques et non répétitives. La multiplicité des infections est ensuite obtenue à partir du nombre de clones de parasites co-infectant le même individu hôte.

Analyse statistique

Toutes les données ont été saisies en double sur Excel®, version 7 par différents opérateurs de saisie puis validées avec le logiciel EpiInfo, version 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention ; Atlanta, Etats-Unis). Toutes les erreurs sont corrigées conformément aux données de base. Grâce à Stat Transfer, la base finale de données est convertie puis transférée au système SAS, version 8.2 (SAS Institute Inc. ; Cary, Etats-Unis) pour analyse. Le coefficient de corrélation de Spearman nous a permis d'étudier le lien existant entre la multiplicité détectée, les densités parasitaires et l'âge. Les distributions ont été analysées suivant la répartition de l'échantillon en 5 classes d'âges exprimées en années.

RÉSULTATS

Tableau I : Distribution des infections plasmodiales détectées.

Groupes d'âge (ans)	N (%)	Espèces plasmodiales détectées								
		<i>P. falciparum</i>			<i>P. malariae</i>			<i>P. ovale</i>		
		Nombre de positifs (%)	Parasitémie MGDP	IC à 95 %	Nombre de positifs (%)	Parasitémie MGDP	IC à 95 %	Nombre de positifs (%)	Parasitémie MGDP	IC à 95 %
5-6	74 (17,5)	39 (52,7)	507,3	(364,3-706,3)	12 (16,2)	363,2	(154,6-853,2)	2 (2,7)	657,3	-
7-8	123 (29,0)	61 (49,6)	715,9	(563,5-909,6)	10 (8,1)	749,8	(506,7-1109,5)	1 (0,8)	600,0	-
9-10	75 (17,7)	37 (49,3)	629,6	(438,2-904,7)	9 (12,0)	701,0	(175,0-2809,8)	-	-	-
11-12	93 (21,9)	37 (39,8)	423,5	(338,9-529,3)	5 (5,4)	377,0	(96,8-1473,2)	-	-	-
13-15	59 (13,9)	15 (25,4)	450,5	(276,6-734,1)	3 (5,1)	375,2	-	-	-	-
Echantillon total	424 (100)	189 (44,6)	565,9	(494,0-648,3)	39 (9,2)	512,3	(338,9-774,5)	3 (0,7)	637,6	(490,9-828,1)

N : Effectif d'élèves participants

MGDP : Moyenne géométrique des densités parasitaires par µl de sang

IC : Intervalle de confiance

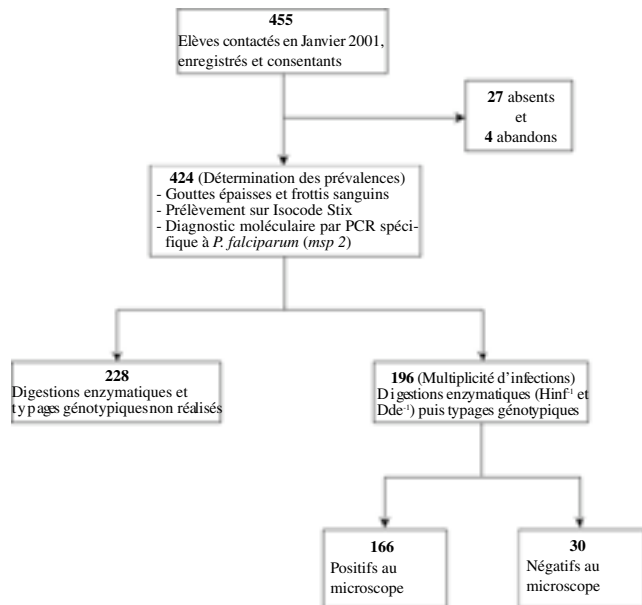


Figure 1 - Profil des manipulations microscopiques et moléculaires.

Résultats opérationnels et échantillons analysés

La figure 1 décrit le profil du mode opératoire suivant lequel nous avons procédé tout au long des activités sur le terrain et au laboratoire. La performance du microscope comparée à celle de la PCR (« gold standard ») d'un point de vue sensibilité et spécificité dans le diagnostic des infections de *P. falciparum*, a été déterminée sur les 424 écoliers participants. Les typages génotypiques se sont réalisés sur un effectif randomisé de 196 élèves soit une proportion de 46,2 %.

Performance du diagnostic au microscope et à la PCR

A l'issue des lectures microscopiques des gouttes épaisses et frottis sanguins, nous avons observé trois des quatre espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme humain suivant des proportions inégales (Tableau I). Pour l'ensemble des cas de positivité, *P. falciparum* est prédominante (81,8 %). Elle est suivie de *P. malariae* (16,9 %) puis de *P. ovale* (1,3 %).

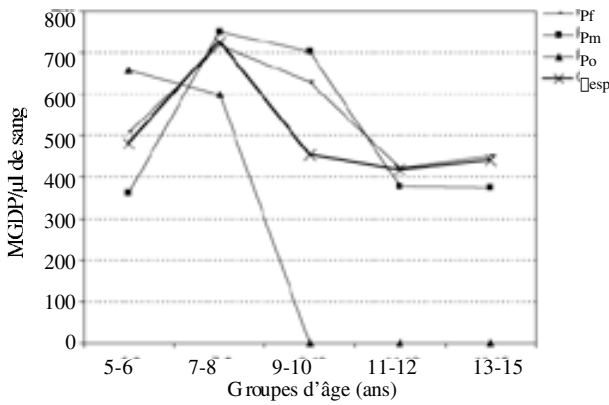


Figure 2 - Distribution spécifique des densités parasitaires.

Pf : *Plasmodium falciparum* Po : *Plasmodium ovale*
 Pm : *Plasmodium malariae* esp : Ensemble des espèces

Les infections de *P. ovale* n'ont été détectées que chez les jeunes enfants des groupes d'âge 5-6 et 7-8 ans. La distribution des densités parasitaires au sein des 5 classes d'âge, montre dans un premier temps une augmentation jusqu'aux valeurs élevées chez les enfants du groupe d'âge 7-8 ans. Ensuite, les valeurs de parasitémie diminuent avec l'âge et semblent se stabiliser chez les enfants des groupes 11-12 et 13-15 ans (Fig. 2). A partir des résultats de diagnostic obtenus pour l'échantillon total, l'indice plasmodique détecté au microscope est de 54,7 % et de 83,9 % à la PCR (Tableau II). En considérant l'ensemble des espèces plasmodiales, la parasitémie évolue comme précédemment décrit. Pour la performance dans le diagnostic des infections et considérant la PCR comme «gold standard», le microscope a montré une sensibilité de 81,3 % et une spécificité de 88,2 %.

Multiplicité d'infections de *P. falciparum*

Les études de multiplicité ont porté sur un effectif de 196 (46,2 %) élèves dont 166 (84,7 %) positifs et 30 (15,3 %) négatifs au microscope. Les deux cycles de PCR ont permis de détecter au total 178 (90,8 %) échantillons positifs. Ceux-ci ont ensuite été analysés pour le polymorphisme des lon-

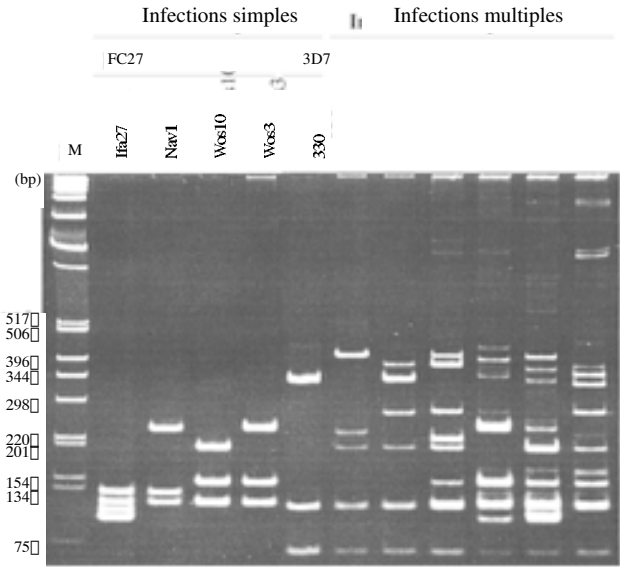


Figure 3 - Multiplicité d'infections de *P. falciparum*

M : marqueur de poids moléculaire ; bp : base pair (paire de base); Ifa27 (génotype observé à Ifakara en Tanzanie); Nav1 (génotypes observés à Navrongo au Ghana); Wos10 et Wos3 (génotypes observés à Wosem en Papouasie Nouvelle Guinée).

guez de fragments de restriction ou «restriction fragment length polymorphism» (RFLP) afin d'évaluer l'étendue de la diversité génétique du gène *msp2* du mérozoite (Fig. 3). Les types génétiques des souches parasitaires sont décodés selon le modèle d'études similaires, réalisées ailleurs (22-24). Les études de multiplicité du gène *msp2* ont montré un total de 50 génotypes observés sur un effectif cumulé de 664. Les génotypes obtenus ont été classés en deux grandes familles, l'une FC27 et l'autre 3D7 avec respectivement 26 (52 %) et 24 (48 %) génotypes (Tableau III). La famille FC27 est caractérisée par des répétitions de séquences d'ADN de 96 bp et des répétitions additionnelles de 36 bp et celle 3D7 est caractérisée par un nombre variable de séquences d'ADN répé-

Tableau II - Distribution de la positivité détectée au microscope et à la PCR.

Groupes d'âge (ans)	N (%)	Sexe F* effectif (%)	Parasitémie		PCR				Prévalences (%) relatives	
			MGDP	IC à 95 %	0		1		Microscope	PCR
5-6	74 (17,5)	36 (48,6)	481,6	(360,9-642,7)	4	2	15	53	74,3	91,9
7-8	123 (29,0)	61 (49,6)	723,8	(587,5-891,6)	11	7	39	66	54,5	85,4
9-10	75 (17,7)	32 (42,7)	640,77	(452,4-907,6)	7	7	23	38	60,0	81,3
11-12	93 (21,9)	30 (32,3)	417,8	(334,4-522,0)	16	0	36	41	44,1	82,8
13-15	59 (13,9)	23 (39,0)	441,0	(264,9-734,0)	11	3	30	15	30,5	76,3
Echantillon	424 (100)	182 (42,9)	561,0	(494,1-637,1)	49	19	143	213	54,7	83,9

* Sexe féminin (proportion par rapport au sexe masculin)

Microscope, PCR : Positivité détectée au microscope et positivité détectée par la réaction de polymérisation en chaîne

0 : Lame négative

1 : Lame positive

Tableau III - Fréquences alléliques du gène *msp2* de *P. falciparum*

Allèles	Familles alléliques		Allèles	3D7		
	FC27	Fréquences (%)		No.	Fréquences (%)	
Wos 3	88	13,3	3D7 (280)	1	0,15	
Wos 6	66	9,9	3D7 (290)	4	0,6	
Wos 12	63	9,5	3D7 (300)	2	0,3	
Wos 10	19	2,9	3D7 (310)	10	1,5	
D10	16	2,4	3D7 (320)	33	5,0	
K 1	11	1,7	3D7 (330)	35	5,3	
Ifa 46	8	1,2	3D7 (340)	47	7,1	
Nav 3	3	0,5	3D7 (344)	2	0,3	
Nav 2	3	0,5	3D7 (350)	12	1,8	
Nav 1	3	0,5	3D7 (360)	22	3,3	
Wos 7	3	0,5	3D7 (370)	44	6,6	
Ifa 27	3	0,5	3D7 (380)	19	2,9	
Cot 5*	2	0,3	3D7 (390)	20	3,0	
Ifa 13	1	0,15	3D7 (400)	12	1,8	
Ifa 34	1	0,15	3D7 (410)	10	1,5	
Ifa 36	1	0,15	3D7 (420)	24	3,6	
Nav 4	1	0,15	3D7 (430)	3	0,5	
Nav 5	1	0,15	3D7 (440)	6	0,9	
Nav 6	1	0,15	3D7 (450)	35	5,3	
Nav 10	1	0,15	3D7 (460)	4	0,6	
Nav 13	1	0,15	3D7 (470)	6	0,9	
Cot 1*	1	0,15	3D7 (480)	6	0,9	
Cot 2*	1	0,15	3D7 (490)	3	0,5	
Cot 3*	1	0,15	3D7 (500)	3	0,5	
Cot 4*	1	0,15	-	-	-	
Cot 6*	1	0,15	-	-	-	
Total	26	301	45,3	24	363	54,7

* Allèles observés pour la première fois / localité Taabo-village (Côte d'Ivoire)

tées de longueurs différentes (25, 26). Au niveau de la famille FC27, les génotypes Wos3 (13,3 %), Wos6 (9,9 %) et Wos12 (9,5 %) sont les plus fréquemment rencontrés. Quant à la famille 3D7, ce sont les génotypes 3D7(340) (7,1 %), 3D7(370) (6,6 %), 3D7(330) (5,3 %) 3D7(450) (5,3 %) et 3D7(320) (5,0 %). Les autres génotypes sont faiblement ou rarement rencontrés avec des fréquences allant de 0,15 à 2,9 %.

Tableau IV - Corrélation entre la multiplicité, la parasitémie et l'âge.

Groupes d'âge(ans)	Positifs/effectif total analysé (%)	Multiplicité moyenne	Ecart type	Parasitémie MGD	Ecart type	Coefficient de corrélation de Spearman (Probabilité «P»)
5-6	46 / 47 (97,9)	4,65	2,17	642,9	685,6	0,35 (0,01)**
7-8	59 / 65 (90,8)	4,00	2,00	724,4	785,8	0,14 (0,27)
9-10	24 / 29 (82,8)	3,62	1,97	1025,0	1685,0	0,008 (0,96)
11-12	32 / 34 (94,1)	2,93	1,83	401,4	494,1	0,03 (0,87)
13-15	17 / 21 (81,0)	3,47	2,20	554,3	735,1	0,08 (0,73)
Echantillon total	178 / 196 (90,8)	3,87	2,10	675,1	922,9	

** La valeur de la probabilité «P» est considéré significative au seuil de 5 %
MGDP : Moyenne géométrique des densités parasitaires par µl de sang

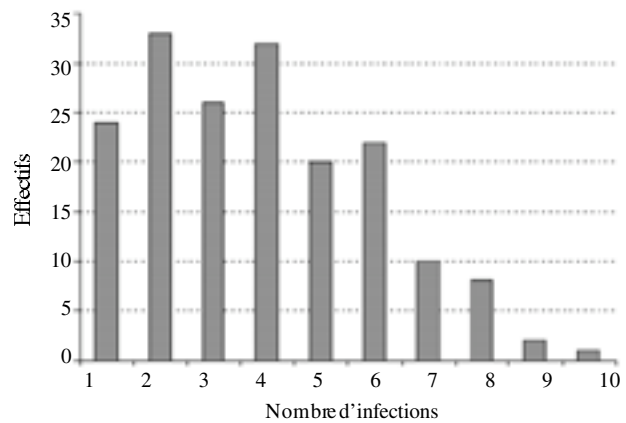


Figure 4 - Importance relative du nombre d'infections détectées par échantillon.

Parmi les 50 génotypes, 6 (12 %) ont été observés pour la première fois avec une fréquence très faible, de l'ordre de 0,15 %. Ils ont été nommés Cot1 (115, 200, 270), Cot2 (~ 100, 115, 198), Cot3 (115, 198, 227), Cot4 (115, 198, 209), Cot5 (96, 115, 137, 234), Cot6 (115, 162, ~ 260). Pour les 196 échantillons analysés par PCR, 16 (8,1 %) sont infectés uniquement par des génotypes de la famille FC27 et 21 (10,7 %) présentaient des infections uniquement de type 3D7. Les cas d'infections de génotypes mixtes (5'FC27/3D73' et 5'3D7/FC273') ont été observés dans 141 échantillons soit 71,9 %.

L'étude de la multiplicité a permis d'observer que le nombre de clones parasitaires varie de 1 à 10 par échantillon individuel positif à la PCR avec une complexité de 3,87 génotypes par échantillon (Fig. 4). La plupart des infections détectées sont multiples. Celles-ci représentent 86,5 % de l'ensemble des infections.

Corrélations entre la multiplicité, la densité de la parasitémie et l'âge

Pour l'échantillon ayant fait l'objet d'étude moléculaires, nous avons enregistré une moyenne géométrique de

parasitémie de 675 parasites par μl de sang (95 % intervalle de confiance : 570-827). La probabilité «p» montre au seuil de 5 %, une valeur significative de la corrélation entre la multiplicité et la densité parasitaire chez les enfants âgés de 5-6 ans de 0,35 ($p = 0,01$) (Tableau IV).

DISCUSSION

Diagnostic des infections palustres

Les examens microscopiques ont montré que *P. falciparum* est responsable de la plupart des cas d'infections détectées (81,8 %). Ces données confirment de récentes observations sur la prédominance de cette espèce au centre de la Côte d'Ivoire (8, 9). L'examen microscopique est relativement simple, de réalisation moins coûteuse. Il permet de déterminer l'espèce plasmodiale responsable de l'infection et également d'estimer la densité parasitaire qui est un élément important du pronostic et de la prise en charge des cas (27). Il est malheureusement moins précis lorsque les densités parasitaires sont faibles ou lorsqu'il s'agit d'interpréter les cas d'hétéroinfections.

Les résultats sur la positivité détectée par PCR et au microscope, révèlent des différences notables entre ces deux méthodes. De telles différences ont été relevées par Ekala et collaborateurs (1999) (28) au Gabon; Müller et collaborateurs (2001) (29) à Sao Tomé et par Owusu-Agyei et collaborateurs au Ghana (2001) (30). La méthode microscopique a montré une sensibilité de 81.3 % et une spécificité de 88.2 %. Elle est influencée par un certain nombre de facteurs dont la fréquence élevée des infections asymptomatiques, la non spécificité des manifestations cliniques, et surtout le savoir-faire du microscopiste et le temps passé à l'analyse du frottis (27). Nos résultats sont en conformité avec ceux des études antérieures qui ont montré que la performance du microscope dans le diagnostic des infections plasmodiales est inférieure à 100 %. La méthode microscopique peut être améliorée sur le terrain par l'apport de composantes additionnelles à travers l'emploi d'autres méthodes sensibles dans le diagnostic des infections à *P. falciparum*.

La PCR a l'avantage de permettre la détection de faibles parasitémies, difficilement décelables au microscope surtout quand il s'agit d'infections asymptomatiques à un ou deux parasites. Au cours d'une étude similaire conduite au Gabon, l'ADN a été extrait à partir de gouttes épaisses, et 23 % des cas déclarés négatifs au microscope furent positifs à la PCR lors de l'analyse du gène *msp2* (28). Dans notre cas, la PCR a permis de détecter jusqu'à 29 % des cas initialement déclarés négatifs au microscope. Bien que sensible et précise, la PCR reste difficilement applicable car sa mise en œuvre exige une logistique que la plupart des pays en voie de développement n'ont pas. C'est au vu de ces problèmes liés à l'applicabilité de la méthode moléculaire que de nombreuses études épidémiologiques du paludisme continuent d'utiliser les observations microscopiques sur le terrain.

Lors des études moléculaires, 19 (4,5 %) échantillons positifs au microscope ont été observés négatifs par PCR. En

fait, les amorces utilisées pour amplifier le gène *msp2* sont spécifiques à *P. falciparum*. L'on n'obtient dans ce cas, aucun produit de PCR en présence d'une autre espèce de *Plasmodium* (25). En plus du fait qu'il s'agissait d'échantillons essentiellement négatifs après relecture 5 présentaient une infection à *P. malariae*. Un échantillon présentait une infection à *P. ovale*. Cette observation confirme la spécificité des amorces utilisées pour l'amplification du gène *msp2* de *P. falciparum*.

Etendue de la diversité antigénique du gène *msp2*

La PCR constitue un important outil de recherche, de plus en plus pris en compte dans la plupart des études épidémiologiques portant sur les populations, et prenant en compte des aspects comme la diversité antigénique et la multiplicité d'infections à *P. falciparum* au sein d'une population pour un gène donné (11). Ces études permettent de caractériser les souches parasitaires, de comprendre leur dynamique au sein des individus et ainsi de savoir s'il s'agit de la même ou d'une autre infection (11, 27), d'apprécier le degré d'infection (26). Le gène *msp2* est très polymorphe dans les infections naturelles et plus de 150 allèles ont déjà été dénombrés. Quatre études épidémiologiques basées sur ce gène, conduites en Tanzanie, ont permis de découvrir 82 allèles distincts dont 41 allèles FC27 et 41 allèles 3D7 (22). En Papouasie Nouvelle Guinée, 38 allèles différents ont été identifiés, soit 8 allèles FC27 et 30 allèles 3D7 (31). 43 allèles du même gène ont été identifiés à Sao Tomé soit 12 allèles FC27 et 31 allèles 3D7 (29). Au cours de notre étude, nous avons pu apprécier l'étendue de la diversité antigénique du gène *msp2*, par l'identification de 50 génotypes différents dont 26 de la famille FC27 et 24 de la famille 3D7. Les génotypes les plus rencontrés sont Wos 3, Wos 6 et Wos 12 de la famille FC27. Ceux-ci ont été observés surtout en Papouasie Nouvelle Guinée où 27 génotypes issus de la région de Wosera ont été déterminés (32). Les infections causées par *P. falciparum* sont génétiquement très diverses à l'exception de situations particulières comme les épidémies sur les îles et les populations isolées (14).

Les duplications et les délétions de segments répétés d'acides aminés de la région centrale variable du gène *msp2* sont des causes d'émergence de formes nouvelles du parasite (26, 33). L'on peut ainsi observer des variations géographiques d'une région à une autre. Sur les 50 génotypes de notre étude, 44 soit 88 %, ont déjà été observés au Ghana (24), au Nigeria (23) et en Tanzanie (22). Par contre, 6 génotypes soit 12 % ne sont pour l'instant observés qu'en Côte d'Ivoire, avec une fréquence très faible de l'ordre de 0,15 %.

La PCR a certes une haute spécificité pour la détection du nombre d'allèles, mais la sensibilité reste variable, particulièrement dans la détection de clones pour les cas de faibles parasitémie. Des laboratoires ayant analysé les mêmes échantillons ont obtenus des résultats différents du fait des procédures de manipulation (34).

Lien entre la multiplicité d'infection, la parasitémie et l'âge

La multiplicité informe sur le niveau de transmission du paludisme dans une région à un moment donné. Elle donne des indications sur le statut immunitaire de l'hôte (35, 36). Elle varie également avec l'âge (37). Le nourrisson (âge inférieur à 6 mois) perd progressivement l'immunité maternelle contre les infections parasitaires (38) et développe ses propres défenses avec l'âge (39, 40). L'augmentation du niveau de transmission est généralement associée à une augmentation du nombre moyen de clones de parasite par individu hôte (14). Des études conduites en Tanzanie ont montré que les enfants peuvent être infectés par 9 différents clones de parasite (31, 36). Au cours de notre étude, nous avons observé jusqu'à 10 clones infectant le même individu hôte. Aux valeurs élevées, elle induit une protection croisée contre de nouvelles infections parasitaires (37). La protection induite par la multiplicité contre les épisodes cliniques de paludisme varie suivant le niveau d'endémicité palustre. Ainsi, dans les zones de forte endémicité palustre, la multiplicité des infections varie avec l'âge des individus hôtes (41, 42) et l'intensité de la transmission (14). D'autres études épidémiologiques ont montré que dans les zones de faible endémicité comme en Gambie (43), au Soudan (44), dans les localités de Ndiop au Sénégal (40) et Riboque à Sao Tomé (29), le paludisme sévit à l'état mésoendémique à caractère saisonnier et il n'existe presque pas de relation entre l'âge des individus hôtes, la multiplicité et la distribution des infections de *P. falciparum*. Ces mêmes observations ont été faites en milieu urbain à Cotonou au Bénin (45). Au cours de notre étude, nous avons noté que l'âge exerce une influence sur la multiplicité et les densités parasitaires. Le coefficient de corrélation de Spearman a montré une valeur significative ($P = 0,01$) chez les enfants de la tranche d'âge 5-6 ans. Pour les autres tranches d'âge, l'on observe que ce coefficient a tendance à baisser avec l'âge. Cette perte graduelle de la corrélation entre la multiplicité et les densités parasitaires est associée à une acquisition de l'immunité (36).

Nos résultats confirment qu'au centre de la Côte d'Ivoire, *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale prédominante (8, 9). A l'instar de la plupart des localités d'Afrique sub-saharienne, le paludisme à Taabo-village est essentiellement celui à *P. falciparum*. Notre étude est la première à rapporter une analyse moléculaire des souches de *P. falciparum* dans la localité. Elle a également confirmé que la PCR-RFLP est un important outil pour les études de diversité antigénique et de la multiplicité d'infections, et que le gène *m*sp2 est extrêmement polymorphe. Les individus peuvent héberger jusqu'à 10 génotypes différents. Bien que sensible, rapide et d'une importance capitale dans les contextes épidémiques (46), la PCR ne saurait se substituer à la méthode microscopique. Cette dernière méthode présente un avantage logistique car un équipement minimal est requis. Elle reste également indispensable pour la détermination de l'agent pathogène en cause ainsi que l'évaluation de la parasitémie. Les résultats obtenus au cours de notre étude serviront de base de données pour la surveillance et l'évaluation d'impact des grands aménagements d'eau sur la prévalence, la diversité antigénique, la multiplicité d'infections de *P. falciparum*

et les futures études moléculaires sur les populations parasitaires en Côte d'Ivoire, notamment en ce qui concerne la relation avec les problèmes de résistance aux antipaludiques.

Remerciements • Nous remercions la population de Taabo-village, les élèves et les directions respectives des deux écoles Taabo 1 et Taabo 2 dont la coopération a permis le bon déroulement de la présente étude. La recherche s'est déroulée dans le cadre d'un partenariat scientifique entre l'Université d'Abidjan-Cocody, le Centre Suisse de Recherches Scientifiques et l'Institut Tropical Suisse. Nous remercions le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique et la Direction Suisse pour le Développement et la Coopération qui ont partiellement appuyé le présent travail à travers le Pôle de Recherche National « North-South - Mitigating syndromes of global change ». K.D. Silué a obtenu un financement de la Commission Fédérale des Bourses pour Etudiants Etrangers (CFBEE) et adresse sa gratitude au Prof. B. Schmid, M^{ad}. A. Delpho et Mr. G. Zimmernann, les délégué(s) et représentant(s) de la CFBEE à l'Université de Bâle. J. Utzinger remercie le Fonds National Suisse pour un financement facilité par le projet no. PPOOB-102883.

RÉFÉRENCES

- 1 - SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM *et Coll* - The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005 ; **434** : 214-7.
- 2 - BREMAN JG, ALILIO MS, MILLS A - Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg* 2004 ; **71 Suppl 2** : 1-15.
- 3 - GREENWOOD B, MUTABINGWA T - Malaria in 2002. *Nature* 2002 ; **415** : 670-2.
- 4 - KEISER J, UTZINGER J, CALDAS DE CASTRO M *et Coll* - Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. *Am J Trop Med Hyg* 2004 ; **71 Suppl 2** : 118-27.
- 5 - HAY SI, GUERRA CA, TATEM AJ *et Coll* - Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol* 2005 ; **3** : 81-90.
- 6 - HENRY M-C, ROGIER C, NZEYIMANA I *et Coll* - Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the savannah of Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 2003 ; **8** : 449-58.
- 7 - KEISER J, DE CASTRO MC, MALTESE MF *et Coll* - Effect of irrigation and large dams on the burden of malaria on a global and regional scale. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; **72** : 392-406.
- 8 - DOSSOU-YOVO J, OUATTARA A, DOANNIO JMC *et Coll* - Enquêtes paludométriques en zone de savane humide de Côte d'Ivoire. *Med Trop* 1998 ; **58** : 51-6.
- 9 - GIRARDIN O, DAO D, KOUDOU BG *et Coll* - Opportunities and limiting factors of intensive vegetable farming in malaria endemic Côte d'Ivoire. *Acta Trop* 2004 ; **89** : 109-23.
- 10 - IQBAL J, MUNEER A, KHALID N, AHMED MA - Performance of OptiMal test for malaria diagnosis among suspected malaria patients at the rural health centers. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; **68** : 624-8.
- 11 - FELGER I, GENTON B, SMITH T *et Coll* - Molecular monitoring in malaria vaccine trials. *Trends Parasitol* 2003 ; **19** : 60-3.
- 12 - NTOUMI F, NGOUNDOU-LANDJI J, LUTY AJF *et Coll* - Polymorphisme allélique du gène *m*sp-2 de *Plasmodium falciparum* analysé à partir d'échantillons sanguins d'enfants Gabonais. *Parasitologie* 2000 ; **94** : 183-7.
- 13 - BASCO LK, TAHAR R, ESCALANTE A - Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVIII. Polymorphisms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 gene in isolates from symptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg* 2004 ; **70** : 238-44.
- 14 - ARNOT D - Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998 ; **92** : 580-5.

- 15 - N'GORAN EK, UTZINGER J, N'GUESSAN AN *et Coll* - Reinfection with *Schistosoma haematobium* following school-based chemotherapy with praziquantel in four highly endemic villages in Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 2001 ; **6** : 817-25.
- 16 - N'GORAN EK, UTZINGER J, GNAKA HN *et Coll* - Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral artemether for the prevention of patent *Schistosoma haematobium* infections. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; **68** : 24-32.
- 17 - SELLIN B, SIMONKOVICH E - Schistosomiasis et barrages en Côte d'Ivoire. In: De l'épidémiologie à la géographie humaine. Table ronde « tropiques et santé ». *Travaux et Documents de Géographie Tropicale* 1983 ; **48** : 209-14.
- 18 - N'GORAN EK, DIABATE S, UTZINGER J, SELLIN B - Changes in human schistosomiasis levels after the construction of two large hydroelectric dams in central Côte d'Ivoire. *Bull World Health Organ* 1997 ; **75** : 541-5.
- 19 - MOODY A - Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002 ; **15** : 66-78.
- 20 - FOLEY M, RANFORD-CARTWRIGHT L.C, BABIKER H.A - Rapid and simple method for isolating malaria DNA from fingerprick samples of blood. *Mol Biochem Parasitol* 1992 ; **53** : 241-4.
- 21 - FELGER I, SMITH T, EDOH D *et Coll* - Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzania infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999a ; **93 Suppl 1** : 29-34.
- 22 - FELGER I, IRON A, STEIGER S, BECK HP - Epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 2. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999b ; **93 Suppl 1** : 3-9.
- 23 - ENGELBRECHT F, TÖGEL E, BECK HP *et Coll* - Analysis of *Plasmodium falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of *msp2* genotypes and parasite-specific IgG responses. *Acta Trop* 2000 ; **74** : 63-71.
- 24 - OWUSU-AGYEI S, SMITH T, BECK HP *et Coll* - Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic inhabitants of a holoendemic malarious area in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 2002 ; **7** : 421-8.
- 25 - FELGER I, TAVUL L, BECK HP - *Plasmodium falciparum*: a rapid technique for genotyping the merozoite surface protein 2. *Exp Parasitol* 1993 ; **77** : 372-5.
- 26 - MEYER CG, MAY J, AREZ AP *et Coll* - Genetic diversity of *Plasmodium falciparum*: asexual stages. *Trop Med Int Health* 2002 ; **7** : 395-408.
- 27 - GENTON B, FELGER I, BECK HP - La biologie moléculaire au service de la santé publique : des systèmes à haute résolution (chip technology) pour lutter contre la malaria. *Schweiz Med Forum* 2004 ; **4** : 115-9.
- 28 - EKALA MT, LEKOULOU F, DJIKOU S *et Coll* - Evaluation d'une méthode simple et rapide d'extraction de l'ADN de *Plasmodium falciparum* à partir de gouttes épaisses de patients gabonais. *Parasitologie* 1999 ; **93** : 8-11.
- 29 - MÜLLER DA, CHARLWOOD JD, FELGER I *et Coll* - Prospective risk of morbidity in relation to multiplicity of infection with *Plasmodium falciparum* in Sao Tomé. *Acta Trop* 2001 ; **78** : 155-62.
- 30 - OWUSU-AGYEI S, KORAM KA, BAIRD JK *et Coll* - Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; **65** : 197-203.
- 31 - FELGER I, TAVUL L, KABINTIK S *et Coll* - *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp Parasitol* 1994 ; **79** : 106-16.
- 32 - CORTES A, MELLOMBO M, MUELLER I *et Coll* - Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA 1. *Infect Immun* 2003 ; **71** : 1416-26.
- 33 - RICH SM, FERREIRA MU, AYALA FJ - The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 2000 ; **16** : 390-6.
- 34 - FARNERT A, AREZ AP, BABIKER HA *et Coll* - Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 ; **95** : 225-32.
- 35 - ZWETYENGA J, ROGIER C, TALL A *et Coll* - No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998 ; **59** : 726-35.
- 36 - SMITH T, FELGER I, TANNER M, BECK HP - Pre-munition in *Plasmodium falciparum*: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; **93 Suppl 1** : 59-64.
- 37 - TANNER M, BECK HP, FELGER I, SMITH T - The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 1. General introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; **93 Suppl 1** : 1-2.
- 38 - RASHEED FN, BULMER JN, DE FRANCISCO A *et Coll* - Relationships between maternal malaria and malarial immune responses in mothers and neonates. *Parasite Immunol* 1995 ; **17** : 1-10.
- 39 - AL-YAMAN F, GENTON B, REEDER JC *et Coll* - Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997 ; **91** : 602-5.
- 40 - ZWETYENGA J, ROGIER C, SPIEGEL A *et Coll* - A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; **93** : 375-80.
- 41 - NTOUMI F, CONTAMIN H, ROGIER C *et Coll* - Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; **52** : 81-8.
- 42 - SMITH T, BECK HP, KITUA A *et Coll* - Epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 4. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; **93 Suppl 1** : 15-20.
- 43 - CONWAY D.J, GREENWOOD BM, McBRIDE JS - The epidemiology of multiple-clone *Plasmodium falciparum* infections in Gambian patients. *Parasitology* 1991 ; **103** : 1-6.
- 44 - BABIKER HA - Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. *Plasmodium falciparum* population in the unstable malaria area of eastern Sudan is stable and genetically complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998 ; **92** : 585-9.
- 45 - ISSIFOU S, DJIKOU S, SANNI A, LEKOULOU F, NTOUMI F - Pas d'influence de la saison de transmission, ni de l'âge des patients sur la complexité et la diversité génétique des infections dues à *Plasmodium falciparum* à Cotonou (Bénin). *Afr J Med Sci* 2001 ; **30 Suppl** : 17-20.
- 46 - CHAKOUR M, KOECK JL, MASLIN J *et Coll* - Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique : état des lieux, perspectives. *Med Mal Infect* 2003 ; **33** : 396-412.