

Réponse humorale anti-*Plasmodium falciparum* AMA1 et MSP1 dans deux groupes ethniques vivant en sympatrie au Mali

Humoral immune anti-*Plasmodium falciparum* AMA1 and MSP1 response in two ethnic groups living in sympatry in Mali

A. Dolo · M. Coulibaly · B. Maïga · M. Daou · C. Arama · M. Troye-Blomberg · O. Doumbo

Reçu le 21 février 2012 ; accepté le 24 juillet 2012
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2012

Résumé Les Peulhs du cercle de Koro au Mali présentent une susceptibilité réduite au paludisme, comparés à leurs voisins, les Dogons, en dépit des conditions socioculturelles et de niveaux de transmission du paludisme similaires. Cependant, les mécanismes responsables de cette hétérogénéité de la réponse humaine face à l'agression plasmodiale ne sont pas clairement élucidés, particulièrement en ce qui concerne la réponse humorale spécifique d'antigènes au sein des groupes ethniques. Les antigènes *apical membran antigen 1* (AMA1) et *merozoite surface protein 1* (MSP1) sont deux candidats vaccin qui jouent un rôle central dans l'invasion des érythrocytes et, dans le cas de AMA1, des hépatocytes par le *Plasmodium falciparum*. Nous avons déterminé par la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) les taux d'anticorps anti-*P. falciparum* AMA1 et MSP1 (allèle 3D7 et FVO) pour rechercher d'éventuelles différences entre les deux groupes ethniques. Les résultats de l'étude ont montré que l'indice splénique, la moyenne géométrique des anticorps anti-AMA1 et des anti-MSP1 étaient significativement plus élevés chez les Peulhs comparés aux Dogons. En revanche, l'indice plasmodique était plus faible chez les Peulhs que chez les Dogons. Nos résultats suggèrent que la susceptibilité réduite des Peulhs au paludisme pourrait être liée à une réponse humorale spécifique anti-AMA1 et anti-MSP1 plus élevée que celle des Dogons.

Mots clés Paludisme · MSP1 · AMA1 · Peulh · Dogon · Mantéourou · Naye · Binédama · Anakédié · Cercle de Koro · Mali · Afrique intertropicale

Abstract Fulani of Mali are known for their lower susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria than their neighbours, the Dogon, despite similar transmission conditions. However, the mechanisms underlying these differences are poorly understood, particularly those concerning antigen-specific immune responses. The Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and the Merozoite Surface Antigen 1 (MSP1) are two malaria vaccine candidates, which play a pivotal role during the invasion of parasites into erythrocytes, and in the case of AMA1, of hepatocytes. Therefore, we analyzed the level of anti-AMA1 and anti-MSP1 antibodies (FVO and 3D7 alleles), by using ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) to investigate whether there are differences between the two ethnic groups. Our results show that the splenic rate, the level of anti-AMA1 and anti-MSP1 were significantly higher in Fulani compared to Dogon; while the parasite rate was lower in Fulani group compared to Dogon. Our results suggest that the lower susceptibility of Fulani to malaria could be due to the higher specific humoral responses against AMA1 and MSP 1 in Fulani's ethnic group compared to Dogon.

Keywords Malaria · MSP1 · AMA1 · Fulani · Dogon · Mantéourou · Naye · Binédama · Anakédié · Koro Cercle · Mali · Sub-saharan Africa

A. Dolo (✉) · M. Coulibaly · B. Maïga · M. Daou · C. Arama · O. Doumbo

Malaria Research and Training Center/département d'épidémiologie des affections parasitaires, faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie (FMPOS), BP 1805 Bamako, Mali
e-mail : adolo@icermali.org

M. Troye-Blomberg
Department of Immunology,
University of Stockholm, Sweden

Introduction

L'hétérogénéité de la réponse humaine au paludisme a été illustrée par des différences interethniques observées au Burkina Faso et au Mali entre les Peulhs et leurs voisins Mossis/Rimaibés au Burkina Faso ou Dogons au Mali [5,13]. Ces

études ont montré que les Peulhs avaient une réponse immunitaire humorale plus élevée que celle des Dogons en ce qui concerne les antigènes totaux de *Plasmodium falciparum* [5]. Cependant, il existe peu de données concernant la différence de susceptibilité interethnique vis-à-vis des antigènes spécifiques. L'antigène AMA1 (*apical membrane antigen 1*) et l'antigène majeur de la surface du mérozoïte 1 (*merozoïte surface protein 1*, MSP1) sont deux antigènes qui jouent un rôle très important dans l'invasion des érythrocytes par *P. falciparum* [18]. AMA1 est une protéine membranaire de 83 kDa comprenant une région intracytoplasmique de 55 acides aminés et une région extracellulaire de 550 acides aminés. Cette dernière peut être divisée en trois domaines. La protéine AMA1 de *P. falciparum* est très polymorphe [6] ; ce polymorphisme est d'une importance capitale, car il conditionne la réponse protectrice [8]. Les anticorps anti-AMA1 sont capables de bloquer *in vitro* l'invasion des érythrocytes par les parasites [4]. Il a été montré que certains anticorps monoclonaux anti-MSP1 sont des anticorps inhibiteurs de l'invasion des érythrocytes, alors que d'autres sont des anticorps bloquants et/ou des anticorps neutralisant les premiers [3]. Les anticorps pourraient agir soit directement, en bloquant ou en empêchant l'invasion des érythrocytes sains par les mérozoïtes, soit indirectement par activation des monocytes effecteurs : cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC) [9].

Dans cette présente étude, nous avons évalué la réponse humorale de l'hôte contre les antigènes AMA1 et MSP1 en utilisant la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Les moyennes géométriques des anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 ont été mesurées dans les sérums des Peulhs et Dogons afin de rechercher une éventuelle différence entre ces deux groupes ethniques vivant en sympatrie au Mali.

Matériel et méthodes

Lieu d'étude

L'étude a été réalisée dans quatre villages (Mantéourou, Naye, Binédama, et Anakédié) du cercle de Koro au Mali [5]. Les coordonnées géographiques de ces villages sont 14°3 latitude nord et 3°3 longitude ouest. Ces villages sont distants les uns des autres tout au plus de 7 km et leur population est principalement constituée de Dogons et de Peulhs vivant en sympatrie. Dans cette zone, la transmission du paludisme est mésoendémique. *P. falciparum* est la principale espèce parasitaire retrouvée et *Anopheles gambiae sl* est le principal vecteur. La saison sèche dans cette zone s'étend du mois d'octobre au mois de mai, tandis que la saison pluvieuse va du mois de juillet à octobre [5]. Il existe une mare temporaire à mi-distance entre Naye Dogon et Naye Peulh,

la distance entre Naye Dogon et Naye Peulh étant d'environ 500 m. Il existe également une mare temporaire entre les villages de Anakédié (Dogon) et de Binédama (Peulh) distante d'environ 1,5 km ; cette mare est plus proche de Binédama. Il n'existe pas de mares aux environs de Mantéourou Dogon et Peulh distants de 700 m. La principale activité des Dogons est l'agriculture et celle des Peulhs est l'élevage.

Recrutement de la population d'étude

La population d'étude était constituée par des volontaires âgés de 2 à 60 ans, provenant des quatre villages cités, enrôlés à la fin de la saison de transmission en novembre 1999. Les gouttes épaisses ont été réalisées par un prélèvement au niveau du bout des doigts. Les prélèvements du sang total (4 ml) ont été effectués au niveau du pli du coude dans des tubes secs. Le sérum a été obtenu après centrifugation à 1 500 tours par minute pendant cinq minutes. Ce sérum a été fractionné en parties aliquotes dans des tubes Eppendorf congelés à -80 °C en attendant l'étude sérologique. Nous avons effectué un appariement randomisé entre les groupes ethniques en fonction de leur âge. Au total, 164 participants ont été appariés au hasard pour l'étude sérologique. Tous les donneurs étaient apparemment asymptomatiques au moment de la collecte des échantillons.

Méthodes de laboratoire

Les gouttes épaisses ont été colorées par le Giemsa et lues au microscope à l'objectif à immersion par rapport à 300 leucocytes et l'estimation de la densité parasitaire effectuée sur la base de 7 500 leucocytes par millimètre cube de sang.

Les antigènes recombinants AMA1 FVO et AMA1 3D7 ont été exprimés dans *Pichia pastoris* préalablement décrits par Kennedy et al., 2002 [10] ; et les antigènes recombinants MSP1 FVO et 3D7 ont été exprimés dans *Escherichia coli* préalablement décrits par Stowers et al., 2002 [16].

La mesure par ELISA des anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 a été effectuée par une méthode standardisée décrite préalablement par Malkin et al. [11]. Les plaques ELISA ont été sensibilisées avec 100 ng de AMA1 (FVO), AMA1 (3D7) par puits et incubées à 4 °C pour toute la nuit. Les sites de fixation d'antigène ont ensuite été saturés en ajoutant une solution de lait écrémé (Difco, Inc., Detroit, MI) à 5 % dans du PBS (*phosphate-buffered saline*, pH : 7,4). Les sérums après dilution au 1/1 000 dans cette même solution ont été ajoutés dans les puits sensibilisés et ensuite incubés pendant deux heures à la température du laboratoire. Après un lavage extensif au laveur, les plaques ont été incubées avec des anticorps de chèvre anti-IgG humain conjugués à la phosphatase alcaline (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD), dilués dans du solvant de saturation (5 % de lait écrémé dans du PBS) pendant deux heures à la

température du laboratoire. Les anticorps fixés ont été révélés en ajoutant du p-nitrophényl phosphate Sigma 104 substrate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Les absorbances ont été lues à la longueur d'onde de 450 nm en utilisant le spectrophotomètre VERSAmax™ 340PC (microplate reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA). Nous avons incorporé en double dans chaque plaque la dilution en série d'un pool de sérums standard pour la détermination de la courbe d'étalonnage. Cette courbe d'étalonnage a ensuite été utilisée pour convertir les absorbances des liaisons antigène-anticorps en unités d'anticorps en utilisant le logiciel (SOFTmax® PRO ver. 3, Molecular Devices Co.). Le standard du sérum humain anti-AMA1 a été préparé en collectant du sérum chez dix individus résidant au Mali.

Gestion des données et méthodes statistiques

Les données ont été saisies et analysées sur SPSS (version 18). Les concentrations des anticorps ont été comparées entre les différents groupes ethniques par le test de Mann-Whitney en utilisant le logiciel SPSS. 18 (Statistical Package for Social Science CHICAGO, IL, États-Unis). La valeur de p inférieur à 0,05 a été considérée comme étant statistiquement significative.

Aspect éthique

Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique de la faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie du Mali. Tous les patients inclus dans l'étude ont signé un consentement éclairé ou ont fait l'objet d'un

assentiment éclairé signé par un parent lorsqu'il s'agissait de mineurs. Toutes les dispositions étaient prises pour éviter une contamination accidentelle de la population d'étude et du personnel d'enquête (port de gants, utilisation de matériel à usage unique). Tous les cas de paludisme ou d'autres affections courantes de la population ont été pris en charge par le protocole.

Résultats

Caractéristiques sociodémographiques et parasitocliniques de la population d'étude

L'étude a porté sur 84 Dogons et 81 Peulhs. La moyenne d'âge entre les deux groupes ethniques était comparable : $11,2 \pm 6,7$ ans (Dogons) et $11,3 \pm 6,6$ ans (Peulhs). Le Tableau 1 montre qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes ethniques en termes d'indice splénique ; en revanche, l'indice plasmodique était significativement plus élevé chez les Dogons que chez les Peulhs ($p = 0,02$).

Moyennes géométriques des anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 en fonction des groupes ethniques

Les Peulhs avaient des taux d'anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 statistiquement plus élevés ($p < 10^{-3}$) que les Dogons, et cela était valable pour les deux allèles FVO et 3D7 (Tableau 2).

Tableau 1 Caractéristique parasitoclinique de la population d'étude / *Clinical and parasitological characteristics of the study population*

Ethnies	Splénomégalie			Portage de <i>Plasmodium falciparum</i>		
	<i>n</i>	Présence de Splénomégalie	%	<i>n</i>	Présence de parasite	%
Dogon	67	32	47,8	82	24	29,3
Peulh	40	17	42,5	72	8	11,1
<i>p</i>	0,7			0,02		

Tableau 2 Moyennes géométriques des anticorps anti-AMA1 (FVO et 3D7) et anti-MSP1 (FVO et 3D7) en fonction des groupes ethniques / *Geometric means of anti-AMA (FVO and 3D7) and anti-MSP1 (FVO and 3D7) antibodies according to ethnic groups*

Ethnies	Moyennes géométriques des taux d'anticorps			
	Anti-AMA1 FVO	Anti-AMA1 3D7	Anti-MSP1 FVO	Anti-MSP1 3D7
Dogon (<i>n</i> = 83)	6,4	6,5	3,5	4,7
Peulh (<i>n</i> = 81)	7,8	7,7	6,7	6,8
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

La Figure 1 montre que le taux d'anticorps anti-AMA1 allèle FVO est significativement plus élevé chez les Peulhs que chez les Dogons dans les tranches d'âge de six-neuf ans et supérieures à 15 ans ; dans la même figure, pour l'allèle 3D7, nous avons noté la même tendance dans le groupe d'âge compris entre six-neuf ans ($p = 0,002$). Nous avons enregistré un taux d'anticorps anti-MSP1 pour les deux allèles (FVO et 3D7) et pour toutes les classes d'âge statistiquement plus élevé ($p < 0,05$) chez les Peulhs que chez les Dogons (Fig. 2).

Moyenne géométrique des anticorps et portage de *P. falciparum*

Le Tableau 3 indique que les taux d'anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 étaient significativement plus élevés chez les

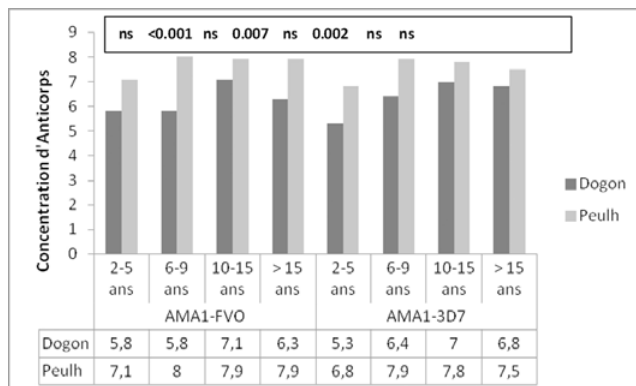


Fig. 1 Distribution de la moyenne géométrique des anticorps anti-AMA1 (FVO et 3D7) selon les groupes d'âge et les ethnies / *Distribution of geometric means of anti-AMA1 (FVO and 3D7) antibodies according to age groups and ethnicity*

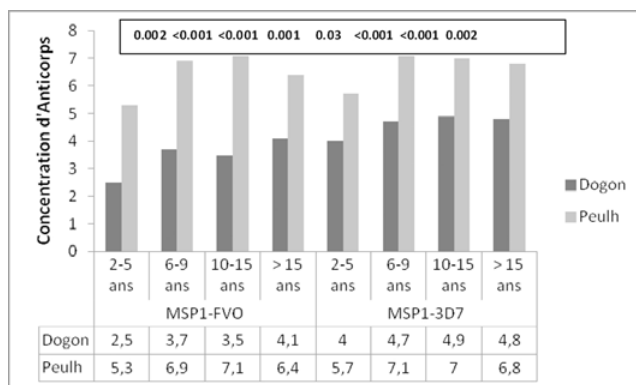


Fig. 2 Distribution de la moyenne géométrique des anticorps anti-MSP1 (FVO et 3D7) selon les groupes d'âge et les ethnies / *Distribution of geometric means of anti-MSP1 (FVO and 3D7) antibodies according to age groups and ethnicity*

Peulhs que chez les Dogons pour les deux allèles FVO et 3D7, aussi bien chez les porteurs du *P. falciparum* que chez les non-porteurs ($p < 0,05$).

Discussion

La relative protection des Peulhs par rapport aux autres groupes ethniques contre le paludisme a été étudiée par Modiano et al. [13] au Burkina Faso. Dans la présente étude, nous avons exploré par la technique ELISA, l'immunité humorale spécifique anti-*P. falciparum* au sein des groupes ethniques vivant en sympatrie dans une zone d'endémie palustre. Au cours d'une étude précédente, nous avons comparé les indicateurs paludométriques parmi les groupes ethniques sympatriques pour étudier l'hétérogénéité dans la réponse à l'infection à *P. falciparum* [5]. Malgré les facteurs socioculturels et les taux d'inoculation entomologique comparables entre les deux groupes ethniques, les Peulhs avaient un indice splénique élevé, un indice plasmodique faible et étaient moins affectés par la maladie [5].

D'autres études ont démontré que les anticorps IgM et IgG antiantigènes totaux de *P. falciparum* sont significativement plus élevés chez les Peulhs comparés à leurs voisins dogons et mossis [2,5,7]. Cependant, il existe peu de données concernant la réponse humorale contre des antigènes spécifiques de *P. falciparum* au Mali ; ainsi l'évaluation de la réponse immunitaire humorale contre les antigènes malariques spécifiques candidats vaccins (AMA1 et MSP1) nous permettra de déterminer la distribution naturelle de ces antigènes dans les zones d'endémies où sont testés les vaccins à base de ces antigènes. Les résultats de la présente étude montrent que tous les sujets, tous âges confondus, produisent des anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 avant l'administration de vaccins.

Nous avons trouvé que les taux d'anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 étaient significativement plus élevés chez les Peulhs que chez les Dogons et pour les deux allèles FVO et 3D7. Cela est en accord avec l'hypothèse que l'indice plasmodique bas observé chez les Peulhs et la faible incidence du paludisme au sein de ce groupe ethnique seraient dus aux taux élevés en anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 chez les Peulhs. Ces anticorps pourraient agir soit par blocage, inhibition, neutralisation et par un phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps et médiée par les phagocytes mononuclés [9] et accélérer ainsi la clairance parasitaire. Nous n'avons pas trouvé d'association entre les taux d'anticorps anti-AMA1 et le portage de *P. falciparum*. En revanche, les taux d'anticorps anti-MSP1 étaient négativement associés au portage de *P. falciparum* (anti-MSP1 FVO et anti-MSP1 3D7).

La comparaison des taux d'anticorps dans les deux groupes ethniques en fonction des groupes d'âge a aussi montré

Tableau 3 Moyenne géométrique des anticorps anti-AMA1 et anti-MSP1 en fonction du portage de *Plasmodium falciparum* / *Geometric means of anti-AMA (FVO and 3D7) and anti-MSP1 (FVO and 3D7) antibodies according to Plasmodium falciparum carriage*

Portage de <i>P. falciparum</i>	Ethnie	Anti-AMA1 FVO		Anti-AMA1 3D7		Anti-MSP1 FVO		Anti-MSP1 3D7	
		MG	<i>p</i>	MG	<i>p</i>	MG	<i>p</i>	MG	<i>p</i>
<i>P. falciparum</i> –	Dogon	6,6	< 0,001	6,6	0,002	3,8	< 0,001	5,2	< 0,001
	Peulh	7,7		7,5		6,7		6,8	
<i>P. falciparum</i> +	Dogon	5,9	0,01	6,1	0,008	2,8	< 0,001	3,8	< 0,001
	Peulh	8,8		8,2		6,4		6,9	

MG = moyenne géométrique.

des différences entre Peulhs et Dogons. Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans la même localité [1,12]. Les taux d'anticorps anti-AMA1 variaient en fonction des groupes d'âge dans les deux groupes ethniques.

L'indice splénique plus élevé chez les Peulhs est en accord avec la physiopathologie du paludisme, la rate jouant un rôle capital dans la production des anticorps et étant le lieu de stockage des cellules B mémoires. Cela pourrait amener à penser que la forte réponse humorale observée chez les Peulhs pourrait résulter d'une activation précoce d'une importante population cellulaire B mémoire dans la pulpe blanche de la rate en fonction du degré d'exposition et de leur génétique (gènes impliqués dans les voies de la régulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire).

Plusieurs approches ont été utilisées pour expliquer la différence de susceptibilité au paludisme observée entre les Peulhs et leurs voisins non peulhs : étude du système de HLA de classe A (DQA-DQB) [14] ; étude des cellules B, de l'apprêtement des antigènes, de leur présentation et de l'expression spécifique de facteurs comme l'IL-4 [15]. Troye-Blomberg et al. (1990) ont montré que la forte production de l'IL-4 par les cellules humaines est associée à une forte production d'anticorps malariques [17].

Des recherches prenant en compte l'immunogénétique des cellules de l'immunité innée et de la réponse adaptative humorale et cellulaire seraient donc intéressantes pour une bonne compréhension de la susceptibilité au paludisme et de l'hétérogénéité de la réponse humaine face à l'agression par *P. falciparum*.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Remerciements : Nous remercions toutes les populations de nos sites d'étude pour leur engagement à participer à notre étude. Nos remerciements vont à l'endroit du Dr Carole Long du laboratoire d'immunologie des Instituts nationaux de la santé (NIH) des États-Unis pour son apport technique au cours de la réalisation des tests ELISA.

Références

- Berezky S, Dolo A, Maiga B, et al (2006) Spleen enlargement and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(3):248–57. Epub 2005 Nov 18
- Bolad A, Farouk SE, Israelsson E, et al (2005) Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/Subclass and immunoglobulin M antibody responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa. *Scand J Immunol* 61(4):380–6
- Cavanagh DR, Dodoo D, Hviid L, et al (2004) Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infect Immun* 72(11): 6492–502
- Coley AM, Gupta A, Murphy VJ, et al (2007) Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. *PLoS Pathog* 3(9):1308–19
- Dolo A, Modiano D, Maiga B, et al (2005). Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 72(3):243–8
- Escalante AA, Grebert HM, Chaiyaroj SC, et al (2001) Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. *Mol Biochem Parasitol* 113(2):279–87
- Farouk SE, Dolo A, Berezky S, et al (2005) Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect* 7(1):110–7. Epub 2004 Dec 16
- Garg S, Alam MT, Das MK, et al (2007) Sequence diversity and natural selection at domain I of the apical membrane antigen 1 among Indian *Plasmodium falciparum* populations. *Malar J* 6:154
- Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, et al (2007) A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *J Immunol* 178(5):3099–106
- Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, et al (2002) In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 70(12):6948–60
- Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, et al (2005) Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 73(6):3677–85
- McCall MB, Hopman J, Daou M, et al (2010) Early interferon-gamma response against *Plasmodium falciparum* correlates with

- interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis* 201(1):142–52
13. Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, et al (1996) Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(23):13206–11
 14. Riley EM, Allen SJ, Troye-Blomberg M, et al (1991) Association between immune recognition of the malaria vaccine candidate antigen Pf155/RESA and resistance to clinical disease: a prospective study in a malaria-endemic region of west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85(4):436–43
 15. Sjöberg K, Lepers JP, Raharimalala L, et al (1992) Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2101–4
 16. Stowers AW, Chen Lh LH, Zhang Y, et al (2002) A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects Aotus monkeys from a lethal challenge with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1):339–44. Epub 2001 Dec 18
 17. Troye-Blomberg M, Riley EM, Kabilan L, et al (1990) Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(14):5484–8
 18. Woehlbier U, Epp C, Hackett F, et al (2010) Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malaria Journal* 9:77