

Analyses des réponses IgG dirigées contre des antigènes candidats vaccins dans le paludisme urbain non aggravé à Dakar (Sénégal) : variations suivant l'âge et les densités parasitaires

IgG responses to candidate malaria vaccine antigens in the urban area of Dakar (Senegal): evolution according to age and parasitemia in patients with mild symptoms

B. Mbengue · M. Sylla Niang · R. Ndiaye Diallo · G. Diop · A. Thiam · O. Ka · A. Touré · A. Tall · R. Perraut · A. Dièye

Reçu le 12 mai 2014 ; accepté le 25 novembre 2014
© Société de pathologie exotique et Lavoisier SAS 2015

Résumé L'évaluation de la spécificité des IgG anti-*Plasmodium* vis-à-vis d'antigènes candidats vaccins a rarement porté sur le paludisme urbain dont les accès cliniques couvrent toutes les classes d'âge et peuvent devenir sévères. Cette étude rétrospective évalue par ELISA les taux d'IgG et de sous-classes d'IgG contre les protéines MSP1p19, MSP3, EB200, GST-5 et R23 de *P. falciparum*. Elle a été faite chez 200 patients dakarois consultant pour un accès palustre non aggravé. Un âge moyen de 15 ans (4 à 56 ans) et des parasitemies entre 0,1 et 17 % ont été retrouvés. Les taux d'IgG anti-MSP3 sont très élevés chez les patients faiblement parasités ($\leq 1\%$) et apparaissent négativement corrélés aux densités parasitaires ($Rho = -0,54$; $p = 0,021$). Cette corrélation est plus forte chez les enfants (≤ 15 ans). Une hausse des IgG anti-MSP1p19 chez les adultes à faibles parasitemies ($< 1\%$) ($p = 0,021$) avec prédominance de la sous classe IgG₁ ($p < 0,01$) a été aussi retrouvée. Ces résultats montrent l'existence d'une association entre réponses Ac et parasitemies dépendante des IgG anti-MSP3 chez les enfants et des IgG anti-MSP1p19 chez les adultes en milieu urbain.

Mots clés *P. falciparum* · Paludisme urbain · IgG · Parasitémie · Age · Dakar · Sénégal · Afrique intertropicale

Abstract Malaria remains a major problem in African countries despite substantial decreases in morbidity and mortality due to sustained control programs. Studies for the evaluation of qualitative or quantitative Ab responses to key targets of anti-*Plasmodium* immunity were mostly done in rural endemic setting compared to urban area. In a cohort of 200 patients with mild malaria and living in Dakar, we analyze total and subclasses IgG responses to a panel of *P. falciparum* blood stage antigens: MSP1p19, MSP3, EB200, GST-5 and R23. A mean age of 15 yrs (4 to 56 yrs) and parasitemia between 0.1 to 17% were found. Levels of IgG anti-MSP3 were higher in patients with low parasitemia ($\leq 1\%$) and appear negatively correlated to parasite densities ($Rho = -0.54$; $p = 0.021$). This correlation is more significant in children (≤ 15 yrs). In addition, an increase of IgG responses against MSP1p19 is highly observed in adults having a parasitemia less than 1 %. In those patients, we find that IgG₁ subclasses were predominant ($p < 0.01$). Our study shows an association between Ab responses and parasitemia. This association is dependant to IgG anti-MSP3 in children and IgG anti-MSP1p19 in adults living in urban area.

Keywords *P. falciparum* · Urban malaria · IgG · Parasitemia · Age · Dakar · Senegal · Sub-Saharan Africa

B. Mbengue (✉) · M. Sylla Niang · A. Touré · R. Perraut · A. Dièye
Service d'immunologie UCAD FMPO, Dakar, Sénégal
e-mail : bmbengue@pasteur.sn

B. Mbengue · R. Ndiaye Diallo · G. Diop · A. Thiam · O. Ka · A. Dièye
Unité d'immunogénétique Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

A. Tall
Unité d'épidémiologie Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

Introduction

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est la maladie parasitaire humaine la plus fréquente en Afrique subsaharienne où plus de 80 % des cas mortels ont été recensés en 2012 [28]. L'extension des résistances du vecteur et du parasite ainsi que l'urbanisation rapide des populations africaines requiert la poursuite des investigations concernant le

paludisme urbain et le développement d'un vaccin. L'existence d'une protection dépendante des anticorps (Ac) et acquise suite à une exposition répétée au pathogène, a été très largement rapportée chez les habitants des zones de forte endémicité palustre. Ces individus exposés possèdent des taux élevés d'Ac dirigés contre un panel d'épitopes parasitaires, dont certains n'induisent pas de réponse immunitaire protectrice [23,25]. Face à de tels constats, l'étude de la spécificité des Ac anti-*plasmodium* potentiellement protecteurs est un préalable à l'établissement d'un vaccin efficace. Des gènes codant pour des antigènes parasitaires (Ag) ont été clonés. Ces avancées ayant permis la production et la caractérisation moléculaire de plusieurs protéines du parasite, ont facilité l'évaluation de la contribution de chaque Ag dans le développement de la réponse immunitaire anti-*plasmodium*.

Les études immunologiques ont majoritairement abordé le paludisme des zones rurales hyper endémiques. Rares sont les travaux ayant concerné les grands centres urbains où la transmission palustre est moins importante et plus focalisée qu'en milieu rural [8,26]. En raison de l'absence de prémunition chez les citadins, le risque épidémique est potentiellement présent et les accès cliniques touchant toutes les classes d'âge, peuvent devenir assez graves [9,21]. En vue d'une prévention future du paludisme par vaccination, il est clair que seules les données immunologiques mesurées dans les zones rurales endémiques ne permettront pas l'élaboration d'un modèle vaccinal destiné à une utilisation généralisée dans des espaces géographiques aussi différents quant à la biologie du parasite et de son vecteur.

Afin de mieux identifier certaines caractéristiques séro-immunologiques du paludisme en milieu urbain potentiellement associées à la morbidité palustre, une étude rétrospective reposant sur une évaluation quantitative des réponses en IgG dirigées contre des protéines recombinantes de stades sanguins asexués de *P. falciparum*, a été effectuée. Elle a concerné des patients domiciliés dans une ville de la banlieue dakaroise et consultant pour un accès palustre non aggravé.

Matériel et méthodes

Site d'étude et recrutement de la population d'étude

La population d'étude était constituée de patients atteints d'un accès palustre confirmé au dispensaire de Sahn à Pikine : banlieue dakaroise. Dans cette zone, le paludisme est hypoendémique et saisonnier. *P. falciparum* est la principale espèce retrouvée et *Anopheles gambiae sl* est le principal moustique vecteur [20]. Les patients ont été enrôlés entre septembre 2000 et janvier 2001, une période couvrant la durée de transmission maximale du paludisme dans la région allant de juillet à octobre.

Au moment du recrutement, les gouttes épaisses et frottis minces ont été réalisés par un prélèvement au bout des doigts. Pour les analyses biologiques, les prélèvements de sang total ont été effectués au niveau du pli du coude sur tubes EDTA. Le sérum a été isolé après centrifugation à 400 g pendant 5 mn avant d'être fractionné en aliquotes dans des tubes Eppendorf®, puis congelés à -80°C en attendant l'étude sérologique.

Après consentement libre et éclairé, 290 patients ont été initialement recrutés. Sur la base de données cliniques, para-cliniques et des autres informations recueillies sur questionnaire, l'analyse n'a porté que sur 200 patients âgés de 4 à 56 ans et montrant un tableau clinique évocateur d'un accès simple associé à une goutte épaisse (GE) ou un frottis mince positif à *P. falciparum*. Ainsi, ont été exclus tous les patients présentant l'une des manifestations cliniques ou biologiques des formes palustres sévères définies par l'OMS [27], et ceux ayant des signes cliniques contingents de la gravité comme l'obnubilation et l'ictère. En outre, la présence de tout état susceptible d'interférer sur l'étude tels que la grossesse, l'accouchement récent, les infections récidivantes, la prise antérieure d'un antipaludéen ou un séjour hors de la ville lors des trois mois précédents le recrutement ont conduit à l'exclusion.

Antigènes parasitaires étudiés

Au nombre de cinq, ce sont des protéines parasitaires naturellement retrouvées à la surface du mérozoïte (MSP1p19 et MSP3) ou au niveau de la membrane des globules rouges parasités ou GRp (EB200, GST-5, R23).

MSP1p19 ou MSP1-19 représente la région C-terminale MSP1; son poids moléculaire est de 19Kda et c'est sa forme recombinante qui a été utilisée [18]. MSP3 est un Ag synthétisé au moment de la schizogonie. Sa partie C terminale représentée par les aminoacides 212 – 318 a été évaluée dans ce travail [16], il s'agit du long peptide produit par génie génétique et antérieurement décrit par Roussillon et al [22]. Ces deux antigènes du stade mérozoïte ont été utilisés à la concentration de 0,5 µg/ml.

La protéine R23 dérive de la partie centrale de l'Ag R45 et renferme 11 copies d'une séquence répétée de 6 aminoacides (HKSDSN/S/H) [1]. EB200 est une séquence de 135 aminoacides de l'Ag Pf332 ; elle contient 13 copies d'un dimère de glycine très conservé entre les différentes souches parasitaires [12]. GST-5 ou PfEMP5-cl5 représente la partie C terminale de PfEMP3, elle est formée de répétitions de 13 aminoacides très riches en asparagine [18]. Les trois Ags des GRp : R23, EB200 et GST-5 ont été produits avec le vecteur d'expression pGEXA puis fusionnés au Gluthathion-S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* en vue de leur purification [19]. Ainsi, la détermination des taux d'IgG dirigées contre ces trois Ags a été faite après le retrait des densités optiques liées aux réponses IgG anti-GST (pure) individuelles, évaluées

chez tous les patients. Les protéines recombinantes R23, EB200 et GST-5 ainsi que l'antigène GST, ont été utilisés à la même concentration (1 µg/ml) lors de la sensibilisation des plaques d'ELISA. Les concentrations et conditions d'utilisation de tous les antigènes testés ont été optimisées puis rapportées dans nos études antérieures [13,18,19,22].

Méthodes de laboratoire

Détermination des densités parasitaires

Les gouttes épaisses ont été colorées par le May-Grünwald Giemsa à 10 % et lues au microscope à l'objectif 100 à immersion par rapport à un champ d'environ 200 leucocytes. Pour chaque patient, l'estimation de cette densité parasitaire en pourcentage a été obtenue en divisant le nombre de parasite/µl par le taux de leucocytes obtenu lors des tests de numération sanguine.

Détermination des niveaux de réponses Ac

Les IgG anti-*plasmodium* ont été dosées par ELISA grâce une méthode standardisée précédemment décrite [13,14,19]. La détection des sous-classes d'IgG a été effectuée grâce à des Ac monoclonaux de souris spécifiques de ces subisotypes humains : IgG₁ (clone NL16) diluées à 1/2000 ; IgG₂ (clone HP6002) et IgG₃ (clone ZG4) utilisées à une dilution de 1/10000 et IgG₄ (clone GB7B) diluées à 1/30000 (Cappel[®], USA). Les densités optiques (DO) mesurées au spectrophotomètre à 450 nm (Asys Hitech[®]) ont servi à l'expression des résultats en ratio de DO (rt de DO) qui correspondent au rapport de la DO de l'échantillon sur celle d'un contrôle négatif systématique (pool de sérums d'européens non exposés).

La validité des réponses négatives a été vérifiée avec un sérum témoin naïf africain. Un pool de sérums recueillis chez les sujets hyper-immuns [18], choisi pour sa forte spécificité en Ac anti-*P. falciparum* (Témoin positif) a permis la validation inter-essais des résultats. Ont été considérés comme répondeurs, les patients montrant des rt de DO ≥ 2 , ce qui correspond à la moyenne des contrôles naïfs additionnée de 2 Ecart types, soit une positivité de plus de 95 %.

Analyses statistiques

Le logiciel Statview[®] 5.1 a été utilisé pour ces analyses. Les niveaux de réponse Ac ont été comparés par les tests t appariés et non appariés. Les éventuelles relations entre deux séries appariées de réponses Ac chez les mêmes individus et vis-à-vis d'Ag différents ont été recherchées par le Spearman Rank Test. Une différence est considérée comme significative pour une probabilité $p < 0,05$. Des analyses de régression multiple ont été appliquées pour l'étude des liaisons entre réponses IgG et sous-classes.

Résultats

Caractéristiques démographiques et hématoparasitologiques de la population d'étude

L'étude a porté sur 200 patients avec une moyenne d'âge $15 \pm 0,7$ ans. Le sex ratio est en faveur des femmes (79/121), mais en tenant compte de l'âge, les patients de sexe masculin prédominent légèrement chez les enfants (61/52). Les densités parasitaires varient entre 0,01 et 17 % soit de 410 à 483 400 Tr/µl. Un séparation de la population d'étude en deux groupes d'âge au seuil de 15 ans : 87 adultes ($24,2 \pm 1,1$ ans) et 113 enfants ($8,7 \pm 0,3$ ans), a permis de constater l'existence de différences significatives entre les deux groupes pour les densités parasitaires et les taux d'hémoglobine sanguins. En effet, les parasitémies retrouvées sont plus élevées chez les enfants comparés aux adultes (2,1 % versus 1,1 %, $p = 0,024$); en revanche les taux d'hémoglobinémie étaient plus forts chez les adultes avec une moyenne de 11,5 g/dl contre 9,5 g/dl chez les enfants ($p = 0,010$). Aucune différence significative n'a été observée pour les taux de plaquettes, bien qu'ils soient plus élevés chez les jeunes patients (Tableau 1).

Variations des réponses en IgG suivant l'âge des patients

Des prévalences de réponse en IgG comprises entre 15 et 29 % ont été retrouvées contre toutes les protéines testées, à l'exception de MSP1p19 qui montre plus de 70 % de répondeurs parmi les patients étudiés (Tableau 2). Pour cet antigène du mérozoïte, les amplitudes de réponse en IgG exprimées en ratio de DO sont plus fortes, comparées à celles des IgG anti-MSP3 et surtout de toutes les autres protéines recombinantes testées ($p < 0,01$).

Parmi les antigènes associés à la membrane des GRp, la protéine GST-5 est apparue comme la mieux reconnue et avec une tendance pour des niveaux d'IgG plus élevés ($p = 0,04$) que ceux des autres Ags (Fig. 1). Cependant, quel que soit l'antigène de GRp considéré, il n'a pas été retrouvé de corrélation entre l'âge des patients et le niveau de réponse en IgG totales.

Dans une analyse des taux d'IgG chez les patients répondeurs (ratio de DO ≥ 2), la protéine GST-5 est restée comme l'antigène de la surface érythrocytaire induisant les réponses les plus fortes bien que reconnue par 28 % de l'ensemble des patients sélectionnés (Tableau 2). Cette analyse chez les seuls patients répondeurs montre également une absence de variation discriminante entre les taux d'IgG anti-MSP3 et ceux d'IgG anti-MSP1p19 même si en termes de prévalence des répondeurs, la protéine MSP1p19 demeure la plus reconnue ($p < 0,01$). Suivant l'âge, seuls les niveaux de réponses en IgG anti-EB200 sont significativement variables entre les groupes d'adultes et d'enfants (6,2 versus 5,4 ; $p = 0,019$).

Tableau 1 Caractéristiques héματο-parasitologiques de la population d'étude / Haematological and parasitological characteristics of the study population.

Caractéristiques	Global N = 200	Adultes N = 87	Enfants N = 113	p1
Age moyen (min-max) (ans)	15,5 (3 – 65)	24,2 (16 – 65)	8,7 (3 – 15)	-
Sex-ratio (H/F)	79/121	18/69	61/52	-
Densité parasitaire (moy ± ES) (Tr/μl)	32100 ± 3497	24348 ± 3755	37125 ± 5556	0,016
Densité parasitaire moyenne (min – max) (%)	1,6 (0,01 – 17)	1,1 (0,01 – 12)	2,1 (0,01 – 17)	0,024
Taux d'hémoglobine moyen (min – max) (g/dl)	11,1 (5,8 – 16,6)	12,5 (8 – 16)	9,5 (5,8 – 15,1)	0,010
Taux de plaquettes moyen (min – max) (G/ml)	118 (28 – 355)	113 (28 – 355)	125 (28 – 355)	ns

1 = test U de Mann Whitney pour la comparaison entre adultes et enfants ; ns = non significative ; min = valeur minimale ; max = valeur maximale; Tr/μl = trophozoïtes par microlitre ; g/dl = gramme par décilitre ; G/l = giga par litre ; ES = Erreur Standard.

Tableau 2 Niveaux et prévalences des anticorps en IgG chez les répondeurs selon les classes d'âge / Prevalences and levels of IgG antibodies in responders patients according to the age group.

Antigènes		Global	Adultes	Enfants	p ⁵
		N ¹ = 200	N = 87	N = 113	
R23	N ² (% ³)	28 (14)	13 (16)	15 (13)	
	DO moyen ± ES ⁴	0,48 ± 0,07	0,48 ± 0,12	0,49 ± 0,07	ns
	rtDO moyen ± ES	5,4 ± 0,6	5,5 ± 0,9	5,4 ± 0,7	ns
EB200	N (%)	44 (22)	22 (25)	22 (19)	
	DO moyen ± ES	0,58 ± 0,08	0,65 ± 0,10	0,51 ± 0,12	0,021
	rtDO moyen ± ES	5,9 ± 0,64	6,2 ± 0,7	5,4 ± 1,1	0,019
GST-5	N (%)	56 (28)	25 (29)	31 (27)	
	DO moyen ± ES	1,03 ± 0,10	1,04 ± 0,14	1,02 ± 0,14	ns
	rtDO moyen ± ES	7,8 ± 0,7	7,4 ± 0,8	8,0 ± 1,1	ns
MSP3	N (%)	48 (24)	17 (20)	31 (27)	
	DO moyen ± ES	1,11 ± 0,11	1,22 ± 0,21	1,05 ± 0,13	ns
	rtDO moyen ± ES	6,9 ± 0,6	7,1 ± 1,2	6,6 ± 0,7	ns
MSP1p19	N (%)	148 (74)	63 (72)	85 (75)	
	DO moyen ± ES	0,94 ± 0,04	0,97 ± 0,06	0,92 ± 0,05	ns
	rtDO moyen ± ES	7,6 ± 0,3	7,3 ± 0,4	7,8 ± 0,4	ns

1 = nombre total de patients ; 2 = nombre de patients répondeurs ; 3 = prévalences des patients répondeurs, 4 = Erreur Standard chez les répondeurs; 5 = test U de Mann Whitney pour la comparaison entre adultes et enfants, ns = non significative ; DO = densité optique ; rtDO = ratio de DO.

(Tableau 2). Pour tous les antigènes, nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre l'âge des répondeurs et les niveaux des réponses en IgG.

Comparaison des réponses IgG suivant les densités parasitaires

Les patients ont été répartis en deux groupes à partir du seuil parasitémiq ue de 1 % :

- patients avec une parasitémie ≤ 1 % (faibles) ;
- et patients avec plus de 1 % de parasitémie (fortes). Les niveaux des réponses en IgG anti-EB200 et anti-MSP3 sont statistiquement variables entre ces deux groupes.

La protéine EB200 a montré un taux moyen de réponse en IgG plus élevé chez les patients à parasitémie supérieure à 1 % (p = 0,021) tandis que les amplitudes de réponse IgG anti-MSP3 apparaissent significativement plus faibles chez les malades dont la parasitémie est supérieure à 1 % (p < 0,010) (Fig. 2). Une corrélation négative entre les densités parasitaires et les taux des réponses en IgG anti-MSP3 a été observée chez les patients à « faibles » parasitémie ≤ 1 % (rho = 0,54 ; p = 0,021).

Afin d'obtenir des indications sur les sous-classes d'IgG qui seraient impliquées dans la variation de la densité parasitaire chez les individus répondeurs, il a été procédé à une comparaison des amplitudes de réponse en subisotypes entre

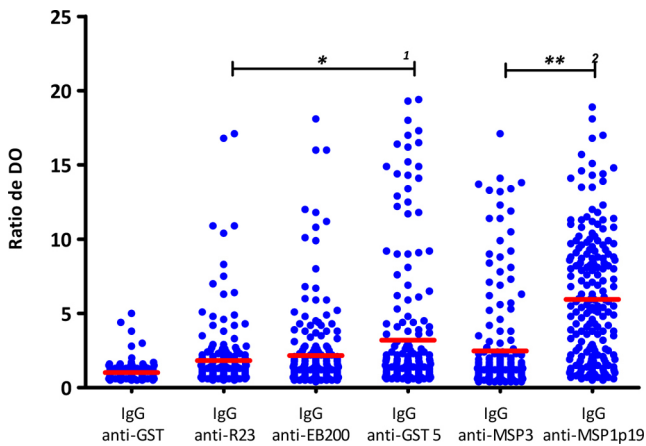


Fig. 1 Comparaison des niveaux de réponses IgG contre les différents antigènes testés sur l'ensemble des patients / *Comparison of total IgG levels against tested antigens in the study population.* Scatter plot vertical de comparaison des ratios de DO par les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (¹) ou de Wilcoxon (²) : seuil de significativité égal à 5 % avec ** signifie $p \leq 0,01$ et * signifie $0,01 < p < 0,05$. Les barres en gris foncé représentent les ratios de DO moyens

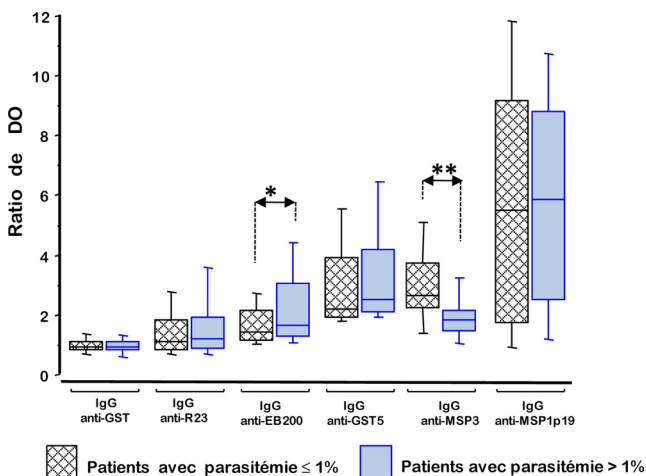


Fig. 2 Comparaison des niveaux de réponses IgG entre les deux groupes définis suivant la densité parasitaire / *Comparison of total IgG levels according to parasitaemia groups.* Box plot montrant les médianes des ratios de DO (trait du milieu), les 25^e et 75^e percentiles (bordures supérieures et inférieures du box) et les valeurs extrêmes : minima (barre au dessous du box) et maxima (barres en dessus du box). Comparaison avec le test de Mann Whitney des ratios de DO pour chaque Ag suivant les parasitémies séparées au seuil de 1 %. * signifie $0,01 < p \leq 0,05$; ** signifie $p \leq 0,01$

les deux groupes de patients ci-dessus définis. L'analyse des amplitudes de réponse en sous-types d'IgG a permis de montrer une nette prédominance des IgG₁ pour la protéine MSP1p19 par rapport aux autres sous-classes ($p < 0,01$) (Fig. 3a). La réponse en IgG anti-MSP3 est essentiellement

constituée des sous-classes IgG₁ et IgG₃ avec pour la dernière sous-classe des niveaux de réponse qui semblent plus élevés chez les patients ayant une densité parasitaire $\leq 1\%$ ($p = 0,031$) (Fig. 3b). Une forte réponse de type IgG₂ anti-R23, comparable à celle des IgG₁ anti-R23 a été observée. Elle est plus élevée que celles des sous-classes IgG₃ et IgG₄ anti-R23 ($p < 0,01$) (Fig. 3c).

Avec l'antigène GST-5, aucune différence significative n'est retrouvée entre les quatre sous-classes d'IgG. Cependant, en tenant compte des taux de parasitémie (seuil de 1 %), les niveaux d'IgG₂ sont apparus plus élevés dans le groupe des patients à parasitémie supérieure à 1 % ($p = 0,021$) (Fig. 3d).

Variations des réponses IgG suivant l'âge et la parasitémie des patients

Une analyse tenant compte à la fois de l'âge des patients et des densités parasitaires a permis de constater des variations des niveaux de réponses en IgG anti-MSP3 d'une part et anti-MSP1p19 d'autre part. Il s'agit d'abord d'une baisse significative des taux d'IgG anti-MSP3 chez les enfants fortement infectés par rapport à ceux présentant des parasitémies $\leq 1\%$ ($p < 0,01$). En outre, les enfants ayant des parasitémies faibles répondent plus fortement contre MSP3 que contre toutes les protéines du GRp étudiées (Fig. 4a).

Pour les IgG anti-MSP1p19, des amplitudes de réponses plus fortes ont été retrouvées chez les adultes ayant une densité parasitaire $> 1\%$. En effet, les adultes fortement parasités répondent faiblement contre la protéine MSP1p19 comparés à ceux montrant une faible parasitémie ($p = 0,021$). Il n'y a pas cependant de variation des taux d'IgG anti-MSP1p19 entre les deux groupes d'enfants séparés suivant le seuil parasitémique de 1 % (Fig. 4b).

Concernant les taux d'IgG dirigées contre les protéines associées aux GRp, aucune variation discriminante n'a été notée entre les divers groupes de patients (Fig. 4).

Discussion

Dans le cadre d'une série d'investigations pour mieux connaître les aspects immunologiques de l'infection palustre, il a été étudié l'immunité humorale IgG anti-*P. falciparum* en milieu urbain. Une analyse rétrospective recherchant les variations suivant l'âge de patients et les densités parasitaires a été effectuée. Des études immuno-épidémiologiques similaires à celle-ci ont été plus fréquemment menées en zone rurale hyperendémique [8] et leurs résultats restent encore difficilement interprétables et ne sont pas aisément extrapolables aux grands centres urbains.

En Afrique subsaharienne, plus de 40% de la population vit en zone urbaine avec un taux d'accroissement annuel de 6% [3,9]. Dans les années à venir, le paludisme sera qualifié

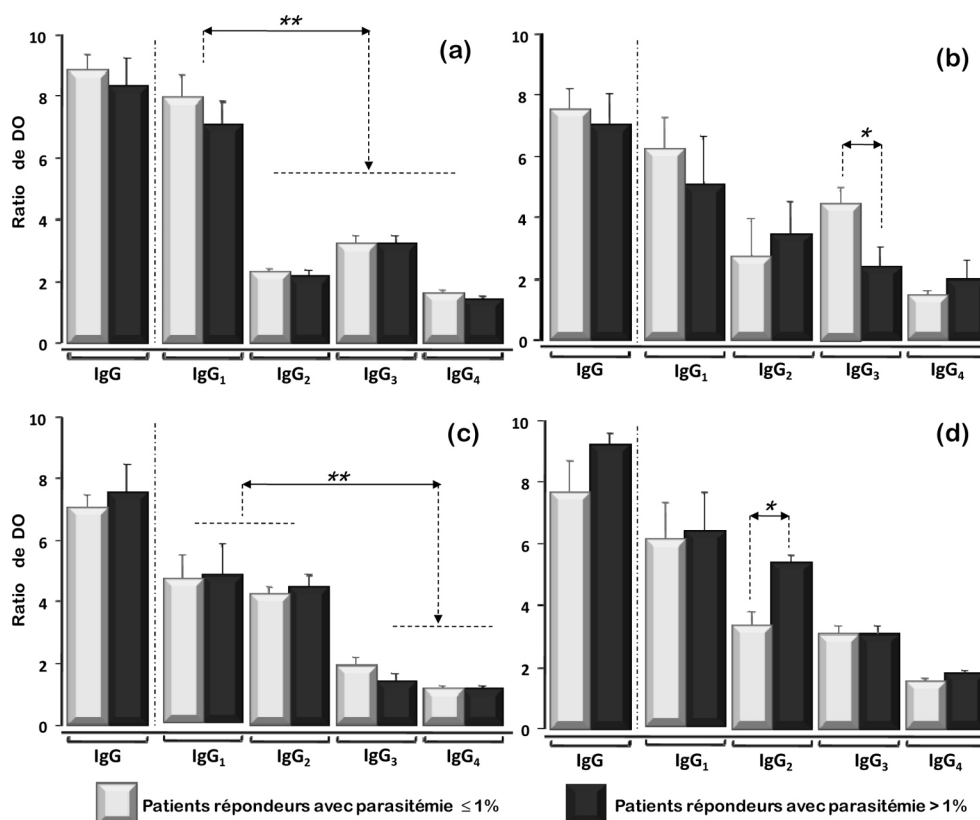


Fig. 3 Distribution des réponses en sub-isotypes d'IgG dirigées contre MSP1p19 (a), MSP3 (b), R23 (c) et GST-5 (d) chez les patients répondeurs, suivant les densités parasitaires / *Distribution of IgG sub-classes against MSP1p19 (a), MSP3(b), R23 (c) et GST-5 (d) in responder patients according to parasitemia levels.* Comparaison avec les tests de Kruskal Wallis (a, c) ou de Mann Whitney (b, d) * signifie $0,01 < p \leq 0,05$; ** signifie $p \leq 0,01$. Les barres d'erreur sont représentées sur chaque colonne des histogrammes

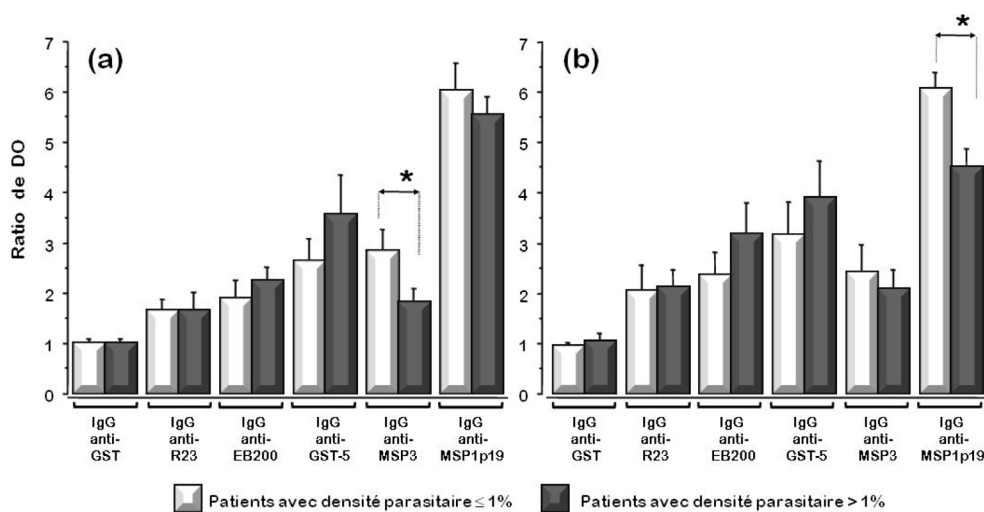


Fig. 4 Comparaison des niveaux de réponses IgG suivant la parasitémie chez les enfants (a) et chez les adultes (b) / *Comparison of total IgG levels according to parasitaemia in infants (a) and adults (b) groups.* Comparaison avec le test de Mann Whitney dans les deux groupes d'âge. * signifie $0,01 < p \leq 0,05$; ** signifie $p \leq 0,01$. Les barres d'erreur sont représentées sur chaque colonne des histogrammes

d'urbain dans la région. L'impact positif de l'urbanisation sur l'infection est la diminution de la transmission anophélienne [3,21] mais si l'accélération de l'urbanisation rime avec une diminution globale de l'incidence du paludisme, il y a aussi le revers de la médaille avec une augmentation relative des formes graves de paludisme à tous les âges [26].

Au cours d'une étude précédente, nous avons montré une forte reconnaissance des extraits parasitaires totaux, un asynchronisme avec des niveaux d'IgG plus élevés que ceux des IgM et une absence de variation entre les adultes et enfants vivant en milieu urbain [13]. Cependant, il existe peu de données concernant les Ag parasitaires candidats vaccins notamment MSP1p19 et MSP3, chez les citadins.

Suivant l'âge, les résultats de la présente étude ont montré l'absence de variation discriminante des prévalences de répondeurs ou des niveaux sériques d'isotypes et de sous-classes d'IgG dirigées contre les Ags étudiées. Il s'agit d'un résultat contrastant clairement avec la situation observée en zone de forte endémicité [8,18,23] et qui consolide l'hypothèse selon laquelle l'acquisition progressive d'une immunité protectrice serait retardée ou inexistante en milieu urbain à transmission faible [7,9,23]. Dans le cas de Brazzaville, 63 % des enfants résidant depuis leur naissance à Poto-Poto n'ont toujours pas d'Ac anti-paludiques à l'âge de 6 et 7 ans et sont toujours ainsi exposés aux formes graves de la maladie. Ce pourcentage est encore de 16 % à l'âge de 14 ans [26]. En zone rurale, la totalité des enfants sont séro-positifs avant l'âge de 5 ans [14,25].

Les effets protecteurs des IgG anti-*P. falciparum* contre les fortes densités parasitaires, ont été largement évalués avec les expériences de transfert passif d'IgG [2,4], puis dans des études immuno-épidémiologiques classiques et des tests *in vitro* d'inhibition de culture ou de croissance parasitaire [5]. Ainsi, nous avons trouvé que les taux d'IgG anti-MSP1-19 étaient significativement plus forts que ceux dirigés contre les autres Ags testés et que ces taux d'Ac anti-MSP1-19 étaient négativement corrélés aux densités parasitaires chez les patients âgés de plus de 15 ans. Des associations similaires ont été décrites, cependant chez des enfants en zone hyperendémique [17,24]. A l'image de nos résultats, ces auteurs et bien d'autres [6-8, 15] ont démontré une prédominance des IgG₁ anti-MSP1p19 douées d'une activité antiparasitaire en agissant soit par blocage, inhibition, neutralisation et par un phénomène d'opsonisation [5].

Aussi la comparaison des taux d'IgG anti-MSP3 dans les deux groupes de patients définis suivant le seuil parasitémique de 1 % a montré des amplitudes plus fortes chez les patients faiblement parasités ; mais après ajustement avec l'âge, cette différence de réponse n'a été retrouvée que chez les enfants. Ce résultat suggère une association entre les IgG anti-MSP3 et les parasitémies faibles chez les enfants comme ce fut largement décrit par certaines études [8]. En termes de sous-classes, seuls les taux d'IgG₃ anti-MSP3 sont

discriminants suivant les densités de parasites dans le sang. Cette sous-classe d'IgG serait responsable de la protection. Des preuves en faveur de cette hypothèse ont été rapportées antérieurement au Sénégal par Roussillon et al [22] puis au Soudan par Iriemenam et al [10] qui ont montré une protection liée aux seules IgG₃ anti-MSP3 en zone hyperendémique. Il a été démontré que ces anticorps agissaient par un mécanisme d'ADCI par l'intermédiaire des récepteurs RFc γ retrouvés à la surface des monocytes [11,17] et permettrait une réduction de 54 % du risque d'accès palustres chez les enfants répondeurs versus non répondeurs [15,24].

Pour les trois protéines recombinantes associées à la surface des hématies infectées, nous avons retrouvé des prévalences de répondeurs et des amplitudes de réponses en IgG faibles par rapport à celles des IgG anti-MSP1p19. Nous aurions prédit une réponse Ac anti-antigènes de GRp compte tenu des fortes parasitémies observées chez les consultants urbains. Cette observation focalise l'attention sur l'expression des protéines R23, EB200 et GST-5 à la surface des GRp chez l'homme même si plusieurs travaux expérimentaux aient démontré leur implication dans la protection chez les primates [19].

Conclusion

Nos résultats confirment l'implication des antigènes MSP3 et MSP1p19 dans la réponse humorale protectrice contre les fortes parasitémies, contrairement aux protéines des GRp étudiées. Cependant, la simple mesure des niveaux d'IgG sériques dirigés contre ces deux antigènes de *P. falciparum* n'est pas suffisante comme preuve d'une protection antiparasitaire en zone urbaine. Ces réponses Ac devraient servir de marqueurs du statut clinique plutôt que de véritables effecteurs de protection.

Remerciements Nous remercions les patients, leurs familles, les Docteurs A. M. Diatta, C. Y. Ndiaye M. L. Varela et M. B. Diouf pour leur contribution et leur disponibilité. Nous remercions également le personnel du laboratoire de Biologie Médicale de l'IPD pour leur collaboration.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

1. Bonnefoy S, Guillotte M, Langsley G, Mercereau-Puijalon O (1992) *Plasmodium falciparum*: characterization of gene R45 encoding a trophozoite antigen containing a central block of six amino acid repeats. *Exp Parasitol* 74(4):441-51
2. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, et al (1990) Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum*

- blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 172(6):1633-41
3. Byrne N (2007) Urban malaria risk in sub-Saharan Africa: where is the evidence? *Travel Med Infect Dis* 5(2):135-7
 4. Cohen S, Mac Gregor IA, Carrington SC (1961) Gamma globulin acquired immunity to human malaria. *Nature* 192:733-7
 5. Courtin D, Oesterholt M, Huismans H, et al (2009) The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* 4(10):e7590
 6. Dodoo D, Atuguba F, Bosomprah S, et al (2011) Antibody levels to multiple malaria vaccine candidate antigens in relation to clinical malaria episodes in children in the Kasena-Nankana district of Northern Ghana. *Malar J* 10:108
 7. Dodoo D, Hollingdale MR, Anum D, et al (2011) Measuring naturally acquired immune responses to candidate malaria vaccine antigens in Ghanaian adults. *Malar J* 10:168
 8. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG (2010) The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 7(1):e1000218
 9. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, et al (2005) Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol* 3(1):81-90
 10. Iriemenam NC, Khirelsied AH, Nasr A, et al (2009) Antibody responses to a panel of *Plasmodium falciparum* malaria blood-stage antigens in relation to clinical disease outcome in Sudan. *Vaccine* 27(1):62-71
 11. Lundquist R, Nielsen LK, Jafarshad A, et al (2006) Human recombinant antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 cloned from peripheral blood leukocytes of individuals with immunity to malaria demonstrate antiparasitic properties. *Infect Immun* 74(6):3222-31
 12. Mattei D, Scherf A (1992) The Pf332 gene codes for a megadalton protein of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 Suppl 3 :163-8
 13. Mbengue B, Diatta AM, Tall A, et al (2010) Antibodies responses to *Plasmodium falciparum* blood stage crude extract in symptomatic patients living in an urban, low endemic area of Dakar (Senegal). *Dakar Médical* 55(3):20-6
 14. Mbengue B, Niang B, Diatta B, et al (2010) The use of crude *Plasmodium falciparum* antigens for comparison of antibody responses in patients with mild malaria vs. cerebral malaria. *Iran J Immunol* 7(3):150-61
 15. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, et al (2008) Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun* 76(2):759-66
 16. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, et al (1994) A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Mem Inst Osw Cruz* 89 2:77-80
 17. Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, et al (1998) A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg*, 58(2):211-9
 18. Perraut R, Marrama L, Diouf B, et al (2005) Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with *in vitro* inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *J Infect Dis* 191(2):264-71
 19. Perraut R, Morales-Betoulle S, Le Scanf C, et al (2000) Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of carrier-free *Plasmodium falciparum* R23 antigen in pre-exposed saimiri sciureus monkeys. *Vaccine* 19(1):59-67
 20. Programme National de Lutte contre le paludisme, Partenariat Sénégal, Rapport 2012. Avril 2013. p. 1-56
 21. Robert V, Macintyre K, Keating J, et al (2003) Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68(2):169-76
 22. Roussilhon C, Oeuvray C, Müller-Graf C, et al (2007) Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med* 4(11):e320
 23. Sergent E (1950) Définition de l'immunité et de la prémunition. *Arch Inst Pasteur Alger* 28(4):429-40
 24. Stanicic DI, Richards JS, McCallum FJ, et al (2009) Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun* 77(3):1165-74
 25. Trape JF, Rogier C, Konate L, et al (1994) The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 51(2):123-37
 26. Trape JF, Zoulani A (1987) Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part III: Relationships between urbanization and the intensity of malaria transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(Suppl 2):19-25
 27. WHO Geneva (2000) Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(Suppl 1):S1-90
 28. WHO Geneva (2014) World malaria report 2013, 255 p