

## Profils des réponses IgG dirigées contre CSP, GLURP et LSA-3NR2 dans le paludisme urbain à Dakar : influence sur l'hémoglobémie et les parasitémiées circulantes

Profiles of IgG responses against CSP, GLURP and LSA-3NR2 in urban malaria (Dakar): relations with haemoglobin levels and parasite densities

B. Mbengue · P. Kpodji · M. Sylla Niang · M.L. Varela · A. Thiam · A. Sow · K. Ndiaye · M. Aidara · F. Thiam · R. Ndiaye · G. Diop · C. M. Nguer · R. Perraut · A. Dièye

Reçu le 13 octobre 2015 ; accepté le 23 février 2016  
© Société de pathologie exotique et Lavoisier SAS 2016

**Résumé** Plusieurs candidats vaccins contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* sont à diverses phases d'essais cliniques en zone rurale à forte endémicité palustre. Très peu d'études ont concerné les grandes villes. L'urbanisation rapide des populations africaines requiert la poursuite des investigations concernant le paludisme dans ces villes. Cette étude a consisté en une évaluation par ELISA des taux d'IgG dirigées contre les antigènes CSP, LSA-3NR2 et GLURP de *P. falciparum*. Elle a été faite chez 144 patients dakarois consultant pour un accès palustre (non aggravé). L'âge moyen était de 15 ans (4-65). Les patients étaient répartis en 59 adultes (> 15 ans) et 85 enfants (≤ 15 ans). Les parasitémiées allant de 0,01 à 15 %, n'étaient pas variables suivant l'âge contrairement aux taux d'hémoglobine (4,5-16,6 g/dl) plus faibles chez les enfants ( $p < 0,01$ ). Au plan immunologique, GLURP et CSP étaient plus reconnus que LSA-3NR2. Les taux d'IgG anti-GLURP et anti-CSP sont apparus discriminants suivant l'âge avec globalement une corrélation positive ( $\rho = 0,32$  ;  $p < 0,001$ ). Seuls les niveaux d'IgG anti-GLURP étaient associés aux faibles parasitémiées (≤ 1 %) et aux taux élevés d'hémoglobémie (≥ 11 g/dl),

surtout chez les adultes ( $p < 0,001$ ). Dans une analyse de régression multiple, aucune des réponses contre les antigènes testés n'a été associée aux parasitémiées. Nos résultats montrent l'implication des IgG anti-GLURP dans l'immunité humorale antiparasitaire. L'apport de ce travail est d'avoir contribué à déterminer des niveaux d'IgG pouvant servir de biomarqueurs du statut clinique dans le paludisme urbain.

**Mots clés** *P. falciparum* · Paludisme urbain · IgG · CSP · GLURP · LSA-3NR2 · Parasitémie · Hémoglobémie · Dispensaire · Pikine · Sénégal · Afrique intertropicale

**Abstract** Malaria remains a major health problem in sub-Saharan African countries despite substantial decreases in morbidity and mortality due to sustained control programs. Vaccines candidates were mainly tested in rural endemic setting; however increasing proportion of the population is living in urban area. Evaluation of the qualitative or quantitative immune responses to key targets of anti-*Plasmodium* immunity requires further investigation in urban area. In a cohort of 144 patients with mild malaria living in Dakar, we analyzed IgG responses against target antigens of *P. falciparum*: CSP, LSA-3NR2 and GLURP by ELISA. A mean age of 15 yrs (4-65 yrs) was found and patients were separated in 59 adults (>15yrs) and 85 children (≤15 yrs). Parasites densities (0,01-15%) did not differ between the two age groups. In contrast, haemoglobin levels appeared lower in children (4.5-16.6 g/dl) ( $p < 0.01$ ). For the immune results, the most recognized antigens were GLURP and CSP compared to LSA-3NR2. Levels of IgG against these antigens were significantly different between the two age groups and they were positively correlated ( $\rho = 0.32$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, levels of IgG anti-GLURP were associated with low parasitemia (≤1%) and absence of anemia (≥11g/dl), particularly in

B. Mbengue (✉) · M. Sylla Niang · A. Dièye  
Service d'immunologie FMPO, Université Cheikh Anta Diop,  
Dakar, Sénégal  
e-mail : babacar.mbengue@ucad.edu.sn ; bmbengue@pasteur.sn

B. Mbengue · P. Kpodji · A. Thiam · A. Sow · K. Ndiaye ·  
M. Aidara · F. Thiam · R. Ndiaye · G. Diop · A. Dièye  
Unité d'immunogénétique, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

M.L. Varela · R. Perraut  
Unité d'immunologie, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.

C. M. Nguer  
Département génie chimique et biologie appliquée, ESP,  
Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

adults ( $p < 0.001$ ). In a multiple regression analysis, no significant relationship was found between parasite densities and IgG responses against all the tested antigens. Our study shows the implication of IgG anti-GLURP in humoral immune response against the parasite. The present work contributes to determine IgG levels that can be used as relevant immunologic biomarkers in urban clinical malaria.

**Keywords** *P. falciparum* · Urban malaria · IgG · CSP · GLURP · LSA-3NR2 · Parasitemia · Haemoglobin level · Pikine · Senegal · Sub-Saharan Africa

## Introduction

En Afrique subsaharienne, le paludisme à *Plasmodium falciparum* reste toujours un important problème de santé publique [35] malgré les efforts de lutte mis en œuvre ces dernières années. La létalité du paludisme à *P. falciparum* tourne autour de 15 % et reste surtout associée aux formes cérébrales pouvant résulter d'une mauvaise prise en charge des accès palustres simples [17]. L'amélioration des méthodes de prévention, de la prise en charge ainsi que la mise au point d'un vaccin anti-*P. falciparum* efficace seraient d'un grand support pour la maîtrise de l'infection [34].

De nombreux candidats vaccins ont été identifiés puis produits grâce aux progrès de génie génétique. Ils sont à diverses phases d'études en zones rurales à forte endémicité palustre [2]. Seul le candidat vaccin RTS,S a atteint la phase 3 dans ces essais cliniques et a montré 30 à 70 % d'efficacité contre le paludisme clinique dans différentes populations en Afrique [29]. Toutefois la durée de cette protection est encore inconnue et les données restent variables entre les régions [5]. En milieu urbain, où très peu d'études ont été consacrées à la vaccinologie antipalustre, la maladie revêt des aspects particuliers. 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 mortels [11,26]. L'urbanisation rapide des populations africaines requiert la poursuite des investigations concernant le paludisme dans les villes [4]. Il est clair que pour une prévention future efficace par vaccination, seules, les données immuno-épidémiologiques obtenues 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.

La présente étude a pour but d'une part, d'évaluer les réponses en IgG dirigées contre les stades hépatiques et sanguins de *P. falciparum* à travers trois peptides issus d'antigènes cibles (Ag) : CSP, LSA-3NR2 et GLURP, et d'autre part, de déterminer le rôle de biomarqueurs de cette immu-

nité humorale dans le suivi du paludisme clinique en milieu urbain. Les trois peptides antigéniques étudiés induiraient des réponses en Ac protecteurs contre les formes cliniques en zone de forte endémicité [1]. Les analyses ont été faites par rapport à l'âge des patients et aux données hématoparasitologiques, telles que les taux d'hémoglobine et les densités parasitaires collectés au moment du recrutement.

## Matériel et méthodes

### Site et population d'étude

L'étude a été menée chez des personnes atteintes d'un accès palustre simple confirmé et ayant consulté au niveau du dispensaire des Sœurs catholiques de Sahn à Pikine, une ville de la banlieue dakaroise. Le paludisme y est hypoendémique et saisonnier. *P. falciparum* est la principale espèce retrouvée et sa transmission est assurée par le moustique vecteur *Anopheles gambiae* sl [10,25,27].

Le recrutement a eu lieu entre septembre 2000 et janvier 2001, une période couvrant la durée de transmission maximale du paludisme dans la région de Dakar allant de juillet à octobre. Les données épidémiologiques relatives à l'infection palustre dans la zone ainsi que les critères d'inclusion ou d'exclusion des patients ont été décrits dans nos études antérieures [15,16]. Sur la base des données cliniques et des résultats hématoparasitologiques précédemment rapportés sur une population initiale de 200 malades recrutés après consentement [15,16], nous avons retenu 144 patients pour cette étude. Tous les patients sélectionnés avaient présenté une fièvre au moment de la prise de sang et aucun n'avait pris de traitement antipalustre avant le recrutement. L'étude a reçu l'accord des comités d'éthiques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et du ministère de la Santé.

### Antigènes étudiés

Ce sont des Ags parasitaires exprimés à la surface des sporozoïtes, des hépatocytes et des hématies infectés par *P. falciparum*. Il s'agit de la CSP (Circum-Sporozoite-Protein), de LSA-3NR2 (Liver-Stage-Antigen-3 fragment NR2) et de GLURP (Glutamate-Rich-Protein). La protéine CSP est l'un des principaux constituants antigéniques du candidat vaccin RTS,S [33]. Dans nos investigations, le peptide antigénique utilisé (NANP<sub>9</sub>-NVDPNVDPC) regroupe les fragments N terminal et C terminal de la CSP ; c'est un peptide produit à partir de la souche parasitaire K1 [3,6]. LSA-3 est une protéine exprimée par les sporozoïtes et les hépatocytes infectés. Provenant de la souche K1 de *P. falciparum*, le peptide étudié est formé de la région centrale non répétée ou NR2 de la protéine LSA-3 ou LSA-3NR2 (VLEESQVNDIFNSL

VKSVQQEQQHNV) [1,7]. C'est un épitope immunogène chez la souris et chez l'homme [12]. La protéine GLURP (85-213) est un exo-antigène exprimé à la fois sur des stades parasitaires hépatiques et sanguins. Elle est constituée d'une région N-terminale non répétée (R0) et de deux régions répétées : centrale (R1) et C-terminale (R2) [32]. Notre travail a porté sur le peptide EDKNEKGQHEIVEVEEILC, renfermant les régions R0 et R1 bien conservées au niveau du gène et hautement immunogène selon des études antérieures. Il a été produit à partir de la souche F32 de *P. falciparum* [13,30]. Les trois antigènes étudiés sont des formes peptidiques très conservées, produites par synthèse chimique (Genepep® Alès, France), puis couplés par liaison covalente avec de l'albumine bovine ou BSA de 66,43 kDa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) [1]. C'est ainsi que la détermination des taux d'IgG dirigées contre ces antigènes a été faite en tenant compte des densités optiques liées aux réponses IgG anti-BSA évaluées de manière individuelle chez tous les patients. Les trois peptides de même que la BSA libre, ont été utilisés à la même concentration (1 µg/ml) lors des tests ELISA. Les concentrations et conditions d'utilisation des Ags dans les tests ELISA ont été optimisées et demeurent identiques à celles antérieurement rapportées [1,16,23].

## Méthodes de laboratoire

### Détermination des densités parasitaires

Les gouttes épaisses confectionnées au moment de l'inclusion ont été colorées par le May-Grünwald Giemsa à 10 % (Merck®) puis examinées au microscope optique à l'objectif 100 par rapport à un champ d'environ 200 leucocytes. Pour chaque patient, l'estimation de la 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.

### Évaluation des paramètres hématologiques

Le sang total recueilli sur tube EDTA a servi à l'évaluation des données hématologiques par numération formule sanguine, à l'aide d'un compteur de type Celdyn (Abbot®). Pour nos analyses, nous avons retenu les taux d'hémoglobine, de plaquettes et de leucocytes.

### Détermination des niveaux de réponse Ac

Les IgG anti-*plasmodium* ont été dosées par ELISA sur plaques à 96 puits (Immulon®, NUNC, Danemark) sensibilisées par une dilution de l'Ag. Il s'agit d'une méthode standardisée précédemment décrite [16,23]. Les densités optiques (DO) mesurées au spectrophotomètre à 450 nm (Biorad®) ont servi à l'expression des résultats sous forme de ratio de

DO (rtDO) qui correspondent au rapport de la DO de l'échantillon sur celle d'un témoin négatif systématique (pool de sérums d'Européens non exposés). Ces calculs ont été réalisés après soustraction des DO moyennes des réponses en Ac anti-BSA (sans le peptide antigénique) obtenues pour chaque échantillon de patients ou témoins d'ELISA. La validité des réponses négatives a été vérifiée avec un sérum témoin naïf africain. Un pool de sérums recueillis chez les sujets hyper-immuns [23], 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 ayant des rtDO  $\geq 2$ , ce qui correspond à la moyenne des contrôles naïfs additionnée de 2 écart types soit une positivité de plus de 95 %.

## Analyses statistiques

Le logiciel Statview® 5.1 a été utilisé pour ces analyses. Les niveaux et prévalences des réponses Ac ont été comparés par les tests non paramétriques de Mann Withney et de Wilcoxon ou par le test de Chi<sup>2</sup>. Des relations entre deux séries appariées de réponses Ac chez les mêmes individus et vis-à-vis d'Ag différents ont été recherchées grâce au test des rangs de Spearman. Dans les cas de comparaisons multiples sur les données, la correction de Bonferroni a été appliquée et des analyses de régression multiple ont été utilisées pour l'étude des liaisons entre réponses IgG et les données hématoparasitologiques. Une différence est considérée comme significative pour une valeur de *p* inférieure à 0,05.

## Résultats

### Données épidémiologiques et biologiques de la population d'étude

Notre population d'étude était composée de 144 individus souffrant d'accès palustre simple. Globalement, l'âge moyen était de 15,1 ans (4-65 ans). La stratification des patients en deux groupes d'âge au seuil de 15 ans a montré que les malades retenus étaient majoritairement des enfants ( $\leq 15$ ans), soit 60 % ( $n = 85$  ; âge moyen =  $9,3 \pm 0,3$  ans). Les adultes âgés de plus de 15 ans représentaient 40 % de la population d'étude ( $n = 59$  ; âge moyen =  $23,4 \pm 1,3$  ans). La prédominance féminine globalement observée (60/84) a été aussi retrouvée dans les deux groupes d'âge (Tableau 1).

Des densités parasitaires allant de 0,01 à 15 % ont été notées sur l'ensemble de la population d'étude (moyenne de 2,1 % ; médiane de 1,09 %). Ces données parasitologiques ont été utilisées pour l'appariement, puis la sélection des patients constituant les deux groupes d'âge. Elles ont permis de constater l'absence de variation statistiquement significative des taux de parasites circulant entre les adultes

<b>Tableau 1</b> Caractéristiques héματο-parasitologiques de la population d'étude / <i>Haematological and parasitological characteristics of the study population.</i>				
<b>Caractéristiques</b>	<b>Total (N = 144)</b>	<b>Adultes (N = 59)</b>	<b>Enfants (N = 85)</b>	<b>p<sup>1</sup></b>
Age moyen (min - max) (ans)	15,1 (4-65)	23,4 (15-65)	9,3 (4-14)	-
Sex-ratio (H/F)	60/84	17/42	43/42	-
Densité parasitaire (moy ± ES) (Tr/μl)	33 100 ± 3503	34 008 ± 3755	31 925 ± 4056	ns
Densité parasitaire moyenne (min-max) (%)	2,1 (0,01-15)	2,2 (0,01-14)	2,1 (0,01-15)	ns
Taux d'hémoglobine moyen (min-max) (g/dl)	10,8 (4,5-16,6)	12,1 (8,0-16,6)	9,9 (6,5-15,1)	< 0,01
Taux de leucocytes moyen (min-max) (G/l)	7,3 (3,6-18,1)	8,1 (3,6-18,1)	6,9 (4,2-13,3)	ns
Taux de plaquettes moyen (min-max) (G/l)	122,7 (18-355)	119,5 (18-276)	127,4 (28-355)	ns

<sup>1</sup> : test U de Mann Whitney pour la comparaison entre adultes et enfants ; ns : non significatif ; min : valeur minimale ; max : valeur maximale ; Tr/μl : trophozoïtes par microlitre ; g/dl : gramme par décilitre ; G/l : giga par litre ; ES : erreur standard.

et les enfants, quelle que soit la méthode d'expression utilisée (2,2 % versus 2,1 % ;  $p = 0,651$  ou 34008 Tr/μl versus 31925 Tr/μl ;  $p = 0,297$ ).

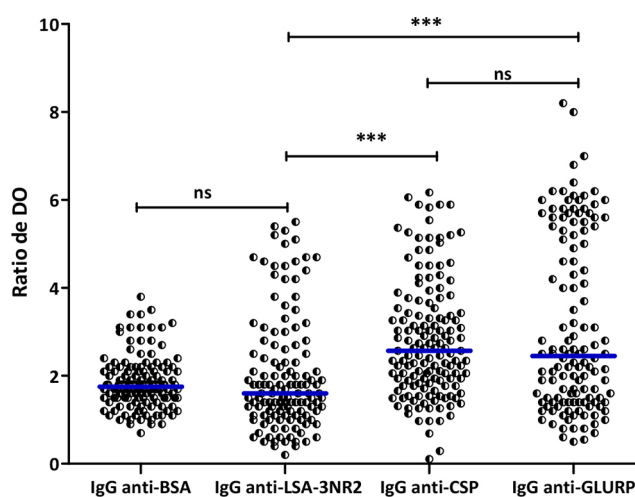
Au plan hématologique, seuls les taux d'hémoglobine sont apparus comme discriminants entre les deux groupes de patients (12,1 g/dl versus 9,9 g/dl ;  $p < 0,010$ ). Aucune variation n'a été constatée entre les deux groupes d'âge, concernant les taux de leucocytes et de plaquettes (Tableau 1).

### Comparaison des niveaux de réponses IgG entre les antigènes testés

Représentées sous forme de « Scatter plot », les amplitudes des réponses en IgG dirigées contre LSA-3NR2, CSP et GLURP ont été comparées de manière globale (Fig. 1). Les réponses obtenues avec la protéine BSA pure sont faibles. Malgré le retrait de ces réponses IgG anti-BSA, les niveaux d'Ac dirigés contre les deux protéines parasitaires CSP ( $p < 0,0001$ ) et GLURP ( $p < 0,0001$ ) sont significativement plus élevés que ceux induits par l'albumine bovine. Seul le peptide LSA-3NR2 a montré une médiane des taux d'IgG comparable à celle des IgG anti-BSA, ceci sur l'ensemble de la population d'étude ( $p = 0,420$ ). Concernant les peptides CSP et GLURP, les niveaux de réponse moyens sont similaires ( $p = 0,403$ ) et l'analyse a aussi montré que ces deux Ag sont fortement reconnus, comparés à LSA-3NR2 ( $p < 0,001$ ) (Fig. 1).

### Profils des réponses IgG suivant l'âge des patients

Une première analyse sur l'ensemble de la cohorte a montré que 69 % des patients sont des répondeurs en IgG anti-CSP. Cette prévalence des patients répondeurs a été de 62 % pour l'antigène GLURP et demeure significativement plus élevée que celle des IgG anti-LSA-3NR2 (35 %) ( $p < 0,010$ ). Un profil semblable a été retrouvé au cours des analyses sépa-



**Fig 1** Comparaison des niveaux de réponses IgG dirigées contre les antigènes testés sur l'ensemble des patients / *Comparison of total IgG levels against tested antigens in the study population*

rées dans les deux groupes de patients définis suivant l'âge : adultes ( $p < 0,010$ ) et enfants ( $p = 0,022$ ) (Tableau 2).

Pour chaque antigène testé, une analyse de la distribution suivant l'âge des réponses positives a permis de retrouver une fréquence plus importante des patients répondeurs en IgG anti-GLURP dans le groupe des adultes comparés aux enfants (80 % versus 47 % ;  $p < 0,001$ ). Pour les deux autres antigènes LSA-3NR2 et CSP, cette variation est inexistante entre les deux groupes d'âge (Tableau 2).

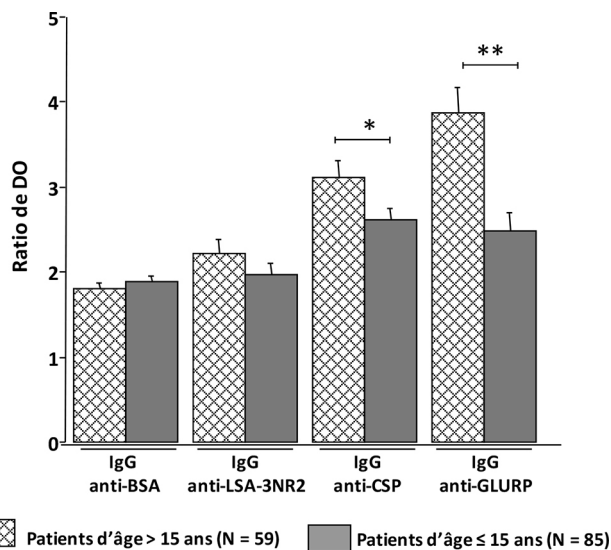
En termes d'amplitudes ou de taux d'Ac sériques, les réponses IgG dirigées contre les trois antigènes testés ont été comparées afin de retrouver une caractéristique permettant de distinguer les adultes des enfants au plan immunologique. Les niveaux moyens des réponses Ac ont été aussi résumés dans le Tableau 2.

Dans une première comparaison globale ne prenant pas en compte le caractère répondeur, le test non paramétrique de

**Tableau 2** Niveaux moyens des réponses en IgG et prévalences des répondeurs selon les classes d'âge / *IgG antibodies levels and prevalence of responders according to the age groups.*

Antigènes	Total (N <sup>1</sup> = 144) rtDO ± ES N <sup>2</sup> (% <sup>3</sup> )		Adultes (N = 59) rtDO ± ES N (%)		Enfants (N = 85) rtDO ± ES N (%)		p <sup>4</sup>
CSP	2,82 ± 0,11	100 (69)	3,12 ± 0,19	46 (77)	2,61 ± 0,13	54 (63)	0,064
LSA-3NR2	2,09 ± 0,11	51 (35)	2,24 ± 0,20	26 (44)	1,97 ± 0,13	25 (29)	0,097
GLURP	3,12 ± 0,17	89 (62)	3,88 ± 0,28	47 (80)	2,48 ± 0,21	42 (47)	< 0,001
p <sup>5</sup>	< 0,010		< 0,010		0,022		

<sup>1</sup> : nombre de patients testés ; <sup>2</sup> : nombre de patients répondeurs ; <sup>3</sup> : prévalences des patients répondeurs ; <sup>4</sup> : Test de Chi<sup>2</sup> pour comparaison des prévalences entre adultes et enfants ; <sup>5</sup> : Test de chi<sup>2</sup> pour comparaison des prévalences entre les antigènes dans chaque groupe ; ns : non significatif ; rtDO : ratio de DO moyen ; ES = erreur standard.



**Fig 2** Comparaison des niveaux de réponses IgG entre les enfants et les adultes / *Comparison of IgG levels between infants and adults groups*

Mann-Whitney a permis de retrouver des médianes de taux d'IgG plus élevées chez les adultes que chez les enfants pour CSP (2,91 versus 2,05 ;  $p = 0,021$ ) et GLURP (3,70 versus 1,90 ;  $p = 0,003$ ), l'antigène LSA-3NR2 n'étant pas concerné par ces variations (1,86 versus 1,47 ;  $p = 0,058$ ) (Fig. 2). S'agissant de la protéine contrôle BSA, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes de malades.

Dans une seconde analyse ne concernant que les patients répondeurs (adultes et enfants), la seule variation statistiquement discriminante ayant été observée, concernait les taux d'IgG anti-GLURP avec des niveaux plus forts chez les adultes répondeurs (5,74 versus 3,55 ;  $p = 0,015$ ).

### Interrelations entre les réponses Ac dirigées contre les antigènes testés

Nous avons recherché d'éventuelles relations entre les réponses IgG dirigées contre les trois antigènes étudiés,

d'abord sur l'ensemble de la population d'étude, puis de manière séparée dans les deux classes d'âge.

Globalement, des corrélations positives ont été retrouvées entre les taux d'IgG anti-CSP et d'IgG anti-LSA-3NR2 ( $\rho = 0,23$  ;  $p = 0,001$ ), entre les taux d'IgG anti-CSP et d'IgG anti-GLURP ( $\rho = 0,32$  ;  $p < 0,001$ ) et entre les taux d'IgG anti-GLURP et d'IgG anti-LSA-3NR2 ( $\rho = 0,32$  ;  $p = 0,011$ ) (Fig. 3).

Chez les enfants, il a été noté une corrélation positive modérée entre les réponses en IgG anti-GLURP et anti-LSA-3NR2 ( $\rho = 0,41$  ;  $p < 0,001$ ), cette liaison n'était cependant pas observée chez les patients adultes ( $\rho = 0,06$  ;  $p = 0,669$ ) (Fig. 3a).

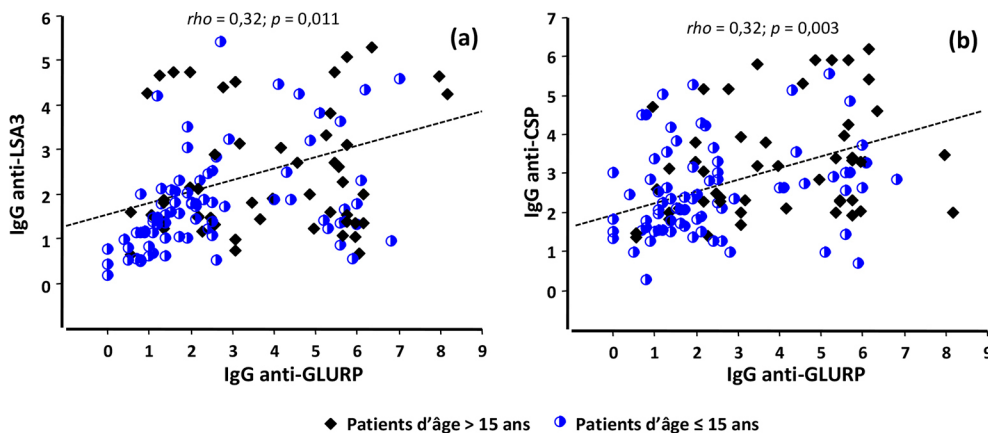
Concernant la relation entre les réponses en IgG anti-CSP et celles en IgG anti-GLURP, des tendances de corrélation positive ont été notées aussi bien chez les enfants ( $\rho = 0,25$  ;  $p = 0,019$ ) que chez les adultes ( $\rho = 0,27$  ;  $p = 0,028$ ), avec ainsi des coefficients comparables (Fig. 3b).

Suivant l'âge, les amplitudes de réponses en IgG anti-CSP étaient positivement corrélées à celles des IgG anti-LSA-3NR2 chez les adultes ( $\rho = 0,37$  ;  $p = 0,035$ ). Cette liaison n'existait pas chez les enfants ( $\rho = 0,15$  ;  $p = 0,188$ ).

### Profils des réponses IgG suivant les données hémato-parasitologiques

Afin de déceler l'impact des variations de réponses Ac sur le profil de paramètres hémato-parasitologiques comme l'hémoglobémie et les parasitémiées circulantes, nous avons comparé les niveaux d'IgG suite à une répartition des patients suivant les deux paramètres précités.

En analyse dichotomique pour les taux d'hémoglobine à partir du seuil de 11 g/dl, seules les intensités de réponses en IgG anti-GLURP étaient significativement différentes entre les deux groupes (Fig. 4a). En effet, les intensités de réponse en IgG anti-GLURP étaient plus élevées chez les patients ayant une hémoglobémie  $\geq 11$  g/dl ( $p = 0,018$ ). Suivant l'âge des patients, une variation identique a été observée



**Fig 3** Interrelations entre les réponses anticorps en fonction de l'âge / *Correlations between IgG antibodies levels according to the age groups*

aussi bien chez les adultes que chez les enfants avec des valeurs de *p* respectivement égales à 0,007 et 0,034.

Pour analyser l'effet des densités parasitaires, les patients ont été répartis en deux groupes par rapport au seuil parasitémique médian de 1 % :

- des patients avec une parasitémie ≤ 1 % (faibles) et
- des patients avec plus de 1 % de parasitémie (fortes).

Les niveaux des réponses en IgG anti-GLURP (*p* = 0,004) et anti-CSP (*p* = 0,025) étaient statistiquement différents entre ces deux nouveaux groupes de patients. Les deux antigènes ont induit des réponses Ac plus élevées chez les patients à faible parasitémie (Fig. 4b).

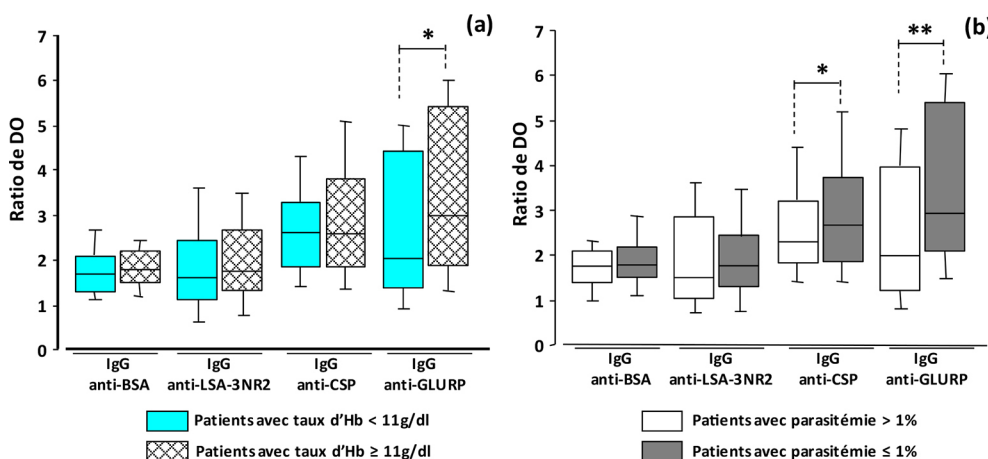
C'est seulement chez les patients adultes à parasitémie ≤ 1 %, qu'une corrélation négative entre les densités parasitaires et les taux de réponses en IgG anti-GLURP, a été observée (*rho* = -0,57 ; *p* = 0,031).

Dans une analyse de régression multiple prenant en compte à la fois des niveaux de réponses IgG dirigées contre

les trois antigènes testés, l'âge des patients ainsi que les taux d'hémoglobine constituant les variables indépendantes et les densités parasitaires comme variables dépendantes, aucun des paramètres analysés n'a montré une association avec les faibles parasitémies retrouvées au moment du recrutement.

### Discussion

La présente étude entre dans le cadre d'une série d'investigations dont le but est de permettre une meilleure approche des aspects immuno-épidémiologiques du paludisme en milieu urbain au Sénégal. L'étude a concerné des patients souffrant d'un accès palustre non aggravé et habitant à Pikine, une ville satellite de Dakar à transmission palustre hypoendémique et saisonnière [10,27]. Il s'agit d'une étude rétrospective basée sur la recherche des variations de réponses IgG dirigées contre trois peptides dérivés d'antigènes candidats vaccins contre *P. falciparum* : CSP, LSA-3NR2



**Fig 4** Variations des réponses IgG suivant le taux d'hémoglobine (a) et la parasitémie (b) / *Comparison of IgG levels according to hemoglobin (a) and parasitaemia (b)*

et GLURP. Les analyses ont pris en compte l'âge des malades, leurs taux d'hémoglobine et les densités parasitaires observées au moment du recrutement. Plusieurs travaux similaires ont été menés en zone rurale hyperendémique [8,18,20], mais leurs résultats restent encore difficilement extrapolables aux grands centres urbains où vivent plus des 40 % de la population en Afrique sub-saharienne [26]. Dans les années à venir avec les progrès espérés de la lutte, le paludisme devrait tendre vers un aspect épidémiologique « urbain » dans la région, caractérisé par une diminution globale de l'incidence de la maladie, mais aussi une augmentation relative des risques de formes graves potentiellement mortelles à tous les âges [19].

À partir d'une population précédemment décrite [15,16], nous avons effectué au hasard une sélection d'adultes et d'enfants en vue d'éviter les biais reliés aux variations des densités parasitaires liées à l'âge. Ce choix a été dicté par le fait que les précédents résultats sur la même population avaient démontré d'une part l'absence de variations des taux d'Ac dirigés contre les antigènes somatiques de *P. falciparum* (mérozoïtes et schizontes) suivant l'âge des malades et d'autre part une association entre les parasitemies circulantes [15] et les réponses Ac anti-MSP1p19 et anti-MSP3 respectivement chez les adultes et les enfants [16].

Au plan immunologique, la majorité de nos patients possède des Ac IgG anti-CSP et surtout anti-GLURP comparés à la prévalence des réponses positives anti-LSA-3NR2. Les trois Ags à partir desquels sont issus les peptides étudiés sont cependant différemment exprimés au cours du cycle parasitaire [2,7,30]. Pour le peptide LSA-3NR2, nous rapportons surtout de faibles réponses en IgG et une absence de variations suivant les parasitemies circulantes. Des données similaires ont été antérieurement décrites [1], mais elles suggèrent que les densités seraient plus affectées par des réponses Ac dirigées contre la protéine totale de LSA-3 [7]. Constituant antigénique principal du vaccin RTS-S, la CSP est considérée comme la protéine majeure des sporozoïtes dont elle empêcherait la pénétration dans les hépatocytes par induction d'Ac dits bloquants ou par une réponse cellulaire T [21]. Les prévalences de répondeurs et les taux d'IgG anti-CSP retrouvés dans cette étude restent conformes aux données rapportées en zone de transmission saisonnière au Burkina-Faso [22], au Kenya [14] et au nord du Sénégal [28]. Par contre, elles sont plus fortes que celles retrouvées en zone hyperendémique de Dielmo [1] et chez des citoyens ghanéens [9]. Cette discordance serait liée à la différence des formes antigéniques utilisées pour la CSP (NANP5 *versus* NANPn) et/ou au caractère symptomatique de l'infection à *P. falciparum* chez nos patients non prémunis. Les prélèvements sanguins ayant été réalisés au cours des accès palustres cliniques coïncidant avec la présence du parasite dans le sang, l'absence de protéines de stades hépatiques comme LSA-3 ou CSP et la présence d'antigènes comme GLURP

pourraient justifier aisément les variations en termes de prévalences et de taux d'Ac constatées entre nos antigènes. L'antigène GLURP exprimé aussi bien au niveau de stades hépatiques que sanguins et décrit comme étant très immunogène [32], est fortement reconnu dans le paludisme urbain non aggravé. Des résultats similaires ont été retrouvés en zone de transmission saisonnière par Ouédraogo et al. ayant rapporté l'existence d'une corrélation positive entre les taux IgG anti-CSP et d'IgG anti-GLURP, avec augmentation des réponses contre les deux antigènes suivant l'âge [22]. En outre, nos données relatives à GLURP corroborent celles de Doodoo et al. [8] au Ghana, d'Ambrosino et al. [1] puis de Sarr et al. [28] au Sénégal. Ces taux élevés d'IgG seraient à la base d'une protection contre le paludisme [18,20,24] et sont à la base de l'association vaccinale GLURP-MSP3 constituant le vaccin GMZ2 en cours d'évaluation [31].

Par rapport aux données hémato-parasitologiques, les résultats marquants de notre étude ont été les baisses significatives des réponses en IgG anti-GLURP chez les patients à fortes parasitemies et ceux ayant une hémoglobinémie < 11 g/dl. Une corrélation négative entre les parasitemies et les taux d'Ac anti-GLURP a été décrite en zone de forte endémicité palustre [20]. Ces différences sont plus marquées chez les adultes qui répondent plus fortement que les enfants [22,28]. La maturité du système immunitaire de l'adulte et donc son aptitude à répondre rapidement contre toute agression, fourniraient les explications à de tels constats. Toutefois, ces variations observées sont difficilement interprétables en raison de l'absence de données relatives à l'histoire de la maladie, notamment la date exacte du début de la symptomatologie palustre. En outre, un recrutement antérieur de témoins non infectés devrait permettre d'évaluer les niveaux d'anticorps anti-plasmodium résiduels chez les citoyens, surtout en l'absence de transmission.

## Conclusion

Réalisée dans un contexte de paludisme urbain, cette étude souligne l'implication des IgG anti-CSP et surtout des IgG anti-GLURP dans la réponse humorale anti-*P. falciparum*. Cependant, une simple mesure des taux d'Ac sériques dirigés contre ces antigènes candidats vaccins n'est pas suffisante comme preuve d'une protection antiparasitaire en milieu urbain comme en zone rurale. L'apport de ce travail est d'avoir contribué à déterminer des niveaux de réponses IgG pouvant servir de biomarqueurs du statut clinique dans le paludisme urbain. Néanmoins, la taille relativement faible de notre population d'étude ne permet pas une généralisation aisée des résultats obtenus. En perspective, des études complémentaires telles que la détermination des sous-classes d'IgG et l'évaluation de la fonctionnalité des Ac s'imposent sur un effectif plus conséquent.

**Remerciements** Nous remercions les patients, leurs familles, les docteurs O. Ka, A. Touré, A. Tall et M. B. Diouf pour leur contribution et leur disponibilité. Nous remercions également le personnel du Dispensaire de Sahm et 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

- Ambrosino E, Dumoulin C, Orlandi-Pradines E, et al (2010) A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malar J* 9:317
- Barry AE, Arnott A (2014) Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol* 5:359
- Bongfen SE, Ntsama PM, Offner S, et al (2009) The N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein represents a target of protective immunity. *Vaccine* 27(2):328–35
- Byrne N (2007) Urban malaria risk in sub-Saharan Africa: where is the evidence? *Travel Med Infect Dis* 5(2):135–7
- Campo JJ, Sacarlal J, Aponte JJ, et al (2014) Duration of vaccine efficacy against malaria: 5th year of follow-up in children vaccinated with RTS,S/AS02 in Mozambique. *Vaccine* 32(19):2209–16
- Coppi A, Natarajan R, Pradel G, et al (2011) The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med* 208(2):341–56
- Daubersies P, Thomas AW, Millet P, et al (2000) Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat Med* 6(11):1258–63
- 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
- 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
- Gadiaga L, Machault V, Pagès F, et al (2011) Conditions of malaria transmission in Dakar from 2007 to 2010. *Malar J* 10:312
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, et al (2005) Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol* 3(1):81–90
- Hebert A, Sauzet JP, Lebastard M, et al (2003) Analysis of intra-hepatic peptide-specific cell recruitment in mice immunised with *Plasmodium falciparum* antigens. *J Immunol Methods* 275(1-2):123–32
- Hermesen CC, Verhage DF, Telgt DS, et al (2007) Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum* in a phase I malaria vaccine trial. *Vaccine* 25(15):2930–40
- John CC, Tande AJ, Moormann AM, et al (2008) Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *J Infect Dis* 197(4):519–26
- Mbengue B, Sylla Niang M, Diatta AM, et al (2010) Analyse transversale des réponses anticorps contre les antigènes des stades sanguins asexués de *Plasmodium falciparum* en zone de paludisme urbain symptomatique non aggravé à Dakar (Sénégal). *Dakar Médical* 55(3):20–6
- Mbengue B, Sylla Niang M, Ndiaye Diallo R, et al (2015) 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. *Bull Soc Pathol Exot* 108(2):94–101
- Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, et al (2012) Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379(9814):413–31
- 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
- O'Meara WP, Mwangi TW, Williams TN, et al (2008) Relationship between exposure, clinical malaria, and age in an area of changing transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 79(2):185–91
- Ouvray C, Theisen M, Rogier C, et al (2000) Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun* 68(5):2617–20
- Olotu A, Moris P, Mwacharo J, et al (2011) Circumsporozoite-specific T cell responses in children vaccinated with RTS,S/AS01E and protection against *P falciparum* clinical malaria. *PLoS One* 6(10):e25786
- Ouedraogo AL, Roeffen W, Luty AJ, et al (2011) Naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an area of seasonal transmission. *Infect Immun* 79(12):4957–64
- 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
- Pratt-Riccio LR, Bianco C Jr, Totino PR, et al (2011) Antibodies against the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein from naturally exposed individuals living in a Brazilian malaria-endemic area can inhibit in vitro parasite growth. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(Suppl 1):34–43
- Programme National de Lutte contre le Paludisme, Dakar Sénégal (2013) Rapport 2012, p56
- 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
- Salem G, Legros F, Lefebvre-Zante E, et al (1994) Espace urbain et risque anophélien à Pikine (Sénégal). *Cahier Santé* 4:347–357
- Sarr JB, Orlandi-Pradines E, Fortin S, et al (2011) Assessment of exposure to *Plasmodium falciparum* transmission in a low endemicity area by using multiplex fluorescent microsphere-based serological assays. *Parasit Vectors* 4:212
- Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS (2012) A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J* 11:11
- Theisen M, Roeffen W, Singh SK et al (2014) A multi-stage malaria vaccine candidate targeting both transmission and asexual parasite life-cycle stages. *Vaccine* 32(22):2623–30
- Theisen M, Soe S, Brunstedt K, et al (2004) A *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine* 22(9-10):1188–98
- Theisen M, Vuust J, Gottschau A, et al (1995) Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2(1):30–4
- Vekemans J, Leach A, Cohen J (2009) Development of the RTS,S/AS malaria candidate vaccine. *Vaccine* 27(Suppl 6):G67–71
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, et al (2014) Malaria. *Lancet* 383(9918):723–35
- WHO, Geneva (2014) World Malaria report 2013, 255 pp