



## INDUCTION D'IMMUNOGLOBULINES ANTI *P. FALCIPARUM* PENDANT LE PALUDISME ET APRES REMISSION CHEZ LES ENFANTS AU BENIN

S. Judith Gbenoudon Satoguina<sup>1,2\*</sup>, Léonce Kouakanou<sup>2</sup>, Jean-Eudes Degbelo<sup>3</sup>, Joseph Deh-Tchokpon<sup>4</sup>, David Conway<sup>1</sup> and Michael Walther<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Research Council, The Gambia Unit, Fajara, The Gambia.

<sup>2</sup>Université d'Abomey Calavi, Benin, 04 BP 1221 Cadjehoun Cotonou.

<sup>3</sup>Hopital de zone d'Abomey-Calavi et <sup>4</sup>Centre médico-social de Calavi.

\*Auteur principal: email. sigbenoudon@gmail.com.

### RESUME

Le paludisme, causé par *P. falciparum* et répandu en région tropicale, est une maladie dont le contrôle requiert l'interaction de tous les éléments de notre système immunitaire. Ainsi des anticorps sont présents à tout moment chez les individus en zone endémique, sans pour autant les préserver de la maladie qui peut survenir surtout chez les enfants sous forme grave. La question est de savoir si ces anticorps sont encore inductible chez ces personnes, au quel cas, leur taux varieraient avant, pendant et après la survenue d'une crise de paludisme. Cette étude a pour objectif de déterminer la spécificité des anticorps produits face à deux candidats vaccin importants, afin de mettre évidence une induction de ces anticorps spécifiques pendant et suite à une crise du paludisme. Les taux d'expression des isotopes d'anticorps IgG ont été mesurés à partir du plasma de 125 enfants béninois pendant le paludisme et après leur rétablissement. La présence de parasite a été déterminée par microscopie et celle de l'ADN de parasites confirmé par la réaction de polymérase en chaine gigogne ou nichée (nPCR). Les résultats indiquaient que les taux d'IgG totaux diminuaient quoique faiblement après rémission. Les résultats de PCR suggéraient aussi une sensibilité de 100% pour la PCR (% d'échantillons positifs par microscopie et correctement identifiés par nPCR) et une spécificité de 77% (% d'échantillons négatifs par microscopie correctement identifiés par nPCR).

**Mots clés :** Paludisme, Anticorps anti-MSP-1<sub>19</sub>, -PfSE, PCR gigogne

### ABSTRACT

Malaria caused by *P. falciparum* is a disease, which control requires the entire immune system. Antibodies are made all time in individuals that are living in endemic areas, without evidence of their protective role, as severe disease can still occur from time to time in children. The question is whether these antibodies were inducible in case of disease in highly endemic areas. We set to evaluate the antibody induction in children during the disease and after recovery. Antibody isotypes were measured in plasma of 125 children during malaria episode. The parasitemia was determined by microscopy and parasite DNA confirmed by nested PCR. Total IgG increase slightly after recovery. Nested PCR was 100% sensitive and 77% specific.

**Keywords:** Malaria, anti-MSP-1<sub>19</sub>, -PfSE antibody, nested PCR.

### INTRODUCTION

Le paludisme, causé par *P. falciparum* et répandu en région tropicale, est une maladie dont le contrôle requiert l'interaction de tous les éléments de notre système immunitaire. Ainsi des anticorps sont quasi présents chez les individus en zone endémique, sans pour autant les préserver de la maladie qui peut survenir surtout chez les enfants sous sa forme grave. La mise au point d'un vaccin qui pourrait être appliquée en zone endémique reste donc une équation dont la résolution implique le contrôle préalable de la transmission en dessous du seuil de la prévalence qui assure une transmission permanente des parasites. Ceci devrait permettre au système immunitaire de recouvrer sa force, et de sortir de la fatigue immunitaire que témoigne la présente chez les individus en zone endémiques des

cellules T et B spéciales dites « exhausted » (Langhorne J et al, 2008).

La défense immunitaire est élaborée contre chaque étape du cycle de développement du parasite à partir de l'entrée des sporozoïtes, forme infectieuse dans l'organisme. La protéine de la surface des mérozoïtes (MSP1) fait partie des antigènes qui sont très immunogéniques et qui sont reconnus largement au sein de la population endémique (Carvalho L et al, 2002, Holder A et al, 1994). L'induction des immunoglobulines au cours du paludisme est primordiale dans le contrôle de la maladie et a été bien documentée. Cependant, la quasi présence de l'infection avait conduit à une production massive de ces derniers, probablement peu protecteurs avec des taux très élevés et une prévalence ne variant pas selon la maladie ou les saisons de transmission

(Gbenoudon et al, 2016). Chez les populations des régions où le paludisme est endémique, l'infection palustre induit de fortes réponses immunes humorales, impliquant une production à prédominance d'IgM et d'IgG mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobulines, notamment les sous classes d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

Bien que les anticorps de différents isotypes puissent avoir des fonctions protectrices, les IgG sont à cet effet, les plus performantes dans la protection antipaludique. IgG1 et IgG3 sont les isotypes d'anticorps prédominant produits en réponse aux antigènes du mérozoïte (Nebie I et al, 2008, Polley SD et al, 2006, Rzepczyk CM et al, 1997). IgG1 et IgG3 sont cytophiliques et cellules T dépendant, ont une grande affinité pour les récepteurs Fc et sont médiateurs dans l'activation des phagocytes et la fixation du complément (Bredius RG et al, 1994). Il a été suggéré que IgG3 est plus efficace dans la médiation de ces processus (Bredius RG et al, 1994). Les taux d'IgG1 sont plus élevés dans le cas de paludisme simple (Satoguina, non publié). Des taux significativement élevés d'IgG3 dans certaines populations sont associés à des épisodes de la maladie.

Toutefois, les concentrations élevées d'IgG2 pourraient aussi être associées à la diminution du risque d'infection par *P. falciparum* (Kouton M et al, 2009). Il est difficile de savoir si les individus ont une préférence pour produire une sous-classe particulière, indépendamment de l'antigène ou la réponse des sous-classes d'IgG est générée de façon indépendante pour chaque antigène et comment cela se rapporte à l'immunité protectrice. Bien que les facteurs déterminant les réponses des isotypes aux antigènes ne sont pas encore bien définis, les propriétés antigéniques, l'âge de l'hôte, l'exposition répétée et les déterminants génétiques ont été associés à la nature de la réponse des isotypes IgG (Aucan C et al, 2001 ; Bouharoun-Tayoun H et al, 1992 ; Garraud O et al, 2002 ; Ntoumi F et al, 2002).

Plusieurs années après le changement de la politique de traitement qui a conduit dans en Afrique de l'Ouest, à une réduction dramatique de l'incidence du paludisme de même que des taux de mortalité (WHO, 2015, Satoguina et al, 2009), nous nous posons la question du caractère inductible des anticorps après une crise palustre. La présente étude se propose donc de déterminer :

1) l'induction des anticorps chez les enfants en pleine crise palustre et après rétablissement des patients, 2) la nature des isotypes qui caractérisent cette réponse.

## MATERIEL ET METHODES

### **Site d'étude et collection des échantillons**

Cette étude s'est déroulée à Cotonou et à Abomey-Calavi, de Septembre à Décembre 2010, sur des sujets reçus en consultation dans les hôpitaux suivants, hôpital de zone d'Abomey-calavi (Abomey-Calavi) et Centre médico-social Santé pour tous « Djidjoho » (Cotonou). Les deux sites sont distants de 20 km. Le recrutement des sujets, la collecte d'échantillons de sang et les examens hématologiques se sont déroulés aux laboratoires d'analyses des hôpitaux respectifs.

Tous les prélèvements de sang sont ensuite traités au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM) et au Laboratoire de Cytologie, ISBA, Cotonou. L'analyse des isotypes d'anticorps IgG, et la détection des gènes de parasite se sont réalisées dans les laboratoires de « Medical Research Council Laboratories (MRC) » en Gambie. La population d'étude est essentiellement constituée d'enfants, âgés de 2 à 14 ans, reçus en consultation à l'hôpital et à qui un examen de goutte épaisse (GE) a été demandé. Au total 125 enfants ont été recrutés pour cette étude.

Le recrutement des patients enfants a eu lieu après explication de l'étude et obtention libre de la signature du formulaire de consentement éclairé des guides ou parents des patients. Les signatures des formulaires sont faites par les adultes accompagnants. Cette étude a été présentée au Comité Nationale Provisoire d'Ethique en Recherche de la Santé du Bénin. Tout enfant béninois ou vivant sur le territoire béninois depuis au moins un an de façon continue et âgé de 2 à 14 ans, soupçonné d'avoir le paludisme était éligible.

Un échantillon de 7 ml de sang a été prélevé dont une partie a été transférée dans un tube EDTA pour l'isolement de plasma, d'ADN parasitaire et pour le marquage cellulaire ; le reste dans les tubes Paxgene™ de collection de sang pour l'isolement d'ARN. Les dernières gouttes ont servi à réaliser deux lames de goutte épaisse pour la confirmation du diagnostic et la détermination de la densité parasitaire. Un deuxième prélèvement a eu lieu 28 jours après le premier et a porté sur 56 enfants des 125 reçus au jour 0.

**Détection des anticorps :** Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) a été utilisée pour détecter les isotypes d'anticorps IgG totaux et IgG2, IgG3 et IgG4 dans les plasmas avec les antigènes recombinants MSP-1<sub>19</sub> et l'extrait total

du parasite *P. falciparum*, PfSE selon la méthode utilisée par Satoguina et al, 2009. Tous les tests effectués avec chaque échantillon de plasma sont testés dans les puits en duplicata et c'est la valeur moyenne qui est utilisée. Les densités optiques lues ont été corrigées en soustrayant la valeur de DO lue pour la réactivité des anticorps anti-GST pour MSP-1<sub>19</sub> qui a une fusion avec GST. Les réactivités des anticorps de 18 individus contrôle négatif (touristes européens en Gambie), ont été également mesurées. Les valeurs de DO corrigées ont été normalisées par rapport à une valeur de DO lue pour le standard (Brefet pool), et utilisées pour l'analyse des données.

**Extraction d'ADN et nested PCR (nPCR) :**

L'ADN a été extrait à partir du sang total en utilisant le Xtractor Gene™ Robot (Corbett Research Pty Ltd, Australia) en accordance

avec le protocole du fabricant. La nested PCR (nPCR) est une méthode d'amplification en deux paliers, proposée par Snounou en 1993 (Snounou G, 1993). Le schéma d'amplification employé ainsi que les séquences des oligonucléotides utilisés, qui sont basées sur les gènes *ssrRNA* (McCutchan TF et al, 1988 ; Waters AP et al, 1989), sont détaillés dans les tableaux 1.1 et 1.2.

Deux primers rPLU5 et rPLU6 sont utilisées pour le premier cycle d'amplification (Nest 1). 1µl du produit obtenu de cette amplification est utilisé dans un deuxième cycle d'amplification (Nest 2) avec comme primers spécifiques au gène de *P. falciparum*, Plasmol1 et Plasmol2.

Comme contrôle positif et contrôle négatif nous avons utilisé respectivement l'ADN de parasite et l'eau de PCR, inclus dans chaque PCR.

**Tableau 1: PCR mix**

Composantes	Nest 1		Nest 2	
	Volume	Concentration finale	Volume	Concentration finale
PCR H <sub>2</sub> O	9,88 µl		11,18 µl	
MgCl <sub>2</sub> (Thermopol)	1,5 µl	1X	1,5 µl	1X
rPLU5	0,6 µl	0,4µM		
rPLU6	0,6 µl	0,4µM		
Plasmol 1			0,45 µl	0,4µM
Plasmol 2			0,45 µl	0,4µM
dNTPs	0,3 µl	0,2mM ea*	0,3 µl	0,2mM ea
Taq	0,12 µl	0,04 U/µl	0,12 µl	0,04 U/µl
ADN	2 µl		1 µl de nest1	
<b>Total</b>	15 µl		15 µl	

\*chaque dNTP

La PCR a été réalisé dans le thermocycleur DNA Engine, PTC-200 (MJ Research) suivant le profil thermique présent dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Séquences des primers et conditions de PCR**

Primers	Séquence (5'→3')	Conditions de PCR
rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	94°C pour 3 min; suivi par 30 cycles de 94°C pour 30 s, 58°C pour 30s et 72°C pour 90 s; suivi par 72°C pour 5 min
rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	
Plasmo 1	GTAAAGGGAGTGAAGACGAT	94°C pour 3 min; suivi par 35 cycles de 94°C pour 30 s, 58°C pour 30s et 72°C pour 90 s; suivi par 72°C pour 5 min
Plasmo 2	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA	

□

### Analyses statistiques

Les données d'ELISA sont traitées avec les logiciels *Revelation Quick® Link* et *Ascent* du lecteur de microplaques pour le calcul des densités optiques et des concentrations par puits à l'aide du standard. Les données ont été ensuite entrées dans un classeur Microsoft Excel 97-2003 pour être analysées par le logiciel GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### RESULTATS

Les caractéristiques cliniques des participants à l'étude sont résumées dans le tableau 3 suivant. Des 125 enfants de 2-13 ans, recrutés au jour 0, 56 sont revenus en consultation au jour 28.

**Tableau 3 : Caractéristiques de la population d'étude**

	Nombre		Age, mean±SD (min-max)	Taux d'hémoglobine mean±SD	
	Jour 0	Jour 28		Jour 0	Jour 28
HAC*	100	45	6,5 ± 3,3 (2-13)		
CMS**	25	11	6,2 ± 3,0 (2-13)		
Total	125	56	6,4 ± 3,3 (2-13)		
Goutte épaisse positive	55	2		9,9± 1,8	10,3 ±0,4
Goutte épaisse négative	70	54		10,8 ± 1,3	11,2 ±1,1

□

\*Hôpital de zone d'Abomey-calavi, \*\*Centre médico-social Santé pour tous

### Détection de *Plasmodium falciparum* dans la population d'étude par la technique de PCR gigogne ou nPCR à partir du sang total

Nous avons réalisé une PCR gigogne à partir du sang total sur tous les échantillons, ce qui nous a permis de confronter ces résultats à ceux obtenus en microscopie sur les mêmes échantillons.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4. Au J0, la prévalence de parasites déterminée par microscopie est de 44% (55 des 125 lames de GE lues) contre 57% (71 des 125) par nPCR. Au jour 28, la prévalence de parasites déterminée par microscopie est de 4% (2 des 56) contre 12% (7 des 56) par nPCR (résultats non montrés).

Ces résultats suggèrent que la nPCR, réalisée à partir du sang total, a une sensibilité de 100% (c'est-à-dire le pourcentage d'échantillons positifs par microscopie correctement identifiés par nPCR) et une spécificité de 77% (c'est-à-dire le pourcentage d'échantillons négatifs par microscopie correctement identifiés par nPCR).

**Tableau 4: Tableau de contingence des résultats de microscopie et de nPCR des sujets au Jour 0**

Nested PCR	Microscopie		Total (N = 125)
	Positive (n = 55)	Négative (n= 70)	
<b>Positive</b>	55 (100%)	16 (23%)	71
<b>Négative</b>	0	54 (77%)	54

GE+ : goutte épaisse positive ; GE - : goutte épaisse négative ; J0 : jour 0 ; J28 : jour 28

**Mesure par ELISA indirect des taux (DO) des isotypes d'anticorps IgG face à deux antigènes de *P. falciparum* dans les plasmas des patients, à l'enrôlement et au 28<sup>ème</sup> jour.**

La proportion d'individus ayant un taux d'anticorps supérieur au seuil de positivité, sans distinction d'individus ayant une GE positive ou négative, suivant les deux dates est indiquée dans le tableau 5 ci-dessous. Le seuil de positivité était égal à la moyenne arithmétique + 2 fois l'écart-type (moy+2SD) de la réactivité mesurée (en densité optique) des 18 plasmas contrôles.

Les taux des différents isotypes d'anticorps mesurés variaient selon les antigènes (tableau 5). La prévalence d'IgG est plus élevée pour PfSE (42,4% et 53,6%) que pour MSP-1<sub>19</sub> (22,4% et 28,5%). Par contre le nombre d'individus ayant IgG2, IgG3 et IgG4 est plus élevé pour MSP-1<sub>19</sub> que pour PfSE.

**Tableau 5: Proportion d'individus ayant un taux d'anticorps spécifiques aux antigènes**

	MSP-1 <sub>19</sub>		PfSE	
	Jour 0 (N=125)	Jour 28 (N =56)	Jour 0 (N =125)	Jour 28 (N =56)
<b>IgG*</b>	28 (22,4%)	16 (28,5%)	53 (42,4%)	30 (53,6%)
<b>IgG2*</b>	76 (60,8%)	40 (71,4%)	1 (0,8%)	2 (3,6%)
<b>IgG3*</b>	47 (37,6%)	13 (23,2%)	18 (14,4%)	4 (7,1%)
<b>IgG4</b>	61 (48,8%)	25 (44,6%)	13 (10,4%)	12 (21,4%)

N. nombre d'individus

\*Pour MSP-1<sub>19</sub>, le seuil de séropositivité calculée pour les isotypes IgG, IgG2 et IgG3 ayant une valeur négative, 0 est pris comme valeur seuil de positivité.

La deuxième partie de notre analyse s'est focalisée sur les 56 sujets, qui sont revenus au 28<sup>ème</sup> jour. Ainsi sur ces derniers nous avons distingué 2 groupes à l'enrôlement, le groupe de ceux qui ont une goutte épaisse négative (n=25) et celui ayant une goutte épaisse positive (n=31). Nous avons comparé les réponses anticorps de chacun des groupes selon les 2 antigènes en suivant le modèle J0-J28.

**Expression des isotypes selon deux antigènes recombinants du Pf chez les patients GE positive et GE négative**

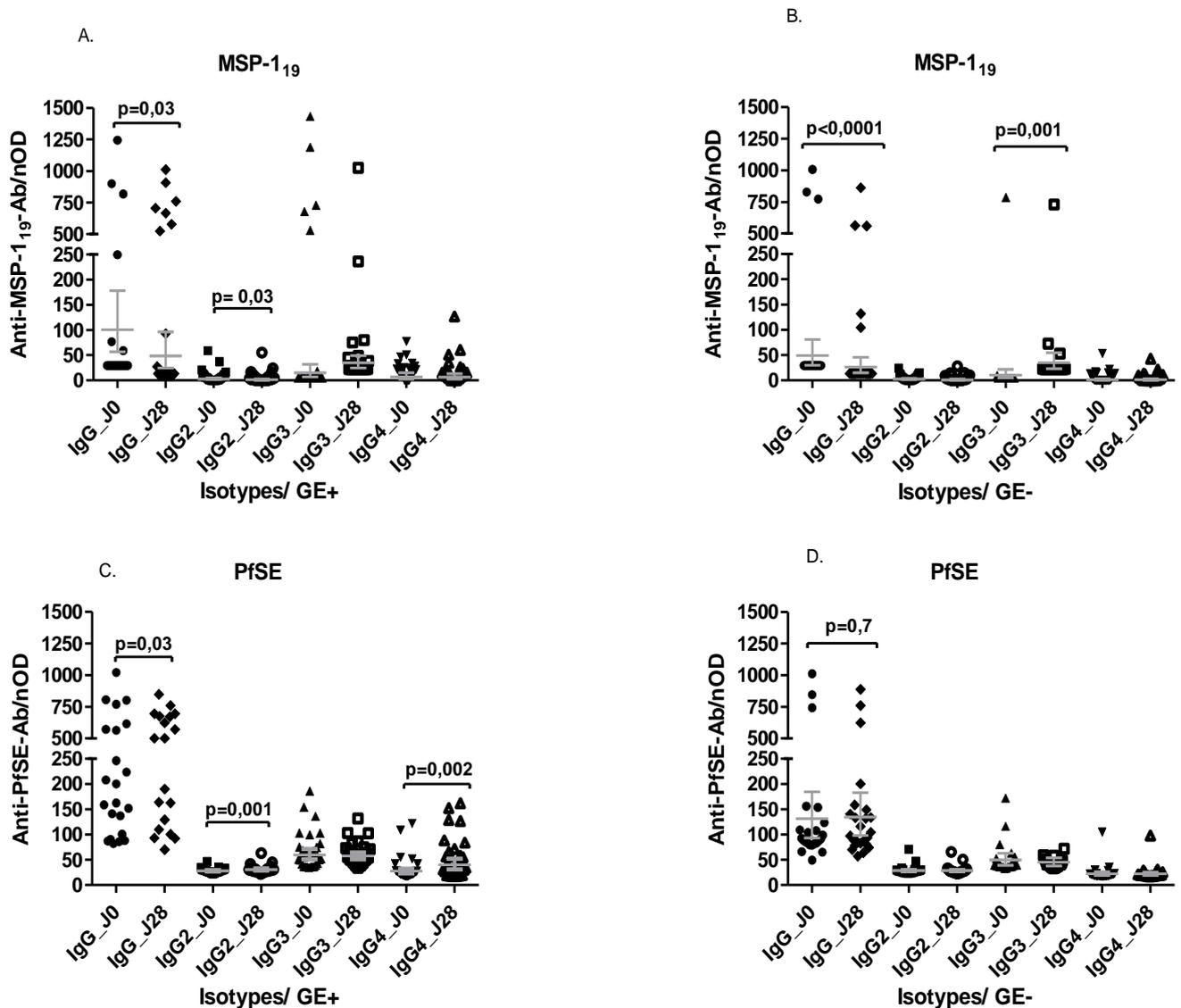
Sur la figure 1, on remarque que l'antigène MSP-1<sub>19</sub> révèlent en prépondérance les isotypes IgG et IgG3 quelque soit le groupe (Figure 1.A et B). Cette réponse est plus élevée chez les patients GE+ (Figure 1.A) que chez les patients GE- (Figure 1.B). L'antigène PfSE révèle en prépondérance, en plus de IgG et IgG3, l'isotype IgG4 (Figure 1.C et D). Les taux d'anticorps sont en général plus faibles chez les patients ayant une GE négative (Figure 1.D) que chez ceux ayant une GE + (Figure 1.C).

**Comparaison des réponses des isotypes d'anticorps entre Jour 0 et Jour 28**

Sur les figures 6. A, B et C, nous voyons que les patients secrètent légèrement plus d'IgG totaux spécifique à MSP-1<sub>19</sub> et PfSE au jour 0 comparativement au jour 28 (p=0,03et p<0.0001 pour MSP-1<sub>19</sub> et p=0,03 pour

PfSE). Les figures 6.A et C montrent une induction de l'isotype IgG3 spécifique aux deux antigènes au jour 0. Cette induction est maintenue voir augmentée au jour 28.

En résumé, on constate une forte induction des IgG totaux et IgG3 pendant la phase aiguë de la maladie. Ce taux baisse légèrement pour les IgG totaux et est maintenu pour l'isotype IgG3, 28 jours après rétablissement des patients.



**Figure 1: Taux (DO) des isotypes d'anticorps anti- PFSE et MSP1/19.**

Plasmas de patients ayant une goutte épaisse positive, A. et C., (n = 31) et de patients ayant une goutte épaisse négative, B. et D., (n = 25), suivant J0 et J28.

Chaque point sur la figure représente un patient.

Les différences statistiques sont détectées avec le texte non paramétrique de Wilcoxon's matched-pairs test et sont indiquées sur les graphiques.

Les différences sont considérées comme significatives avec  $p < 0,05$ .

## DISCUSSION

Dès l'introduction du parasite dans le sang, il y a production des anticorps contre ses différents antigènes pour son élimination. Cette production

est spécifique. Toutefois les isotypes d'anticorps IgG1 et IgG3 sont les anticorps prédominant induits à l'encontre des antigènes de *P. falciparum*. Ces anticorps, à activité cytophilique, sont

fortement associés à la protection (Lusingu JP et al, 2005 ; Doodoo DA et al, 2008 ; Aubouy A et al, 2007). Nos résultats montrent que les IgG totaux et l'isotype IgG3 sont les anticorps les plus abondants secrétés en réponse aux antigènes recombinants testés (figure 6).

Vue la forte corrélation, entre les réponses des IgG totaux et de l'isotype IgG1 face à MSP-1<sub>19</sub>, démontrée récemment (Stanisic DI et al, 2009), nous pouvons dire que la forte induction d'IgG totaux, observée dans cette étude, serait due à IgG1.

Dans le but de voir l'évolution de la réponse anticorps pendant la phase aiguë de la maladie et après rétablissement, nous avons effectué une mesure des mêmes anticorps chez les mêmes patients au jour 28.

Nos résultats montrent que l'induction des IgG totaux face à l'antigène MSP-1<sub>19</sub> diminue faiblement après rémission (figure 6. A ; p= 0,03). Ce constat est pareil pour l'isotype IgG3 quand bien même aucune différence statistiquement significative n'est observée. ce résultat est contraire à celui obtenu sur des enfants kényans ayant le paludisme symptomatique où il est montré une baisse de 50% de la réponse anticorps IgG1 et IgG3 contre les mêmes antigènes recombinants utilisés ici en moins de dix jours (Kinyanjui SM et al 2007). Mais nos résultats vont dans le même sens que ceux d'une autre étude qui a montré que les réponses des isotypes d'anticorps face aux antigènes diminuent faiblement chez les enfants gambiens âgés de plus de cinq ans (Akpogheneta O et al, 2007), la moyenne d'âge de notre population d'étude étant  $6,4 \pm 3,3$ .

## RÉFÉRENCES

- Onome J. Akpogheneta NOD, Kevin K. A. Tetteh, Samuel Dunyo., David E. Lanar MP, and David J. Conway: Duration of Naturally Acquired Antibody Responses to Blood-Stage Plasmodium falciparum Is Age Dependent and Antigen Specific. INFECTION AND IMMUNITY 2007, 76(4):1748-1755.
- Aubouy A, Migot-Nabas F, Deloron P.: Correlations between treatment outcome and both anti-MSP119 antibody response and erythrocyte-related genetic factors in Plasmodium falciparum malaria. Infect Genet Evol 2007, 7:147-154.
- Aucan C, Y. Traore, F. Fumoux, and P. Rihet: Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to Plasmodium falciparum antigens in Burkina Faso. Infect Immun 2001, 69:996-1001.
- Bouharoun-Tayoun H, and P. Druilhe.: Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. Infect Immun 1992, 60:1473-1481.
- Bredius RG, C. A. Fijen, M. De Haas, E. J. Kuijper, R. S. Weening, J. G. Van de Winkel, and T. A. Out: Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1-and IgG3-opsonised bacteria and erythrocytes. Immunology 1994, 83:624-630.
- Carvalho L. J. M. D-RCT, and Goto H.: Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects. Scand J Immunol 2002, 56:327-343.

En effet, les cellules plasmatisques responsables de la production d'anticorps peuvent avoir une courte durée comme une longue durée de vie. Les cellules plasmatisques à courte durée de vie ont besoin d'être reconstituées par les cellules B mémoires alors que celles à longue durée de vie survivent et secrètent des anticorps par un mécanisme indépendant (Slifka MK et al, 1998 ; Manz RA et al, 2005).

Ainsi, à partir de nos résultats, nous pouvons dire que la longévité de la réponse anticorps en l'absence d'une réinfection dépend des cellules plasmatisques à longue durée de vie.

## CONCLUSION

Le paludisme reste endémique. Cependant les mesures de contrôle commencent à montrer des résultats positifs qui font croire à une possibilité de vaccin antipaludique. Pour ce faire, les mécanismes de réponse immune spécifique au contexte de paludisme endémique doivent être encore élucidés. D'où cette étude dont les résultats ont démontré, en accord avec d'autres études, que la réponse humorale face au paludisme est sélective. Ainsi les isotypes IgG1 et IgG3 sont les anticorps les plus abondants à l'encontre des antigènes recombinants du *Plasmodium falciparum*.

## Remerciements

Nous remercions sincèrement les enfants qui ont permis la réalisation de la présente étude, les techniciens et les médecins de l'hôpital de zone d'Abomey Calavi et du Centre Médico Social Santé pour tous de Calavi, en particulier, Luc Yêdonou, Dr Inès Dossou-Dagba et Dr Hountondji, Nadine Fievet et l'équipe de l'IRD du laboratoire CERPAGE de l'IRD à la FSS, pour l'accès aux équipements. Nous remercions également Simon Correa du Medical Research Council en Gambie pour leur assistance technique.

- Cavanagh DR EI, Roper C, et al: A longitudinal study of type-specific antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J Immunol* 1998, 161:347-359.
- Doodoo D AA, Kusi KA, et al.: Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malar J* 2008, 7:142.
- Garraud O, R. Perraut, A. Diouf, W. S. Nambei, A. Tall, A. Spiegel, S. Longacre, D. C. Kaslow, H. Jouin, D. Mattei, G. M. Engler, T. B. Nutman, E. M. Riley, and O. Mercereau-Puijalon.: Regulation of antigen-specific immunoglobulin G subclasses in response to conserved and polymorphic Plasmodium falciparum antigens in an in vitro model. *Infect Immun* 2002, 70:2820-2827.
- Holder AA BM: What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite? *Parasitol Today* 1994(10):182-184.
- Kinyanjui SM, D. J. Conway, D. E. Lanar, and K. Marsh: IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J* 2007, 6:82.
- Kouton M. : Etude des bio-marqueurs influençant la réponse cellulaire et humorale aux antigènes du Plasmodium falciparum (Welch 1897). diplôme d'ingénieur des travaux en analyses médicales et biologiques. Lome: Université de Lome (Togo); 2009.
- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K: Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008, 9(7):725-732.
- Lusingu JP VL, Alifrangis M, et al.: Cytophilic antibodies to Plasmodium falciparum glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. *Malar J* 2005, 4:45.
- Manz RA, A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch: Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005, 23:367-386.
- McCutchan TF, de la Cruz VF, Lal AA, Gunderson JH, Elwood HJ, Sogin ML: Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology* 1988, 28(1):63-68.
- Nebie I, A. Diarra, A. Ouedraogo, I. Soulama, E. Bougouma, A. Tiono, A. Konate, R. Chilengi, M. Theisen, D. Doodoo, E. Remarque, S. Bosomprah, P. Milligan, and S. Sirima.: 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* 2008, 76:759-766.
- Ntoumi F, M. Ekala, M. Makuwa, F. Lekoulou, O. Mercereau-Puijalon, and P. Deloron: Sick cell trait carriage: imbalanced distribution of IgG subclass antibodies reactive to Plasmodium falciparum family-specific MSP2 peptides in serum samples from Gabonese children. *Immunol Lett* 2002, 84:9-16.
- Polley S, D. Conway, D. Cavanagh, J. McBride, B. Lowe, T. Williams, T. Mwangi, and K. Marsh: High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of Plasmodium falciparum are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine* 2006, 24:4233-4246.
- Rzepczyk CM, K. Hale, N. Woodroffe, A. Bobogare, P. Csurhes, A. Ishii, and A. Ferrante: Humoral immune responses of Solomon Islanders to the merozoite surface antigen 2 of Plasmodium falciparum show pronounced skewing towards antibodies of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun* 1997, 65:1098-1100.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology* 1993, 61(2):315-320.
- Satoguina JS, Weyand, E., Larbi, J. and Hoerauf, A: T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 2005, 15:4718-4726.
- Slifka MK, R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed.: Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 1998, 8:363-372.
- Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, Gilson PR, Murphy VJ, Anders RF, Mueller I et al: Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun* 2009, 77(3):1165-1174.
- Waters AP, McCutchan TF: Partial sequence of the asexually expressed SU rRNA gene of Plasmodium vivax. *Nucleic Acids Res* 1989, 17(5):2135.