

Relation entre magnésium érythrocytaire et taux d'anticorps sériques après vaccination antigrippe chez l'homme*)**)

De J. G. Henrotte⁺), C. Hannoun⁺⁺) et J. Dausset⁺⁺⁺)

RCP Magnésium et Oligo-éléments, CNRS, Faculté de Pharmacie 75006 Paris⁺, Unité d'Ecologie virale, Institut Pasteur, 75274 Paris⁺⁺ et Unité INSERM U 93, Hôpital Saint Louis, 75010 Paris⁺⁺⁺.

Zusammenfassung

78 Personen aus 16 Familien erhielten eine Gripeschutzimpfung. Es wurden die entsprechenden SA sowie MgE und Serum-Mg vor und nach der Impfung gemessen. Das Blut-Mg war nach der Impfung nicht verändert. Andererseits zeigten Personen mit SA-Anstieg für alle drei verwendeten Stämme niedrigere MgE-Gehalte im Vergleich zu den anderen Probanden ($p < 0,005$). Bei den entsprechenden Personen waren die SA-Titer um so höher, je niedriger das MgE war. Dieses Phänomen wurde innerhalb jeder Familie beobachtet. Die Rolle des Mg bei Immunprozessen wird diskutiert.

Summary

Anti-influenza vaccination was administered to 78 subjects belonging to 16 families. The antibody (Ab) levels corresponding to the 3 strains of the vaccine and the red blood cell (RBC) and plasma Mg concentrations were determined before and after vaccination. Blood Mg level does not vary after vaccination. On the other hand, subjects showing an Ab increase for the 3 strains (positive) exhibit RBC Mg values lower than those of the other subjects ($P < 0,005$). Among positive subjects, the Ab level is the highest when the RBC Mg is the lowest. Within each family, the same phenomenon is observed. The role of Mg in immune response is discussed.

Résumé

Un vaccin antigrippe a été administré à 78 sujets appartenant à 16 familles. Les taux d'Ac correspondant aux 3 souches du vaccin et les concentrations du Mg E et du Mg plasmatique ont été déterminés avant et après vaccination. La magnésémie ne varie pas sous l'effet de la vaccination. En revanche, les sujets réagissant aux 3 souches par une augmentation d'Ac (positifs) présentent des valeurs de Mg E inférieures à celles des autres sujets ($P < 0,005$). Leur taux d'Ac est d'autant plus élevé que leur Mg E est plus bas. A l'intérieur de chaque famille, le même phénomène est observé. Le rôle du Mg dans l'intensité de la réponse immune est discuté.

L'intensité de la réponse immune à une stimulation antigénique est contrôlée, chez la souris, par le Complexe Majeur d'histocompatibilité (CMH). Chez l'homme, il en est vraisemblablement de même, bien qu'aucune démonstration

claire n'en ait été faite jusqu'ici. D'autre part, le métabolisme magnésique qui joue un rôle fondamental dans de nombreux processus immunitaires [8, 18], présente lui aussi des relations avec le CMH: les concentrations du Mg érythrocytaire varient en effet en fonction des groupes HLA chez l'homme [9, 10, 11, 12] et des groupes H-2 chez la souris [14]. L'ensemble de ces observations nous ont donc incités à étudier de plus près les relations entre ces trois variables: réponse immune, CMH et magnésium chez l'homme. Dans ce but, nous avons soumis des donneurs de sang volontaires sains de groupe HLA connus à une vaccination anti-grippe et déterminé les titres sériques d'anticorps (Ac) et les concentrations en Mg érythrocytaire (Mg E) et plasmatique (Mg P), en Zn érythrocytaire (Zn E) et en Ca plasmatique (Ca P) avant et 30 jours après vaccination. Dans cette note préliminaire, nous nous limiterons à l'étude des relations entre titres d'Ac et dosages minéraux. Quant aux associations de ces variables avec les groupes HLA, elles feront l'objet d'un autre travail.

Populations et méthodes

46 couples de pères et mères des familles, ont été soumis à un examen préliminaire au cours duquel étaient déterminés les titres d'Ac antigrippe et les dosages minéraux. A partir de ces résultats 16 couples et leurs enfants, soit au total 78 sujets, ont été sélectionnés pour subir la vaccination antigrippe, le choix ayant porté principalement sur les couples de parents dont l'un au moins présentait un taux d'Ac nul afin de permettre l'étude éventuelle de la transmission d'un caractère lié à la non production d'Ac. Tous les sujets étaient des donneurs de sang, volontaires sains, du Laboratoire d'Immuno-hématologie de l'Hôpital Saint Louis, 75010 Paris. Les titres d'Ac et les dosages minéraux étaient à nouveau déterminés avant et 30 jours après vaccination.

*) avec la collaboration technique de A. Benech, G. Franck-Riquier, M. Pineau et J. Roullier.

**) Résultats présentés au 3^e International Symposium sur le Magnésium, Baden-Baden, 22.—28. 8. 1981.

Les dosages de Mg, Zn et Ca ont été faits par spectrophotométrie d'absorption atomique selon le procédé conseillé par *Rousselet* [19]. Les titres sériques d'Ac étaient déterminés par la méthode d'inhibition de l'hémagglutination pour les 3 souches contenues dans le vaccin (A/URSS/80/77, A/Texas/77, B/Hong-Kong/73). Pour faciliter le traitement statistique des résultats l'échelle suivante a été adoptée pour les titres d'Ac: 0 = <10, 1 = 10, 2 = 20, 3 = 40, 4 = 80, 5 = 160 etc. On considère qu'une différence de titre de 2 dilutions (4 fois) est significative avec cette méthode.

La signification statistique des différences entre moyennes des groupes a été déterminée par le calcul du *t* de Student. Les distributions des valeurs ont été comparées au moyen du test de Kolmogorov-Smirnov (K. S.).

Résultats

1. — Dosages minéraux

Les teneurs en minéraux du plasma et des érythrocytes se situent dans les limites habituelles de la normalité [5, 16] chez tous les sujets examinés sauf chez ceux appartenant à la famille X. Cette famille présente en effet plusieurs anomalies: le taux moyen du Mg E des 6 personnes qui la composent, est nettement supérieur (58.2 ± 6.8 mg/l) à celui des autres familles (50.4 ± 4.7 mg/l pour l'ensemble des 72 autres sujets), la différence étant significative à $P < 0.001$. De plus, 4 de ses membres révèlent des valeurs de Ca P inférieures à 90 mg/L alors que des valeurs aussi basses ne sont observées que chez 5 autres sujets répartis dans les 15 familles restantes. En conséquence, les valeurs de la famille X ont été exclues des analyses statistiques suivantes. Nous en tiendrons cependant compte dans la discussion des résultats.

Aucune modification significative des Mg E, Mg P, Zn E et Ca P n'est observée sous l'influence de la vaccination. Les analyses statistiques suivantes ont donc été faites à partir de la valeur du premier prélèvement.

2. — Titres d'anticorps

Les sujets ont été divisés en 4 groupes en fonction des titres d'Ac déterminés avant et 30 jours après vaccination:

— les «réfractaires» (R) dont les taux d'Ac avant et après vaccination sont nuls ou négligeables

(<10); ce sont donc des individus qui se caractérisent par une incapacité de production d'Ac contre l'antigène administré;

- les «négatifs» (–) dont les titres d'Ac avant vaccination ne sont pas nuls mais n'augmentent pas significativement sous l'effet du vaccin; il s'agit donc de sujets capables de produire des Ac mais qui ne réagissent pas à la stimulation produite par l'administration du vaccin;
- les «positifs» (+) qui réagissent au vaccin par une augmentation du titre d'Ac; parmi ceux-ci, nous avons distingués deux groupes, les «positifs faibles» dont le taux d'Ac après vaccination ne dépasse pas 1/80ème et est comparable à celui des «négatifs» et les «positifs forts» dont le taux final est supérieur. Cette classification a été faite pour chacun des 3 types d'Ac titrés, correspondant aux 3 souches contenues dans le vaccin. La répartition des sujets selon cette classification est donnée dans la fig. 1.

3. — Relation entre Mg E et titres d'Ac

Aucune relation significative entre Mg P, Zn E, Ca P et les titres d'Ac avant et après vaccination n'a pu être mise en évidence. De même, le taux du Mg E ne varie pas sensiblement en fonction du titre d'Ac avant vaccination. Nous ne décrivons donc dans la présente note que les relations observées entre le Mg E et la réaction des sujets à la vaccination.

3.1 Réactions à chacune des 3 souches du vaccin

Les variations du taux du Mg E en fonction du titre d'Ac après vaccination et de la réaction +, – ou R à l'administration du vaccin sont indiquées dans la fig. 1. L'ensemble des sujets positifs révèlent des valeurs de Mg E significativement plus faibles que celles des sujets négatifs. Cette différence semble due à deux phénomènes distincts: d'une part, pour un même titre d'anticorps atteint après vaccination, le Mg E varie selon la réaction + ou – des individus comme le montre la comparaison des négatifs et des positifs faibles; d'autre part, chez les positifs, un taux de Mg E plus bas est associé à un titre d'Ac plus élevé comme l'indique la comparaison des positifs faibles et des positifs forts. Les résultats sont similaires pour les 3 souches mais significa-

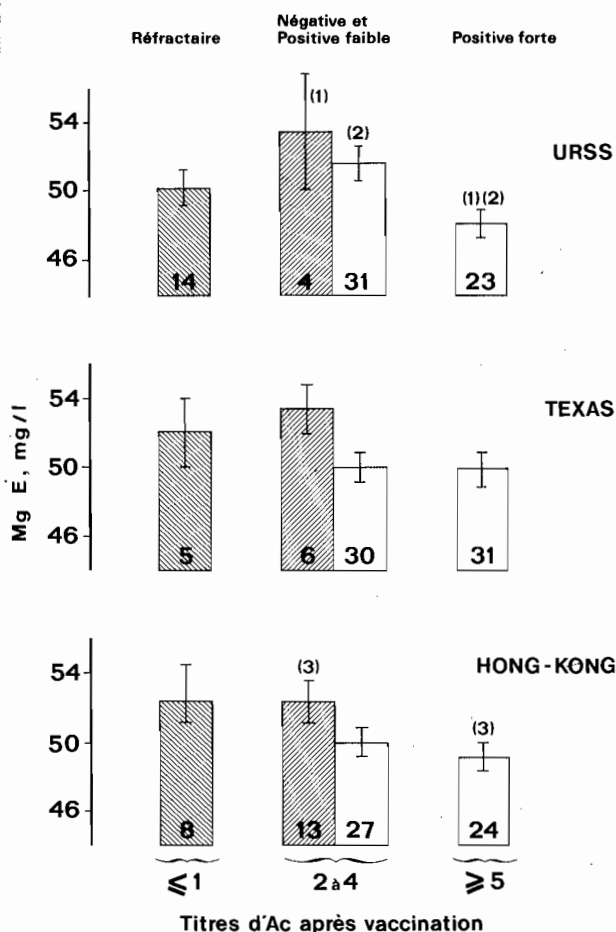


Fig. 1: Moyennes et erreurs-standards des concentrations du Mg E en fonction du titre sérique d'anticorps antigrippe déterminé après vaccination. Les valeurs du Mg E sont groupées selon la réaction réfractaire (à gauche), négative (au centre, hachuré), positive faible (au centre, blanc) ou positive forte (à droite) des sujets à la vaccination et selon le type d'anticorps déterminé: antisouche URSS (en haut), Texas (au centre), Hong-Kong (en bas). Effectifs des groupes à la base des colonnes. Signification statistique des différences de Mg E entre groupes comparés 2 à 2 : (1) (3) = $P < 0,05$, (2) = $P < 0,005$. L'ensemble des valeurs «Hong-Kong positives» est également différent des «Hong-Kong négatives» à $P < 0,05$ et de l'ensemble des «Hong-Kong négatives» et «réfractaires» cumulées à $P < 0,025$.

tifs seulement pour les titres d'Ac anti-URSS et anti-Hong-Kong. Les réfractaires présentent des valeurs intermédiaires entre celles des positifs et des négatifs.

3.2. Réactions combinées aux 3 souches du vaccin

Chaque individu examiné est donc caractérisé par 3 réactions vaccinales, une pour chacune des 3 souches du vaccin mais par une seule valeur du Mg E. Il n'est dès lors pas possible, sous peine d'introduire une redondance, d'ajouter les résultats de la fig. 1 obtenus pour chacune des

souches. En revanche, les individus peuvent être classés en fonction de leur réaction aux trois souches à la fois. Sur un total de 72 sujets, 68 (soit 94,4 %) présentent une réaction + pour au moins une des 3 souches du vaccin. Le tableau 1 en indique la répartition. Parmi ceux-ci, 37 individus (soit 51,4 % du total) révèlent une réaction + pour chacune des souches (+ + +), leur Mg E moyen est significativement plus faible que celui des 12 sujets - + + et - - +. En raison de la distribution visiblement (mais non significativement) asymétrique des valeurs, le seuil de signification statistique a été testé à la fois par le calcul du t de Student et par celui de Kolmogorov-Smirnov (K. S.). Il est significatif dans les 2 cas (tableau 1). Les 19 individus qui présentent une ou plusieurs réactions R ont une valeur de Mg E intermédiaire et non significativement différente des précédentes. La prise en considération des 4 individus qui ne montrent aucune réaction positive (Mg E = $53,4 \pm 5,74$ mg/l) ne modifie pas sensiblement les résultats. Conjointement avec les 68 sujets du tableau 1, nous les avons répartis en 3 groupes: groupe I: + + +; groupe II: - + +, - - +, et - - +; groupe III: R + +; RR +, RRR, R - +, R - - et RR - selon l'existence de réactions seulement positives, de réactions positives et négatives ou d'au moins une réaction réfractaire. Les moyennes et écart-types du Mg E dans ces 3 groupes sont les suivantes: groupe I (n = 37): $48,9 \pm 4,06$; groupe II (n = 13): $53,7 \pm 4,22$; groupe III (n = 22): $50,9 \pm 4,85$. Les moyennes et distributions des groupes I et II diffèrent très significativement entre elles ($t = 3,68$, $P < 0,001$ et K. S. = 0,61, $P < 0,005$), tandis que la moyenne du groupe I est significativement différente de celle des groupes II et III cumulés ($t = 2,92$, $P < 0,005$).

3.3 Influence du sexe, de la génération et de la famille

Ces résultats sont indépendants du sexe et de la génération: les sujets du groupe I ont toujours des valeurs de Mg E plus faibles que celles des groupes II et III cumulés, que ce soit chez les pères, les mères, les fils ou les filles des familles examinées. A l'intérieur de chacune de ces 15 familles, le Mg E moyen des sujets du groupe I est toujours inférieur à celui des sujets du groupe II, sauf dans les deux familles dont les Mg E sont les plus bas, où la différence entre groupe I et II est proche de zéro (fig. 2). Les valeurs de la famille X sont également indiquées dans la fig. 2 à titre documentaire. Aucune rela-

Tab. 1: Effectif (n), moyenne (m) et écart-type (σ) des concentrations du Mg E des sujets groupés en fonction de leurs réactions aux 3 souches du vaccin. Dans ce tableau, ne sont pas inclus les 4 sujets ne présentant aucune réaction positive. Signification statistique de différences entre groupes: (1) $t=3,17$ ($P<0,005$) et K.S. = 0,61 ($P<0,005$); (2) $t=3,68$ ($P<0,001$) et K.S. = 0,61 ($P<0,005$)
Le Mg E moyen des 37 sujets +++ diffère aussi significativement ($P<0,01$) de celui des 31 autres sujets.

		Réactions aux 2 autres souches du vaccin									Total		
		++			- +			R +					
		n	m	σ	n	m	σ	n	m	σ	n	m	σ
Réaction à une des souches du vaccin	+	37	48,86 ⁽¹⁾	4,06	—	—	—	—	—	37	48,86 ⁽²⁾	4,06	
	—	11	53,33 ⁽¹⁾	4,29	1	53,00	—	—	—	12	53,30 ⁽²⁾	4,09	
	R	13	51,46	5,71	4	48,76	2,52	2	50,60	0,64	19	50,80	4,91
Total		61	50,22	4,77	5	49,61	2,89	2	50,60	0,64	68	50,19	4,57

tion entre la réaction +, - ou R des parents et celle des enfants n'a pu être mise en évidence.

Discussion

1. — Mg E et réaction à la vaccination antigrippe

1.1 Facteurs individuels

Les résultats présentés ici montrent clairement l'existence d'une association entre la concentration du Mg E et l'intensité de la réponse immunitaire humorale au vaccin antigrippe. En effet, d'une part, les sujets positifs qui réagissent par une augmentation du taux d'Ac ont des Mg E inférieurs à ceux des sujets négatifs qui ne réagissent pas au vaccin, le Mg E étant d'autant plus bas chez les premiers que le taux d'Ac est plus élevé. D'autre part, les individus qui réagissent positivement aux 3 souches du vaccin (groupe I) ont également des Mg E inférieurs à ceux qui présentent une ou plusieurs réactions négatives (groupe II) et plus généralement à l'ensemble de tous les autres sujets (groupes II et III cumulés). Ce résultat reste significatif même si l'on inclut dans la statistique la famille X qui avait été éliminée au départ ($t=2,32$, $P<0,025$, K.S. = 0,51, $P<0,01$ entre groupes I et II), ce qui confirme la validité de nos conclusions quelle que soit par ailleurs la valeur des critères appliqués à l'élimination des résultats de la famille X. En revanche, la qualité de réfractaires, c'est-à-dire l'incapacité à produire des Ac (taux nuls aussi bien avant qu'après vaccination) semble indépendante du Mg E. Ce phénomène serait donc bien distinct

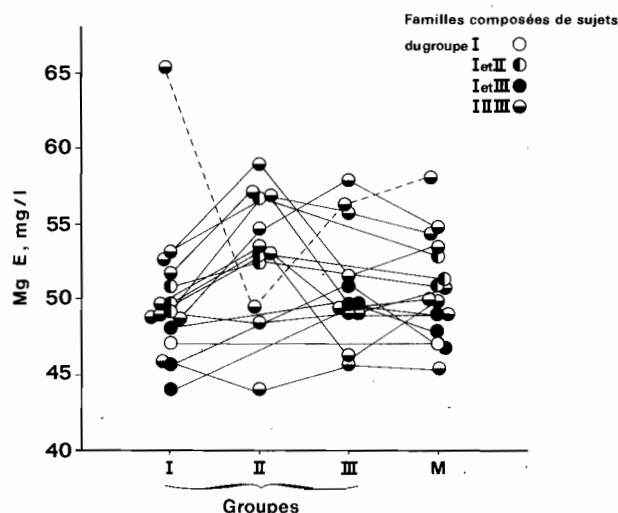


Fig. 2: Valeurs moyennes du Mg E des sujets d'une même famille classés en fonction des groupes I (+++), II (- + +, - - +, - - -) et III (au moins une réaction R); M = valeur moyenne du total des sujets de la famille. Les symboles correspondant aux valeurs des sujets d'une même famille sont unis par un trait plein à l'exception de celles de la famille X indiquées en traits interrompus. Les divers types de symboles correspondent à la composition de la famille selon qu'elle comporte des sujets des groupes I, I et II, I et III ou I, II et III. La valeur du t apparié calculé à partir des différences entre valeurs des groupes I et II est significative à $P<0,005$; entre valeurs des groupes I et III à $P<0,01$; entre valeurs du groupe I et valeurs des groupes II et III cumulés à $P<0,005$, famille X exclue.

du précédent dans lequel c'est l'intensité plus ou moins grande d'une réponse immunitaire par ailleurs toujours présente, qui est associée aux variations du Mg E.

1.2 Facteurs familiaux

Si les données de la littérature montrent que le Mg E est sous le contrôle de facteurs génétiques

ques [1 à 5, revue dans *Henrotte*, 13], il n'en est pas de même chez l'homme, en ce qui concerne la réponse immune. Plus spécifiquement, la présente investigation ne permet pas de mettre clairement en évidence l'influence des facteurs familiaux sur la réaction au vaccin antigrippe. En effet, d'une part, aucune relation significative n'a été trouvée entre les réactions +, - ou R des parents et celle des enfants, mais, d'autre part, les 11 sujets +++ (groupe I) des 4 familles ne comportant aucun individu du groupe II ont des Mg E plus bas ($Mg E = 46,54 \pm 2,82$) que ceux des 26 sujets +++ ($Mg E = 49,84 \pm 4,14$) des 11 autres familles qui comportent toutes des individus du groupe II. Bien que faiblement significative ($P < 0,025$), cette différence suggère l'existence dans ces dernières familles d'un facteur favorisant à la fois l'élévation du Mg E chez tous ses membres (quelle que soit leur réaction post-vaccinale) et la présence de réactions de type négatif chez certains d'entre eux (fig. 2). Ces considérations illustrent la complexité des interactions entre les variables étudiées ici.

2. — Métabolisme magnésique et système immunitaire

Chez l'animal, la carence expérimentale en Mg entraîne à la fois une diminution des réponses immunitaires de l'organisme par défaut de synthèse des Ac (et plus généralement de synthèse protéique), et une baisse de la concentration du Mg dans le plasma, les érythrocytes et les tissus [revue dans *Larvor*, 18 et *Gaudin-Harding*, 8]. Ce phénomène paraît en contradiction avec les observations rapportées ici.

Les carences expérimentales sont toutefois importantes alors que notre investigation est relative à des sujets apparemment sains, ne souffrant d'aucun déficit magnésique grave. L'existence d'une réponse immune plus intense chez des sujets à Mg E bas constituerait alors un phénomène distinct de ceux observés dans le déficit magnésique: dans cette hypothèse, une concentration faible en Mg E ne serait nullement l'indice d'une carence magnésique mais le reflet d'une caractéristique génétique déterminée, celle-ci étant associée directement ou indirectement à une meilleure réactivité du système immunitaire. En faveur de cette hypothèse, rappelons les faits suivants. Les individus porteurs des groupes HLA-BW35 [9, 12] et de l'haplotype A1 B8 DR3 [10 et 13] ont des Mg E inférieurs à ceux des sujets porteurs d'autres antigènes HLA.

Les sujets A1 B8 DR3 présentent de plus, des caractéristiques qui suggèrent l'hyperréactivité de leur système immunitaire [6]. Au contraire, les parents sains d'enfants atteints de leucémie ont des valeurs de Mg E supérieures à celles de parents sains de familles normales [17], ce qui, à la lumière de nos présentes observations, suggérerait une diminution de réactivité de leur système immunitaire, en bon accord avec la prédisposition à des affections qui impliquent une diminution d'immunocompétence de l'organisme. D'autres faits, tels que l'existence de Mg E bas chez les sujets allergiques [revue dans *Durlach*, 7] évoquent aussi l'existence d'une relation entre hyperréactivité du système immunitaire et baisse du Mg E. En attendant des investigations plus approfondies dans ce domaine, l'existence d'une telle relation doit être considérée avant tout comme une hypothèse de travail que nous attacherons à vérifier par la suite.

Bibliographie

- [1] *Darlu, P.*: La variabilité en physiologie humaine et son interprétation génétique. Application au métabolisme minéral: Mg, Zn, Ca. Thèse Université Paris VII (1982).
- [2] *Darlu, P.* et *Henrotte, J. G.*: The importance of genetic and constitutional factors in human red blood cell magnesium control. 2nd Int. Symp. on Magnesium, Montréal 1976; in: *Cantin, M., Seelig, M. S.* (eds.): Magnesium in Health and Disease. Spectrum Publication, New York, 921—927 (1980).
- [3] *Darlu, P.* et *Moreau, T.*: Twin studies of blood ionic content. *Prog. Clin. Biol. Research*, **24 C** (1978) 177—185.
- [4] *Darlu, P., Henrotte, J. G., Bénech, A., Franck-Riquier, G., Pineau, M.* et *Santarromana, M.*: Genetic regulation of plasma, red blood cell and urinary magnesium. 3ème Symp. intern., Baden-Baden, août 1981. *Magnesium-Bulletin* **3** (1b) (1981) 7.
- [5] *Darlu, P., Michotte, Y., Defrise-Gussenhoven, E., Henrotte, J. G.*: The inheritance of plasma and red blood cell magnesium and zinc levels studied from twin and family data. *Acta Genet. Med. Gemellol., Jerusalem* **30** (1981) 67—75.
- [6] *Dausset, J.*: Clinical implications in: HLA and disease. *Dausset, J.* et *Svejgaard, A.* (eds.), Munksgaard, Copenhagen, 296—310 (1977).
- [7] *Durlach, J.*: Rapports expérimentaux et cliniques entre magnésium et hypersensibilité. *Rev. franç. allergol.* **15** (1975) 133—146.
- [8] *Gaudin-Harding, F.*: Mg et système immunitaire. 3rd Symp. intern. on Magnesium, Baden-Baden, août 1981. *Magnesium-Bulletin*, **3** (1a) (1981) 229—231.
- [9] *Henrotte, J. G.*: Relations entre magnésium, zinc érythrocytaires et groupes HLA. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **285**, Série D (1977) 737—739.
- [10] *Henrotte, J. G.*: Magnésium érythrocytaire et groupes HLA. *C. R. Acad. Sc. Paris* **289**, Série D (1979) 445—447.

- [11] Henrotte, J. G.: The variability of human red blood cell magnesium level according to HLA groups. *Tissue Antigens* **15** (1980) 419—439.
- [12] Henrotte, J. G.: Relationship between red blood cell magnesium and HLA antigens. 4th Intern. Congress Immunol., Paris 1980. Abstract n° 8.5.25 (1980b).
- [13] Henrotte, J. G.: Facteurs génétiques de régulation du métabolisme magnésique chez l'homme. 3ème Symp. intern. sur le magnésium, Baden-Baden, août 1981. *Magnésium-Bulletin* **3** (1a) (1981) 237—248.
- [14] Henrotte, J. G. et Colombani, J.: Relation entre la magnésémie et le système H-2 de la souris. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **292**, Série III (1981) 789—791.
- [15] Henrotte, J. G., Darlu, P., Bénech, A., Franck-Riquer, G., Pineau, M. et Santarromana, M.: Variations de la magnésémie chez l'homme selon l'âge et le sexe. Distribution des valeurs et normes. 3ème Symp. intern. sur le magnésium, Baden-Baden, août 1981. *Magnesium-Bulletin*, **3** (1b) (1981) 6.
- [16] Henrotte, J. G. et Durlach, J.: Magnésium et biométrie humaine, variabilité physiologique de la teneur en magnésium de l'organisme. 1er Symp. intern. sur le déficit magnésique en pathologie humaine, Vittel 1971. *Durlach, J.* (éd.), SGEMV, Vittel **1** (1971) 91—109.
- [17] Henrotte, J. G. et Gluckman, E.: Etude familiale du magnésium érythrocytaire chez les leucémiques et aplasiques. 3ème Symp. intern. sur les magnésium, Baden-Baden, août 1981. *Magnesium-Bulletin* **4**, 1 (1982) 93—97.
- [18] Larvor, P.: Magnesium, humoral immunity and allergy. 2nd Intern. Symp. on Magnesium, Montréal; 1976. in: *Cantin, M. et Seelig, M. S.* (eds.): *Magnesium in Health and Disease*, Spectrum Publication, 201—224 (1980).
- [19] Rousselet, F.: Spectrophotométrie par absorption atomique appliquée à la biologie. Thèse d'Etat, S.E.D.E.S., Paris (1966).
- (For the authors: J. G. Henrotte, CNRS Equipe de Biom. Humaine, RCP Magnésium et Oligo-éléments. Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris)