



# Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement

Célia Dechavanne

## ► To cite this version:

Célia Dechavanne. Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. <NNT : 2012PA05P608>. <tel-00856581>

**HAL Id: tel-00856581**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00856581>**

Submitted on 2 Sep 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS DESCARTES**  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
ECOLE DOCTORALE DU MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE, ENVIRONNEMENT

**Année : 2012**

**N°**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Mention : Sciences du vivant  
Discipline : Immunologie – Parasitologie  
Présenté et soutenu par

**Célia DECHAVANNE**

le 18 juin 2012

*Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude  
combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement*

Thèse dirigée par Dr Florence MIGOT-NABIAS

MEMBRES DU JURY

Pr DUPOUY-CAMET Jean	PU-PH	Univ. Paris Descartes (Paris 5)	Président du jury
Dr SNOUNOU Georges	DR2 CNRS	Univ. Pierre et Marie Curie (Paris 6)	Rapporteur
Pr PEYRON François	PU-PH	Univ. Claude Bernard (Lyon 1)	Rapporteur
Dr DUGOUJON Jean Michel	DR1 CNRS	Univ. Paul Sabatier (Toulouse III)	Examineur
Dr GARCIA André	DR1 IRD	Univ. Paris Descartes (Paris 5)	Invité
Dr MIGOT-NABIAS Florence	CR1 IRD	Univ. Paris Descartes (Paris 5)	Directrice de thèse

# Remerciements

## Table des matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
I/ Le paludisme : généralités .....	2
I/ Historique.....	2
II/ Epidémiologie .....	4
III/ Répartition géographique.....	5
III-1/ Dans le monde .....	5
III-2/ Au Bénin.....	6
IV/ La transmission du paludisme .....	7
IV-1/ Déterminants géographiques.....	7
IV-2/Le vecteur .....	7
IV-3/L'agent pathogène.....	8
V/ Physiopathologie du paludisme.....	12
V-1/ Symptomatologie et traitement.....	12
V-2/ Diagnostics.....	15
II/ <i>Plasmodium falciparum</i> : un défi scientifique .....	16
I/ Les stratégies d'échappement de <i>Plasmodium</i> à la réponse immune .....	16
I-1/ Variabilité génétique .....	16
I-2/ Polymorphisme génétique.....	17
II/ Les difficultés du développement du/des vaccin(s) contre le paludisme.....	17
III/ Les antigènes des stades sanguins asexués .....	19
III-1/ Merozoite Surface Protein 1.....	19
III-2/ Merozoite Surface Protein 2.....	21
III-3/ Merozoite Surface Protein 3.....	23
III-4/ Glutamate Rich Protein .....	24
III-5/ Apical Membrane Antigen 1 .....	26
III-6/ L'acquisition de la réponse anticorps spécifique du paludisme .....	28

III/ Acquisition de la réponse anticorps en présence ou en absence d'infection palustre placentaire .....	29
.....	
I/ Acquisition de la réponse anticorps en absence d'infection placentaire .....	29
I-1/ Le transfert d'anticorps maternels .....	29
I-2/ Les immunoglobulines .....	30
I-3/ Hypergammaglobulinémie .....	35
II/ Acquisition de la réponse anticorps dans le cas d'une infection palustre placentaire .....	36
II-1/ Le transfert d'anticorps maternels .....	36
II-2/ Tolérance immunitaire : comparaison de l'acquisition de la réponse immune .....	37
IV/ Problématique .....	39
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>41</b>
I/ La zone d'étude.....	42
II/ Le suivi de la cohorte .....	43
I/ Présentation de la cohorte : inclusion .....	43
II/ Le suivi des enfants .....	43
II-1/ Chaque semaine : suivi actif .....	44
II-2/ Chaque mois : suivi actif .....	44
II-3/ Chaque trimestre : suivi actif.....	44
II-4/ Consultations : suivi passif.....	45
III/ La collecte des échantillons et des données utilisés dans ce travail de thèse .....	45
I/ Suivi parasitologique et traitement .....	45
I-1/ A la naissance.....	45
I-2/ Chaque mois .....	46
I-3/ Chaque consultation .....	46
I-4/ Lecture des lames .....	46
II/ Suivi immunologique .....	47
III-2-1/ A la naissance .....	47
Chaque trimestre.....	47
Serothèque .....	47
III/ Autres suivis : nutritionnel et environnemental.....	47
III-1/ Volet nutritionnel .....	47
III-2/ Volet environnemental.....	48
IV/ Elaboration d'outils méthodologiques à partir des données brutes.....	49

I/ Système d'Information Géographique .....	49
II/ Variable du risque d'exposition .....	50
III/ Modèle pour le traitement des données anticorps.....	51
V/ Les acteurs .....	53
<b>Acquisition de la réponse anticorps du jeune enfant face au paludisme .....</b>	<b>56</b>
I/ Matériel et méthode.....	58
I/Choix des protéines recombinantes .....	58
II/Dosages ELISA .....	59
III/ Traitement des données brutes.....	60
IV/L'analyse des données .....	62
IV-1/ Analyse descriptive.....	62
IV-2/ Le transfert d'anticorps .....	62
IV-3/ Analyses univariée et multivariée de l'acquisition de la réponse anticorps .....	62
II/Résultats : acquisition de la réponse anticorps .....	64
I/ Analyse descriptive .....	64
II/ Le transfert d'anticorps.....	71
III/ Analyse univariée et multivariée de l'acquisition de la réponse anticorps .....	74
III/Conclusion.....	78
<b>Distinction des anticorps de la mère et du nouveau-né .....</b>	<b>80</b>
I/ Article.....	82
II/Informations complémentaires .....	123
I/Les acteurs .....	123
II/Résultats associés à l'article.....	123
III/Résultats complémentaires à ceux de l'article .....	126
<b>Antigènes solubles et tolérance immunitaire : importance des polymorphismes génétiques des parasites infectants .....</b>	<b>128</b>
I/ Approche biologique.....	130
I/Matériel et méthodes : outils biologiques et analyse statistique .....	130
I-1/ Groupes de sujets, choix de la méthode et matériel.....	130
I-2/ Stratégie, extraction et amplification .....	130
I-3/ Analyse de fragments et nettoyage des données .....	135
I-4/ Analyse statistique.....	138

I-5/ Le rôle de chacun dans ce projet.....	138
II/ Résultats.....	139
II-1/ Suivi des échantillons.....	139
II-2/ Description des données brutes.....	140
II-3/ Données cliniques et tolérance immunitaire .....	143
III/ Conclusion.....	146
II/ Approche géographique .....	148
I/Matériel et méthodes : outils géographiques .....	148
I-1/ La cartographie .....	148
I-2/ Test d'auto-corrélation spatiale .....	148
I-3/ Indice de diversité.....	149
II/Résultats : approche géographique.....	150
II-1/ Cartographie des polymorphismes les plus fréquents .....	150
II-2/ Permissivité des enfants aux infections.....	154
III/ Conclusion.....	156
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>158</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>164</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>183</b>

## Liste des abréviations

3P5	Plate-forme Protéomique Paris 5
6-FAM	6-CarboxyFluorescein Aminohexyl Amidite
ADCI	Antibody-Dependent Cellular Inhibition
AIA	Afro Immuno Assay
AMA	Apical Membrane Antigen
AMANET	African Malaria Network Trust
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CSA	Chondroïtin Sulfate A
CSP	Circum Sporozoite Protein
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
DO	Densités Optiques
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GIA	Growth Inhibition Assay
GLURP	Glutamate Rich Protein
GPI	Glycophosphatidylinositol
HEX	6-4,7,2',4',5',7'-HEXachloro-3',6'-dipivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido-hexyl-1-O-[2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl]-phosphoramidite
HRP2	Histidin Rich Protein 2
IFN $\gamma$	InterFéroN gamma
Ig	ImmunoGlobulines
IGHC	ImmunoGlobulin Heavy chain Constant regions
IL	InterLeukine
IMGT	IMmunoGeneTics
INPI	Institut National de la Propriété Industrielle
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
kDa	kiloDaltons
LIGM	Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire
MAP5	Mathématiques Appliquées à Paris 5
MII	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides
MPIU	Même Polymorphisme qu' <i>In utero</i>
MSP	Merozoite Surface Protein
MSP119	Merozoite Surface Protein-1 fragment de 19 kDa
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDIU	Polymorphisme Différent qu' <i>In utero</i>
PfAPI	<i>Plasmodium falciparum</i> Annual Parasite Incidence
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
PfPR	<i>Plasmodium falciparum</i> Parasite Rate
pLDH	Lactate DesHydrogénase
RESA	Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen
rfu	Relative Fluorescence Unit



RON	RhOptry Neck protein
SIG	Système d'Information Géographique
SMBP	Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique
SRM MS	Selected Reaction Monitoring Masse Spectrométrie
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TMB	3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine
TPI	Traitement Préventif Intermittent
UMR	Unité Mixte de Recherche
UPD	Université Paris Descartes
VSA	Variants de Surface Antigénique

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	: Distribution globale du paludisme entre 1900 et 2002	11
<b>Figure 2</b>	: Distribution spatiale mondiale de l'endémicité du paludisme dû à <i>P. falciparum</i> en 2010	12
<b>Figure 3</b>	: Distribution spatiale de l'endémicité du paludisme dû à <i>P. falciparum</i> en 2010 au Bénin	13
<b>Figure 4</b>	: Cycle de <i>Plasmodium falciparum</i>	17
<b>Figure 5</b>	: A) hématie saine; G) hématie parasitée par <i>Plasmodium falciparum</i>	18
<b>Figure 6</b>	: Cytoadhérence de <i>Plasmodium falciparum</i> aux syncytiotrophoblastes dans le placenta	22
<b>Figure 7</b>	: A. Représentation schématique du mécanisme d'échappement immunitaire. B. Fluctuation de <i>P. falciparum</i> dans le sang d'un patient infecté, extrait de la référence	25
<b>Figure 8</b>	: Structure et antigènes étudiés du mérozoïte de <i>P. falciparum</i>	28
<b>Figure 9</b>	: Quatre fragments constituant MSP1 de <i>P. falciparum</i> et localisation du fragment de 19 kDa	29
<b>Figure 10</b>	: Représentation schématique des structures primaire, tertiaire et quaternaire de MSP2	32
<b>Figure 11</b>	: Représentation schématique de la structure en dimère de MSP3	33
<b>Figure 12</b>	: Schéma de la structure primaire de GLURP	34
<b>Figure 13</b>	: Processus de maturation protéolytique d'AMA1	35
<b>Figure 14</b>	: Modèle des étapes précoces de l'invasion érythrocytaire par le mérozoïte	36
<b>Figure 15</b>	: Représentation schématique du mécanisme actif de transfert d'anticorps de la mère au fœtus pendant la grossesse	38
<b>Figure 16</b>	: Ontogénie des Immunoglobulines G maternelles et de l'enfant	39
<b>Figure 17</b>	: Structure schématique d'une immunoglobuline G et ses différents domaines	40
<b>Figure 18</b>	: Ordre des gènes C codant pour les domaines constants des chaînes lourdes d'immunoglobuline localisés sur le chromosome 14 humain	41
<b>Figure 19</b>	: Zone d'étude et localisation des centres de santé, Tori Bossito, Bénin	52
<b>Figure 20</b>	: Diagramme de flux sur 18 mois, Tori Bossito, 2007-2010	54
<b>Figure 21</b>	: Schéma des données et échantillons recueillis pendant le suivi des enfants de la cohorte	56
<b>Figure 22</b>	: Carte de la zone d'étude de Tori Bossito et situation des zones de fort ou faible nombre de cas fébriles de paludisme	62
<b>Figure 23</b>	: Graphiques représentant un modèle linéaire avec une pente ou une constante aléatoires	65
<b>Figure 24</b>	: Traitement des densités optiques réalisé à partir de la macro ADAMSEL FLP b039	73
<b>Figure 25</b>	: Moyenne générale des concentrations d'anticorps spécifiques des sept antigènes en fonction du temps	76
<b>Figure 26</b>	: Moyenne globale des IgG totales ou spécifiques d'antigènes parasite en fonction de l'infection placentaire et de l'infection au cours du suivi	79
<b>Figure 27</b>	: Evolution de la réponse anticorps dirigés contre 7 antigènes parasites en fonction de l'âge de la première infection	81

<b>Figure 28</b> : Influence prospective et rétrospective de l'infection palustre sur le taux d'anticorps	82
<b>Figure 29</b> : Schéma des étapes de purification de l'IgG3 à partir d'un échantillon de plasma et leurs rendements	139
<b>Figure 30</b> : Abondances relatives des peptides discriminants, obtenues à partir des ratios volumiques de 2 plasmas provenant d'individus homozygotes pour les allèles G3m5,10,11,13,14,26,27 ou G3m5,6,11,24,26	140
<b>Figure 31</b> : Abondance relative du peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR mesurée en SRM MS-MS	142
<b>Figure 32</b> : Stratégie des PCR réalisées pour caractériser les polymorphismes des gènes codant pour des antigènes des parasites infectant la mère et son enfant au cours du suivi	146
<b>Figure 33</b> : Localisation de l'amplicon traduit par rapport aux régions répétées de GLURP	149
<b>Figure 34</b> : Electrophorégramme et table de valeur des pics des produits de PCR fluorescents	151
<b>Figure 35</b> : Profils d'artéfacts obtenus lors d'une analyse par électrophorèse capillaire. A) pic compagnon ; B) bégaiement de pics	152
<b>Figure 36</b> : Diagramme de flux des échantillons des 60 couples mère/enfant et variables associées	154
<b>Figure 37</b> : Représentation graphique de la diversité allélique des gènes glurp et msp2 (familles 3D7 et FC27)	156
<b>Figure 38</b> : Schéma expliquant le test géographique d'auto-corrélation	164
<b>Figure 39</b> : Carte des allèles de msp2-3D7 les plus fréquents	166
<b>Figure 40</b> : Carte des allèles de msp2-FC27 les plus fréquents	167
<b>Figure 41</b> : Carte des allèles de glurp les plus fréquents	168
<b>Figure 42</b> : Cartes mettant en parallèle le nombre d'occurrences allélique de glurp par enfant et la localisation des enfants infectés par le même polymorphisme de glurp qu' <i>in utero</i>	170

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	: Définitions des différentes endémicités du paludisme	16
<b>Tableau 2</b>	: Principaux symptômes des paludismes humains	24
<b>Tableau 3</b>	: Acides aminés responsable de l'allotypie du système Gm des IgG3 [140]	46
<b>Tableau 4</b>	: Les 6 allèles G3m les plus représentés dans le monde [140,144,146,147]	48
<b>Tableau 5</b>	: Caractéristiques des populations des mères et des enfants étudiées	87
<b>Tableau 6</b>	: Moyenne des ratios représentant le transfert d'anticorps spécifiques du paludisme	89
<b>Tableau 7</b>	: Analyse univariée de l'effet des covariables sur le taux d'anticorps spécifiques d'antigènes	90
<b>Tableau 8</b>	: Analyse multivariée de l'effet des variables d'intérêt et de leurs interactions sur le taux d'anticorps spécifiques d'antigènes	94
<b>Tableau 9</b>	: Amorces utilisées et paramètres de la PCR de détection de <i>P. falciparum</i>	150
<b>Tableau 10</b>	: Amorces utilisées et paramètres de la PCR de caractérisation du polymorphisme de <i>msp2</i>	151
<b>Tableau 11</b>	: Amorces utilisées et paramètres de la PCR de caractérisation du polymorphisme de <i>glurp</i>	153
<b>Tableau 12</b>	: Valeurs chiffrées de la diversité allélique des gènes <i>glurp</i> et <i>msp2</i> (familles 3D7 et FC27)	160
<b>Tableau 13</b>	: Multiplicité d'infection par type de visites au cours du suivi	160
<b>Tableau 14</b>	: Comparaison des données cliniques et biologiques des enfants ayant rencontrés ou non le même polymorphisme <i>qu'in utero</i>	161
<b>Tableau 15</b>	: Comparaison des données cliniques des infections caractérisées par le même polymorphisme <i>qu'in utero</i> ou par un polymorphisme différent	162
<b>Tableau 16</b>	: Comparaison des données cliniques et biologiques des enfants ayant rencontrés ou non le même polymorphisme de <i>glurp qu'in utero</i>	163
<b>Tableau 17</b>	: Comparaison des données cliniques des infections caractérisées par le même polymorphisme de <i>glurp qu'in utero</i> ou par un polymorphisme différent	163

# INTRODUCTION

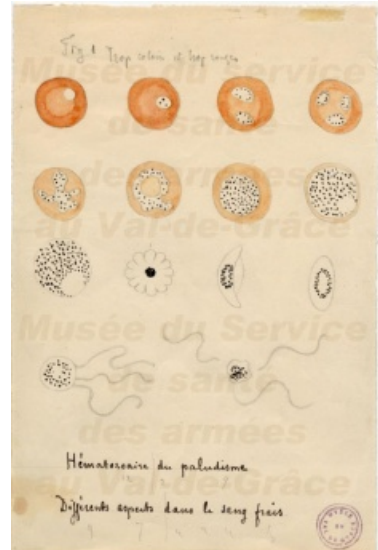
# I/ Le paludisme : généralités

## I / HISTORIQUE

Une étude a récemment pu établir que l'origine du paludisme chez l'homme serait certainement due à une transmission entre gorille et homme, excluant ainsi une transmission due aux chimpanzés, aux bonobos ou encore aux ancêtres de l'Homme [1]. En l'absence de restes fossiles directs (empreinte du parasite) ou indirectes (traces de maladie sur les squelettes), la première trace de paludisme est la présence d'ADN de *Plasmodium falciparum* chez des momies datées de 3200 av JC [2]. Il existe de nombreuses références à la maladie dans les écrits védiques (1600 avant Jésus Christ) et dans les tablettes d'argile d'Ashurbanipal en Mésopotamie (669 avant Jésus Christ). Hippocrate [3] est le premier à décrire les symptômes de la fièvre tierce bénigne et de la fièvre quarte, à observer leur aspect saisonnier, à noter la présence de splénomégalies et à établir une relation avec les eaux stagnantes des marais [4]. Le terme de « malaria » est dérivé de l'italien ancien attesté comme nom de maladie depuis le 17<sup>e</sup> siècle, combinaison de *mala* «mauvais, insalubre» et *aria* «air». Au 19<sup>e</sup> siècle le terme de « paludisme » apparaît venant du vieux mot *palud*, lui même dérivé du latin *palus* signifiant « marais » [5].



L'agent vecteur du paludisme a été découvert en 1880 par l'équipe de Charles Laveran, médecin français exerçant à Constantine. Il étudie le cycle de reproduction du protozoaire en examinant des échantillons de sang au microscope et observe que la division du pathogène coïncide avec les fièvres. Il présente l'agent pathogène sous le nom d'*Oscillaria malariae* à l'Académie des sciences en 1881. En 1907, Laveran reçoit le prix Nobel de physiologie et de médecine pour ses travaux et pour la découverte des maladies causées par des protozoaires [6].



En 1884, le Dr Patrick Manson émet le premier l'hypothèse que le vecteur du paludisme serait un moustique qui absorbe le parasite et le pond dans l'eau que l'homme ingurgite.





Le britannique Ronald Ross, travaillant en Inde et correspondant régulièrement avec Manson, prouve que le paludisme est transmis par une piqûre de moustique.

En Août 1897, lors de la dissection d'un anophèle s'étant nourri 4 jours auparavant du sang d'un patient impaludé, Ross trouve le parasite responsable du paludisme dans l'estomac du moustique prouvant ainsi le rôle des *Anopheles*

dans la transmission du paludisme à l'homme.

Dès lors, Ross continue ses recherches en utilisant des oiseaux comme modèle animal. En 1898, il observe qu'après le repas sanguin d'un moustique sur oiseaux infectés, le parasite peut se développer dans le moustique et migrer vers les glandes salivaires permettant ainsi d'infecter un autre oiseau lors du prochain repas sanguin. Ross démontre ainsi que les moustiques servent d'hôte dans le cycle du paludisme. Ceci lui vaut le prix Nobel de médecine en 1902 [7,8].

En 1898, Giovanni Battista Grassi, un scientifique italien, décrit les stades parasitaires du moustique et démontre que les protozoaires trouvés chez l'homme sont transmis par les moustiques du genre *Anopheles* [9].



Le paludisme a commencé à régresser spontanément en Europe dès le XVIII<sup>e</sup> siècle puis en Amérique du Nord au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle. Il a disparu en Angleterre dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle et est devenu très discret en France continentale ainsi que dans de nombreux pays européens. Mais il se maintenait en Italie, en Corse, en Grèce, en Hollande, en Allemagne, aux Etats Unis jusqu'en 1945 et en URSS jusqu'en 1959. Il sévissait *a fortiori* dans les régions tropicales et subtropicales [4].

La carte de la Figure 1 représente le risque émanant d'au moins une espèce de *Plasmodium* causant le paludisme chez l'homme entre 1900 et 2002. Les efforts mis en œuvre pour la maîtrise du développement du paludisme ont réduit sa distribution géographique mondiale de 53% en 1900 à 27% en 2002. Le nombre de pays et de territoires (comptant une population de plus de 100 000 habitants) exposés à un risque palustre est passé de 140 à 88 durant cette période [10].

La régression spontanée du paludisme fut attribuée au développement économique, à l'amélioration de l'habitat et à la séparation des locaux d'habitation de ceux du bétail [4].

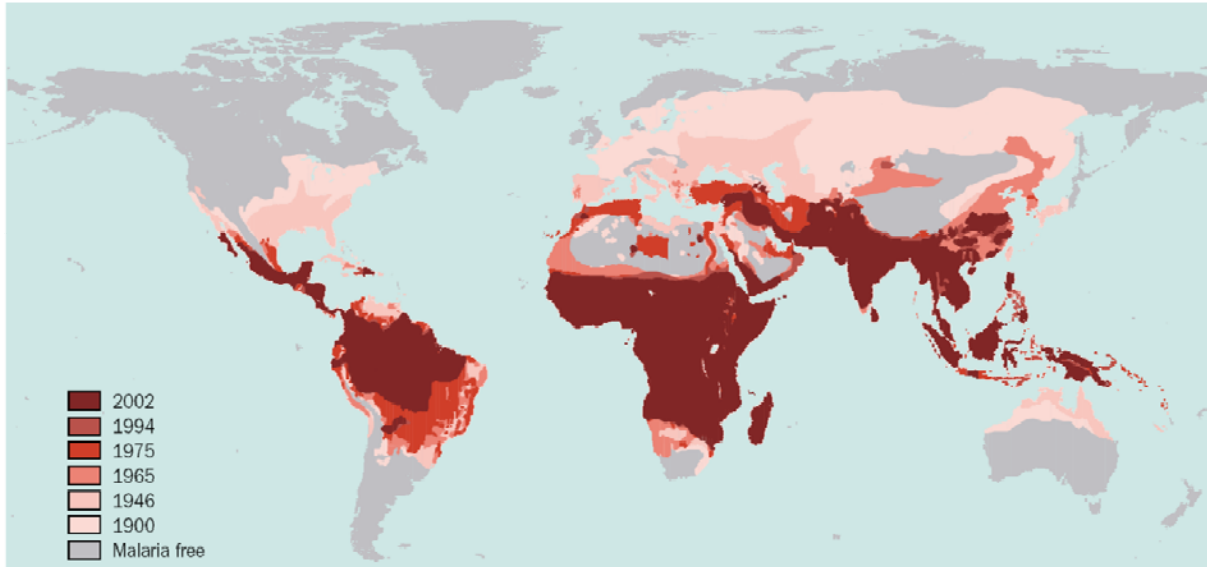


Figure 1: Distribution globale du paludisme entre 1900 et 2002 [10]

## II / EPIDEMIOLOGIE

Le paludisme est un problème d'ampleur mondiale qui se concentre sur la santé et le potentiel économique des communautés les plus pauvres de la planète.

Fin 2010, 765 millions de personnes restent exposées au risque de paludisme.

On estime environ à 216 millions de cas dans le monde et 665 000 décès sont imputables au paludisme. Quatre vingt onze pourcent des décès concernent l'Afrique et 86% des décès concernent des enfants de moins de 5 ans [11]. Le nombre de décès dû au paludisme a été contesté par Murray *et al.*, qui ont dénombré 1 238 000 décès en 2010. Cet écart est dû à la méthode de dénombrement qui compte plus de cas que l'OMS chez les individus âgés de 5 ans et plus [12].

Le paludisme représente environ 40 % des dépenses de santé publique engagées en Afrique subsaharienne. En Afrique, les ménages engagent plus de 10% de leurs dépenses annuelles dans des frais relatifs au paludisme [13].

Les sommes consacrées au paludisme ont permis des progrès considérables notamment dans l'accessibilité aux moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) au cours des trois dernières années. On estime qu'en 2011, 50 % des ménages africains étaient en possession d'une MII. Les programmes de pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent ont connu un développement très important en Afrique subsaharienne au cours des dernières années, le nombre de personnes protégées passant de 10 millions en 2005 à 78 millions en 2010, soit un taux de couverture d'environ 11 % de la population exposée au risque en 2010 [11].

En Afrique, où surviennent le plus de cas, l'objectif est de contrôler le paludisme par des approches intégrées combinant le diagnostic, un traitement efficace et précoce, la lutte anti-vectorielle et la chimioprophylaxie (notamment par le traitement préventif intermittent (TPI) des enfants et des



femmes enceintes). Un vaccin antipaludique serait bien entendu un apport essentiel dans cette lutte [14].

### III / REPARTITION GEOGRAPHIQUE

#### III-1/ Dans le monde

Le paludisme est principalement endémique dans les régions tropicales et subtropicales. L'endémicité d'une zone est calculée en fonction de l'indice parasitaire c'est à dire le taux de parasites circulants dans le sang d'enfants âgés de 2 à 10 ans [15–17].

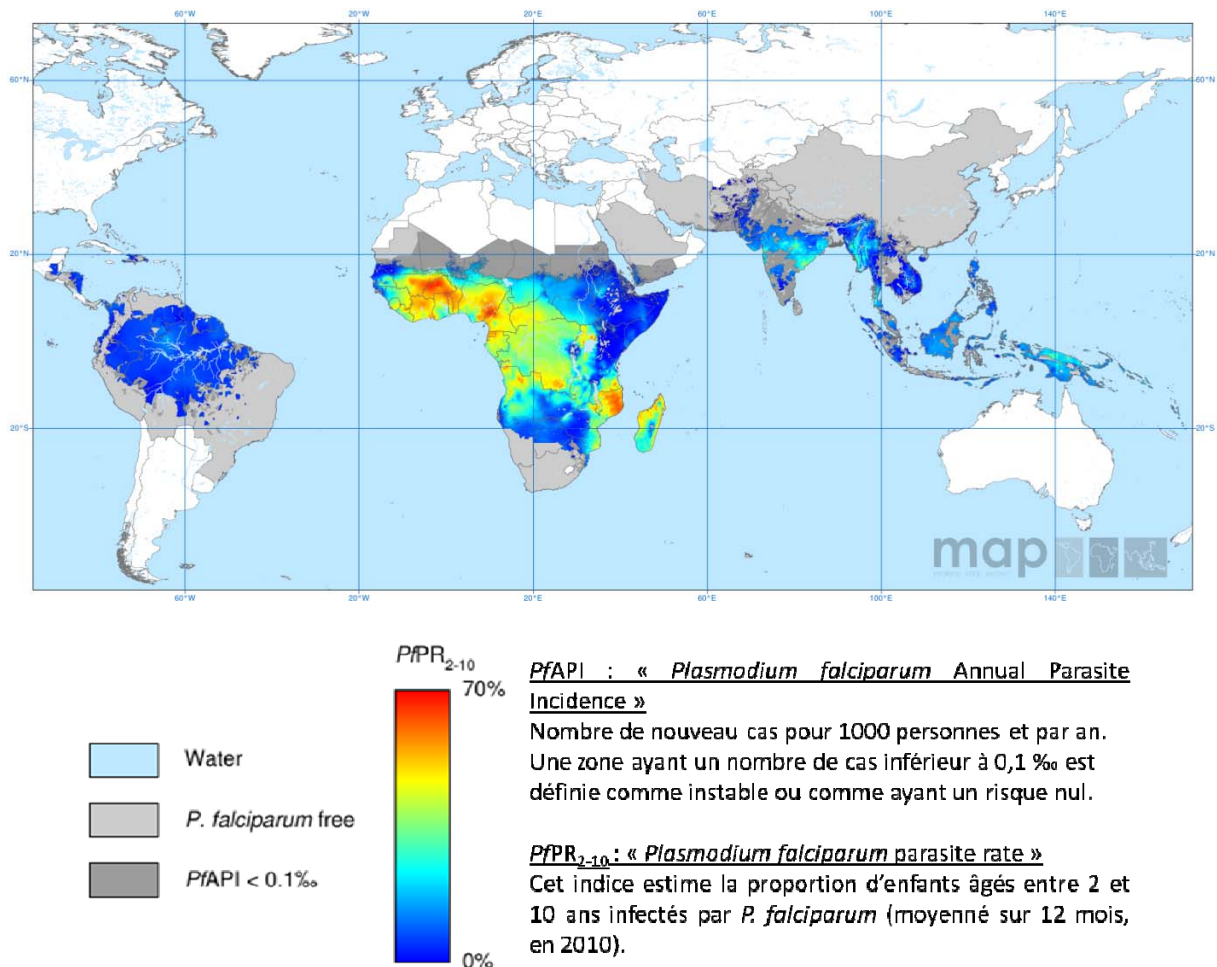


Figure 2: Distribution spatiale mondiale de l'endémicité du paludisme dû à *P. falciparum* en 2010 [18]

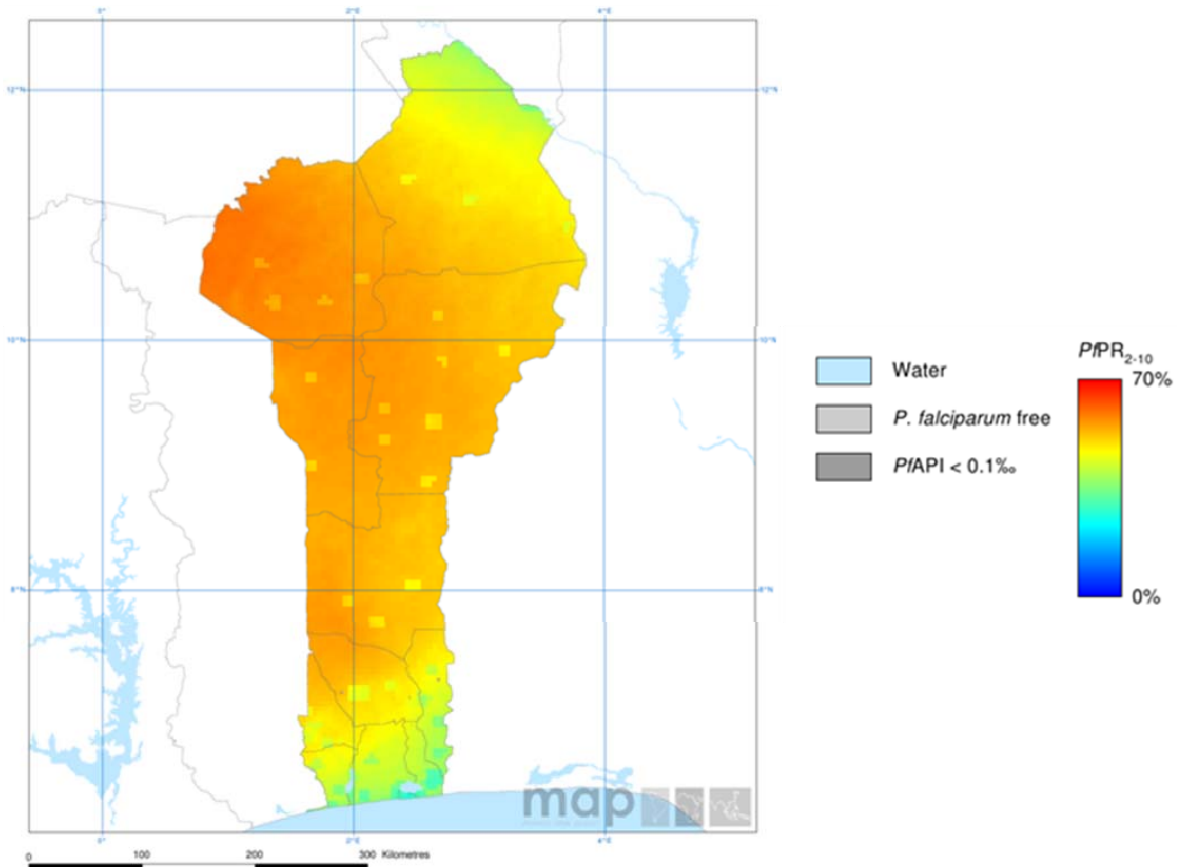
Source : [http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/endemicity/Pf\\_mean/BEN/](http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/endemicity/Pf_mean/BEN/) (consulté en février 2012)

Dans les études de Hay et *al.*, [16] datant de 2009 et de Gething et *al.*, [17] datant de 2010, l'endémicité est déterminée selon 4 classes dont les définitions sont expliquées dans le Tableau 1 et sont complétées par des notions de transmission, de stabilité du paludisme, d'incidence du parasite et d'immunité chez les adultes.

	Indice parasitaire (PfPR <sub>2-10</sub> ) [16,17]	Transmission [19]	Type de paludisme [19]	Cause déterminante [4]	Incidence du parasite [4]	Immunité chez l'adulte [19]
<b>Hypo endémique</b>	<10%	Faible	Instable	Vecteur peu anthropophile et de faible longévité.	Fluctuations très marquées d'une année à l'autre.	Nulle
<b>Meso endémique</b>	≥10% et <50%	Variable	Instable	Saison de transmission courte	<i>P. vivax</i> le plus fréquent	Non significative
<b>Hyper endémique</b>	≥50% et <75%	Intense avec des variations saisonnières	Stable	Vecteur très anthropophile longévité modérée ou longue.	Peu marquées en dehors des fluctuations saisonnières.	Significative
<b>Holo endémique</b>	≥75%	Intense toute l'année	Stable	Saison de transmission longue	<i>P. falciparum</i> le plus fréquent	Solide

Tableau 1 : Définitions des différentes endémicités du paludisme

## III-2/ Au Bénin

Figure 3 : Distribution spatiale de l'endémicité du paludisme dû à *P. falciparum* en 2010 au Bénin

Source : [http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/endemicity/Pf\\_mean/BEN/](http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/endemicity/Pf_mean/BEN/) (consulté en février 2012)

Notre travail s'est déroulé au Sud du Bénin et plus précisément dans la zone rurale de Tori Bossito. Notre équipe (UMR 216 - Mère et enfant face aux infections tropicales – Institut de Recherche pour

le Développement (IRD) / Université Paris Descartes (UPD)) ainsi que l'équipe de l'UMR 224 (Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle – IRD / Université de Montpellier I) ont collecté des données entomologiques selon des méthodes similaires dans cette zone. Il a été observé entre 0,77 et 4,6 piqûres infectantes par homme et par 100 nuits [20,21] et cette zone a été qualifiée de mésoendémique.

## **IV/ LA TRANSMISSION DU PALUDISME**

### ***IV-1/ Déterminants géographiques***

Outre les facteurs biologiques de l'hôte et du parasite, les facteurs géographiques sont essentiels pour comprendre la transmission du paludisme et expliquer la susceptibilité des individus aux infections. En effet, le nombre de piqûres reçues par un individu dépend de l'abondance de gîtes larvaires dans l'environnement qui découle directement des précipitations, des facilités d'écoulement de l'eau dans la zone et de la plus grande accumulation d'eaux stagnantes. Le nombre de piqûres est également lié aux proportions d'anophèles vecteurs et d'anophèles porteurs de l'agent pathogène. L'infectiosité des anophèles dépend directement du nombre de parasites circulants et par conséquent de la durée du cycle parasitaire qui elle-même dépend de la température. En effet, au-dessous de l'optimum de température (25°C pour *P. falciparum*), le cycle s'allonge et par conséquent la transmission diminue. La température et la pluviométrie sont donc 2 facteurs essentiels à prendre en compte pour expliquer la transmission. D'autres facteurs, comme la végétation, sont également très importants. En effet, selon la densité de végétation (forêt dense, peu éclairée ou savane peu dense, ensoleillée), les espèces d'anophèles circulantes ne sont pas les mêmes. Mais si les villages entrecoupent, par exemple, la forêt, alors il est possible de retrouver des espèces d'anophèles telle que *Anopheles gambiae s.s.*, héliophiles [4]. Ainsi, un projet qui prendrait en considération les facteurs géographiques essentiels à la compréhension de la transmission du paludisme pourrait distinguer l'effet de la différence d'exposition entre les individus et les effets des facteurs biologiques intervenant dans la susceptibilité de ces individus au paludisme.

### ***IV-2/Le vecteur***

Les vecteurs du paludisme humain appartiennent tous au genre *Anopheles* qui fait partie de la famille des *Culicidae* de l'ordre des *Dieptra*. Il existe plus de 450 espèces d'anophèles recensées sur la planète, mais seules 70 à 80 peuvent être considérées comme des vecteurs. Elles sont regroupées par régions géographiques. En Afrique tropicale, on retrouve 14 espèces d'anophèles vecteurs, dont 5 vecteurs principaux : *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili s.l.*, *An. moucheti* [4].

La durée de vie d'un anophèle adulte se situe autour d'une semaine à 10 jours pour un mâle et de 2 à 4 semaines pour une femelle en région tropicale. Outre l'absorption de jus sucré, la femelle fécondée se met en quête d'un repas de sang qu'elle prélève tous les 2 à 3 jours sur un hôte vertébré. Elle trouve dans ce repas les éléments protéiques nécessaires au développement des ovocytes. Au cours du repas de sang, elle prélèvera jusqu'à 4 fois son volume de sang. La femelle pond séparément, à la surface de l'eau, 40 à 100 œufs qui éclosent au bout de 24 à 48 heures selon la température. Après la ponte, la femelle part à la recherche d'un nouvel hôte pour prendre un autre repas de sang [4].

Les anophèles qui se nourrissent sur l'homme sont dit anthropophiles et s'opposent à ceux qui se nourrissent sur différentes espèces animales qui sont dits zoophiles. Beaucoup d'espèces se nourrissent à la fois sur l'homme et le bétail en fonction de la disponibilité des hôtes, même si elles marquent une certaine préférence pour l'un ou pour l'autre [4].

### ***IV-3/L'agent pathogène***

Les agents du paludisme sont des protozoaires de la classe des sporozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Cinq espèces de *Plasmodium* peuvent parasiter l'homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. knowlesi*. *P. falciparum* est le plus mortel, présentant une large gamme de manifestations pathologiques. Ces dernières années, il a été enregistré certains cas humains de paludisme à *P. knowlesi*, un paludisme du singe rencontré dans certaines zones de forêts d'Asie du Sud-est.

Le cycle de *Plasmodium* se décompose en une phase sexuée chez l'*Anopheles* (hôte définitif) et en une phase asexuée chez l'homme (hôte intermédiaire). Le cycle est détaillé dans les 2 paragraphes suivants : les exposants insérés dans le texte renvoient aux différentes étapes illustrés dans la Figure 4.

#### IV-3-1/ Phase sexuée chez le moustique

En prenant son repas sanguin sur un sujet infesté, le moustique absorbe les différents stades du parasite. Les éléments asexués, trophozoïtes et schizontes, sont digérés ; seuls les gamétocytes poursuivront leur développement. Rapidement, le gamète femelle se transforme en macrogamète. Le gamétocyte mâle donne naissance à 8 microgamètes flagellés très mobiles qui se dirigent rapidement à la rencontre du macrogamète<sup>I, II</sup>. La fécondation donne naissance à l'ookinète<sup>III</sup>, œuf mobile qui traverse la paroi de l'estomac, formant ensuite l'oocyte<sup>IV</sup> dans lequel s'individualisent les sporozoïtes. Libérés par l'éclatement de l'oocyte mûr<sup>V</sup>, les sporozoïtes gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle [22].

## IV-3-2/ Phase asexuée chez l'homme

Au cours de la piqûre, l'anophèle infesté inocule la quasi-totalité des sporozoïtes localisés dans ses glandes salivaires. Une fois injectés dans la circulation sanguine, les sporozoïtes se dirigent en moins d'une heure dans le foie.

La phase hépatique :

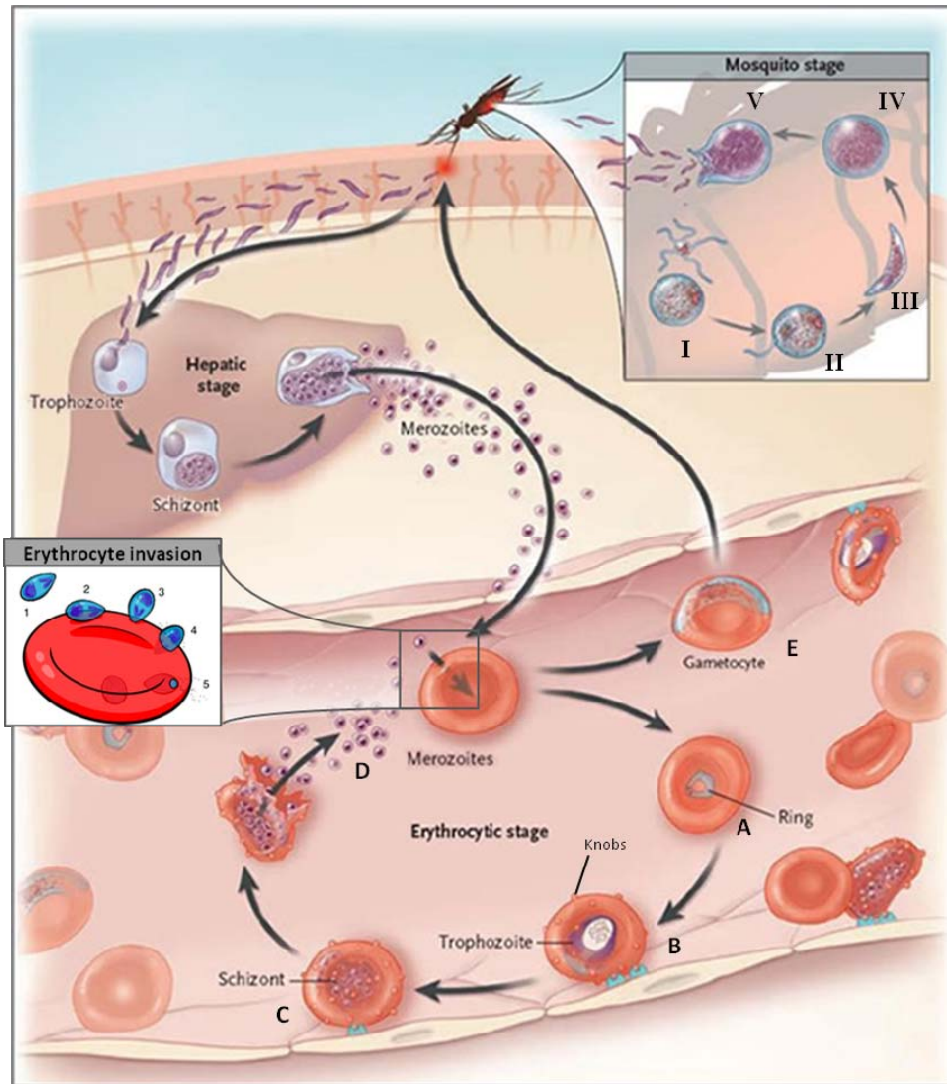
Il s'agit de la phase silencieuse du cycle. Après sa pénétration dans un hépatocyte, le sporozoïte se divise en formant, en 1 à 3 semaines, un schizonte mature : volumineuse cellule plasmodiale contenant quelques milliers de noyaux. A maturité, le schizonte hépatique éclate, libérant des mérozoïtes, formes uninucléées qui poursuivront leur développement au cours de la phase érythrocytaire.

La phase érythrocytaire :

Le mérozoïte est libre dans la circulation sanguine<sup>1</sup>. L'invasion de l'érythrocyte débute par la liaison du mérozoïte à la surface d'un érythrocyte<sup>2</sup>. Il semblerait que cette liaison puisse se réaliser par tous les points de la surface du mérozoïte. Le mérozoïte oriente sa région apicale (contenant rhoptries et micronèmes) contre la surface de l'érythrocyte. Une série d'interactions ligand-récepteur d'une grande affinité se met en place entre le parasite et la cellule sanguine formant un point d'ancrage solide<sup>3</sup>. Les protéines du micronème et notamment AMA1 (Apical Membrane Antigen-1) semblent jouer un rôle essentiel dans l'adhésion à l'érythrocyte [23–27]. La membrane de l'hématie s'invagine et enveloppe progressivement le mérozoïte sous l'action de l'actine et de la myosine parasitaires<sup>4</sup>. Le parasite est donc propulsé dans l'érythrocyte, le manteau glycoprotéique se détache<sup>5</sup> et le mérozoïte se retrouve isolé dans la vacuole parasitophore [22,28,29].

Après sa pénétration dans l'hématie, le mérozoïte évolue en anneau (ring) caractéristique<sup>A</sup> puis en trophozoïte. La vacuole nutritive parasitaire se remplit progressivement du produit de dégradation de l'hémoglobine appelé pigment malarique ou hémozoïne<sup>B</sup>. La réplication de l'ADN et la multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique donnera naissance à un schizonte mûr<sup>C</sup>. A maturité, le schizonte éclate, les mérozoïtes sont libérés envahissant immédiatement de nouvelles hématies<sup>D</sup>. Un nouveau cycle érythrocytaire commence.

Après plusieurs cycles asexués schizogoniques, certains parasites érythrocytaires se différencient en éléments à potentiel sexué, les gamétocytes mâles et femelles, uninucléés, qui permettront la poursuite du cycle chez le moustique<sup>E</sup>. La nature précise du stimulus responsable de la gamétogénèse reste encore indéterminée [22,31].

Figure 4 : Cycle de *Plasmodium falciparum* [29,30]IV-3-3/ Les particularités de quelques *Plasmodium*

Une différence essentielle entre *P. falciparum* et les autres *Plasmodium* humains est qu'il est capable de modifier la surface des érythrocytes infectés entraînant leur adhérence dans les vaisseaux endothéliaux. L'obstruction des vaisseaux sanguins est à l'origine des formes compliquées de paludisme : le paludisme gestationnel et le paludisme cérébral. La symptomatologie et les conséquences de ces complications sont décrites dans le paragraphe « V-1-2/ Accès palustre grave » page 13.

Les trophozoïtes se développent au sein de l'érythrocyte. Le matériel parasitaire est transporté à la membrane de l'hématie qui va alors se recouvrir de petites protubérances appelées « knobs ». La fonction des knobs est de rentrer en contact et de se fixer sur les cellules de l'hôte. La séquestration des hématies parasitées permet ainsi au parasite d'échapper à la clairance immunologique ou son élimination par la rate. Les récepteurs impliqués dans la cytoadhésion sont encore mal connus. Dans

le cadre du paludisme placentaire, la protéine parasitaire en cause est *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*) et le récepteur de l'hôte est la chondroïtin sulfate A (CSA) [32].

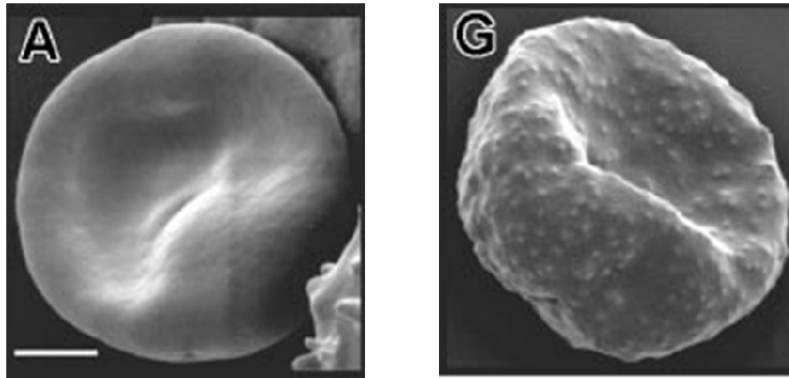


Figure 5: A) hématie saine; G) hématie parasitée par *Plasmodium falciparum* [33]

Il a été récemment décrit que *P. vivax* aurait également la faculté de séquestrer. La cytoadhésion des hématies parasitées par *P. vivax* est 10 fois moins importante que celle observée chez *P. falciparum*, mais avec une force d'interaction équivalente [34].

Une autre particularité de certains *Plasmodium* a été décrite par Gueirard et collaborateurs. Les auteurs ont montré que la transformation des sporozoïtes en mérozoïtes de *P. berghei* et *P. yoelii* (2 *Plasmodium* de rongeurs) pouvait se faire en dehors des hépatocytes et notamment dans les cellules du derme, de l'épiderme ou du follicule pileux (où ils peuvent survivre pendant plusieurs semaines) [35].

La faculté de quiescence, généralement attribuée à *P. vivax*, a été démontrée comme existante chez *P. falciparum*, *in vitro*. En effet, après une très longue pression médicamenteuse sur une culture de parasites, l'équipe de Witkowski a montré l'existence d'une souche ayant survécu à de hautes doses d'artémisinine. Ils ont observé, dans cette souche, une surexpression des gènes codant pour les protéines chaperones « heat shock » et une diminution de l'expression des gènes codant pour des protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire et de la biosynthèse d'ADN [36].

## V/ PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME

### V-1/ Symptomatologie et traitement

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	référence
<b>Cycle pré-érythrocytaire (jours)</b>	5.5 - 7	6 - 8	14 - 16	9	[37]
<b>Période d'incubation asymptomatique (jours)</b>	9 - 14	12 - 17 jours mais peut aller jusqu'à 1 an	18 - 40 mais peut être long	16 - 18 mais peut être long	[37]
<b>Cycle érythrocytaire (heures)</b>	48	48	72	48	[37]
<b>Fièvres (en fonction du cycle érythrocytaire), (heures)</b>	24, 36, 48 (quotidiennes, tierces)	48 (tierces)	72 (quartes)	48 (tierces)	[38]
<b>Mérozoïtes par schizonte</b>	8 - 32	12 - 24	6 - 12	4 - 16	[38]
<b>Reviviscence</b>	les formes asexuées peuvent rester très longtemps dans le sang périphérique	-	les formes asexuées peuvent rester très longtemps dans le sang périphérique	-	[4] [38]
<b>Rechute</b>	-	Hypnozoïte: phase de dormance dans le foie	-	Hypnozoïte: phase de dormance dans le foie	[4]

**Tableau 2: Principaux symptômes des paludismes humains**

La symptomatologie dépend de plusieurs facteurs liés soit au malade (niveau d'immunité acquise en particulier) soit au parasite (espèce plasmodiale, intensité d'infestation, phase de développement parasitaire). Pour toutes les espèces plasmodiales, le cycle hépatique est strictement asymptomatique et les seules manifestations cliniques s'observent au cours de la multiplication endo-érythrocytaire [22].

#### V-1-1/ Accès palustre non compliqué :

Le paludisme non compliqué se définit comme étant sans éléments d'appréciation (cliniques ou biologiques) permettant d'affirmer un dysfonctionnement des organes vitaux. Sur le plan clinique, la



suspicion de paludisme repose donc principalement sur la présence d'un état fébrile ou d'antécédents de fièvre.

Le facteur déclenchant la fièvre est la libération, au moment de l'éclatement des hématies parasitées, du pigment malarique qui se comporte comme une substance pyrogène. Lors des premiers cycles érythrocytaires, les parasites sont encore mal synchronisés. La fièvre a alors une allure continue, plus ou moins modérée selon la parasitémie. Une fois les parasites synchronisés, la libération du pigment malarique est régulièrement répétée, ce qui confère à l'accès palustre l'une de ses principales caractéristiques cliniques : la fièvre par périodicité.

De nombreux symptômes sont décrits pour les accès palustres simples : céphalées, malaise, fatigue, nausées, courbatures, diarrhées, vomissements, hépatomégalie, splénomégalie. Ces symptômes peuvent être facilement confondus avec d'autres infections telles que la grippe ou une infection gastro-intestinale, d'où les difficultés de diagnostic. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont recommandées en cas d'accès non compliqué telles que l'artéméter associé à la luméfántrine ou alors l'artésunate associé à l'amodiaquine ou à la méfloquine ou encore à la sulfadoxine-pyriméthamine.

#### V-1-2/ Accès palustre grave et les groupes à risques en zone stable

*P. falciparum* a la faculté de séquestrer et est ainsi à l'origine des accès sévères qui sévissent essentiellement chez les individus non immuns (voyageurs) et chez certains groupes à risques parmi les populations vivant en zone d'endémie (les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans).

Chez un malade présentant une parasitémie avec des formes asexuées de *P. falciparum* et aucune autre cause manifeste de symptômes, la présence d'une ou de plusieurs des caractéristiques cliniques ou biologiques suivantes indique qu'il souffre d'un paludisme grave. Sur le plan clinique, le patient peut souffrir de troubles de la conscience, de prostration, de convulsions multiples, d'ictère clinique accompagné d'autres signes de dysfonctionnement des organes vitaux, hémoglobinurie... et sur le plan biologique, les examens mesureront une hypoglycémie, une acidose métabolique, une hyperparasitémie, une anémie ...[39].

Les femmes enceintes, particulièrement lors de leur première grossesse, sont susceptibles aux nouvelles infections palustres et montrent une séquestration massive d'hématies parasitées dans l'espace sanguin maternel du placenta [40].

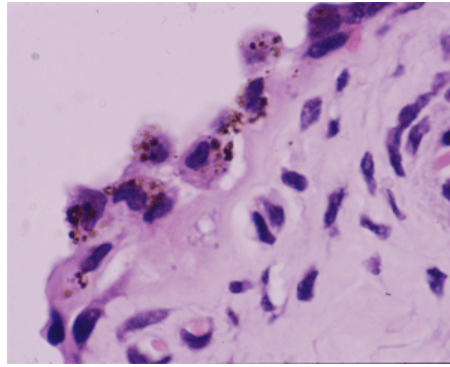


Figure 6: Cytoadhérence de *Plasmodium falciparum* aux syncytiotrophoblastes dans le placenta

source James A. Berkley (<http://www.impact-malaria.com/>)

Le paludisme gestationnel est généralement asymptomatique mais peut avoir de sérieuses conséquences sur le devenir de la mère et du fœtus : anémie maternelle, faible poids de naissance, mort fœtale [41]. En cas d'infection au cours des deuxième et troisième trimestres l'artésunate par voie parentérale est recommandé. Les données disponibles actuellement permettent d'envisager l'utilisation à la fois de la quinine et de l'artésunate (en cas d'échec du traitement à la quinine) au cours du premier trimestre [39]. Le traitement préventif intermittent (TPI) à la sulfadoxine pyrimetamine est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour protéger les femmes enceintes depuis le début des années 2000 [42].

Le paludisme cérébral chez l'homme est dû à l'obstruction de capillaires cérébraux par les hématies infectées. Dix pour cent des enfants atteints de paludisme cérébral ont pour conséquences des déficits neurologiques majeurs [43] et pour beaucoup de ces patients des déficiences cognitives subtiles ont été décrites [44]. Un traitement antipaludique efficace (la quinine ou les dérivés de l'artémisinine) doit être administré sans délai par voie parentérale ou rectale. La chloroquine ou la sulfadoxine-pyriméthamine ne sont plus recommandées [39].

Les enfants de plus de cinq ans qui ont été exposés régulièrement à *P. falciparum* développent une immunité dite « non-stérilisante » (ou immunité « clinique ») qui n'apparaît qu'après un contact continu avec une large variété d'antigènes parasitaires [45–47]. Cette semi-immunité permet au patient d'être protégé contre la déclaration de symptômes, mais ne permet pas d'éliminer les parasites infectants.

## **V-2/ Diagnostics**

La différenciation entre une fièvre palustre et un état fébrile ayant une autre origine est délicate, c'est pourquoi l'OMS recommande désormais que tous les cas suspects de paludisme soient confirmés par un test de diagnostic préalablement à tout traitement.

Le diagnostic se fait soit de manière directe (détection du parasite) soit de manière indirecte (sérologie, détection d'antigène ou d'ADN parasitaire).

A partir du traitement par coloration d'une goutte de sang, la goutte épaisse et le frottis sanguin permettent un diagnostic direct avec une visualisation en microscopie optique des parasites infectants. La goutte épaisse est la technique de référence du diagnostic palustre et le frottis sanguin est principalement utilisé pour la caractérisation des espèces plasmodiales. Ces 2 examens évaluent la parasitémie (nombre de globules rouges infectés par millilitre de sang), indice indispensable pour une bonne prise en charge. La lecture des lames nécessite une bonne formation ainsi que l'achat et l'entretien d'un microscope.

Les tests de diagnostic rapide (TDR) permettant la détection indirecte d'antigènes plasmodiaux sont présentés sous forme de bandelettes. Ils consistent en une chromatographie sur papier où sont fixés des anticorps dirigés contre l'HRP2 (Histidin Rich Protein 2) de *P. falciparum* et/ou contre la pLDH (lactate deshydrogénase) de *Plasmodium* [48]. Ils ont l'avantage d'être simples d'utilisation. Leur spécificité est souvent bonne mais la sensibilité conduit parfois à de faux négatifs (selon la densité parasitaire).

Il est également possible de réaliser un diagnostic indirect par Polymerase Chain Reaction (PCR) ou par Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ces approches sont plus précises, mais sont plus coûteuses, nécessitent une formation et un équipement plus poussés et par conséquent restent aujourd'hui des outils destinés au milieu hospitalier et à la recherche.

## II/ *Plasmodium falciparum* : un défi scientifique

### I / LES STRATEGIES D'ÉCHAPPEMENT DE PLASMODIUM A LA REPOSE IMMUNE

Le polymorphisme et la variabilité génétique sont des caractéristiques essentielles de *P. falciparum*. La variabilité génétique concerne les protéines exprimées à la surface des érythrocytes (ou variants de surface antigénique (VSA)) qui sont codés par des gènes ayant plusieurs copies au sein d'un même génome et induisant ainsi une variabilité intense. Le polymorphisme génétique concerne quant à lui les gènes représentés en une seule copie dans le génome et dépend de l'étendue des allèles disponibles et de la reproduction sexuée.

#### I-1/ Variabilité génétique

Selon les études menées sur les gènes *var* (l'un des gènes les plus polymorphes décrit jusqu'à présent) et le phénotype de cytoadhésion du parasite, le taux de mutation estimé varie entre 2 et 18% par génération [49,50]. Les VSA impliquées dans le phénomène de cytoadhésion sont très variables. Lors d'une infection multi-clonale, la majeure partie des anticorps sont synthétisés spécifiquement contre le VSA le plus représenté (Figure 7 - A). Les parasites porteurs de cet antigène seront neutralisés alors que les parasites mutants seront épargnés. Ils pourront donc se développer et le système immunitaire devra à nouveau produire des anticorps spécifiques du VSA majoritaire. Ainsi ces parasites échappent au système immunitaire.

La Figure 7B représente la mesure de la quantité de parasites réalisée à partir du sang d'un patient infecté. Il en ressort que la persistance du parasite dans le sang pourrait être due aux variations des antigènes présentés à la surface des érythrocytes parasités et qu'ainsi se reflète la complexité du parasite. Cette variabilité démontre toute la difficulté du système immunitaire à éliminer le parasite et par conséquent le réel défi que représente la mise en place d'un vaccin efficace sur une longue durée.

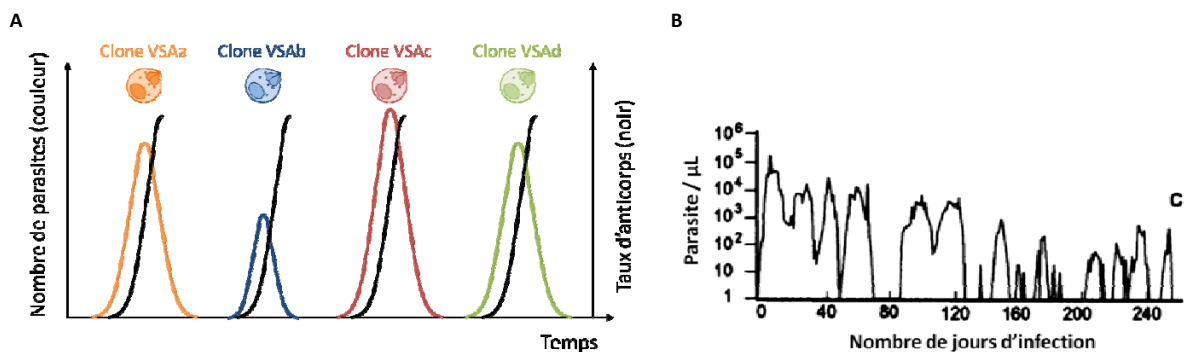


Figure 7 : A. Représentation schématique du mécanisme d'échappement immunitaire. B. Fluctuation de *P. falciparum* dans le sang d'un patient infecté, extrait de la référence [51]. C : dose de chloroquine administrée

### **I-2/ Polymorphisme génétique**

Le polymorphisme allélique de *P. falciparum* est important et contribue également au phénomène d'échappement immunitaire mais dans une moindre mesure que les VSA. Un essai clinique réalisé en Papouasie Nouvelle Guinée a montré qu'un vaccin ne contenant qu'une seule version des allèles naturellement exprimés par le parasite ne peut induire qu'une protection contre les clones portant cet allèle et sélectionne ceux qui ne le portent pas [52].

Ce phénomène explique pourquoi il est nécessaire que le patient soit exposé de nombreuses fois à divers antigènes avant d'acquérir une semi-immunité prévenant les accès symptomatiques [45].

## **II/ LES DIFFICULTES DU DEVELOPPEMENT DU/DES VACCIN(S) CONTRE LE PALUDISME**

Pour rappel, un vaccin passe par 3 phases cliniques se déroulant chez l'homme avant d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché. La phase I permet d'évaluer l'innocuité et la tolérance de ce vaccin. Elle se réalise sur un petit nombre d'individus. La phase II recueille les données d'efficacité et d'immunogénicité auprès de plusieurs centaines de volontaires pendant 2 ans ou plus. La phase III teste l'efficacité, l'immunogénicité et confirme la tolérance au vaccin à grande échelle (entre plusieurs centaines à plusieurs milliers de personnes). Si les résultats de phase III sont conformes, le fabricant dépose une demande d'autorisation de mise sur le marché. Les études de phase IV sont aussi appelées « étude de surveillance suivant la mise sur le marché ». Cette phase post-commercialisation examine la durée de protection et cherche à connaître l'efficacité du vaccin en condition réelle par rapport à son efficacité lors d'essais cliniques.

Certaines études combinent plusieurs phases (annoté phase II/III, par exemple). Il est également possible de réaliser plusieurs fois certaines phases (annoté, par exemple, phases IIa, IIb).

Trois stades dans le cycle de *Plasmodium* peuvent être la cible d'un vaccin : le stade pré-érythrocytaire, le stade érythrocytaire et le stade sexué (Figure 4) [14,29,53–55].

Les approches qui ont jusqu'à présent été développées concernant le stade pré-érythrocytaire ont pour objectif d'empêcher toute libération dans le sang de mérozoïtes provenant du schizonte hépatique. Des résultats prometteurs indiquent qu'un vaccin composé de parasites entiers inactivés par radiation pourrait induire une réponse immune protectrice [56,57]. Une autre approche se penche sur la réponse anticorps anti-Circum Sporozoite Protein (CSP) à la base du vaccin RTS,S. Il s'agit du vaccin anti-paludique le plus avancé. Chez les enfants vaccinés par le RTS,S (phase III), des réductions de 56% du risque de développer un accès palustre et de 47% du risque de développer une forme grave [58] ont été observées. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus dans les études en phase IIb [59,60]. Cependant les résultats de l'étude en phase IIb ont également montré que ce

vaccin n'induirait pas d'immunité stérilisante et que son action s'atténuerait rapidement avec le temps.

Les vaccins visant à stopper le développement des parasites asexués au stade érythrocytaire cherchent à inhiber l'invasion des hématies dans le but de contrôler la parasitémie et éviter ainsi l'évolution de l'infection vers des formes cliniques. Les antigènes candidats sont portés par les mérozoites libérés par les schizontes hépatocytaires ou érythrocytaires et sont essentiellement les Merozoite Surface Protein (MSP)-1, MSP2, MSP3, Apical Membrane Antigen (AMA)-1, Glutamate Rich Protein (GLURP). Des expériences de transfert d'immunoglobulines (Ig) purifiées provenant d'adultes hyper-immuns à des enfants ont démontré que les réponses anticorps jouaient un rôle dans l'acquisition de l'immunité adaptative dirigée contre les stades sanguins de *P. falciparum* [61,62]. De nombreux vaccins sont actuellement en phases I ou II.

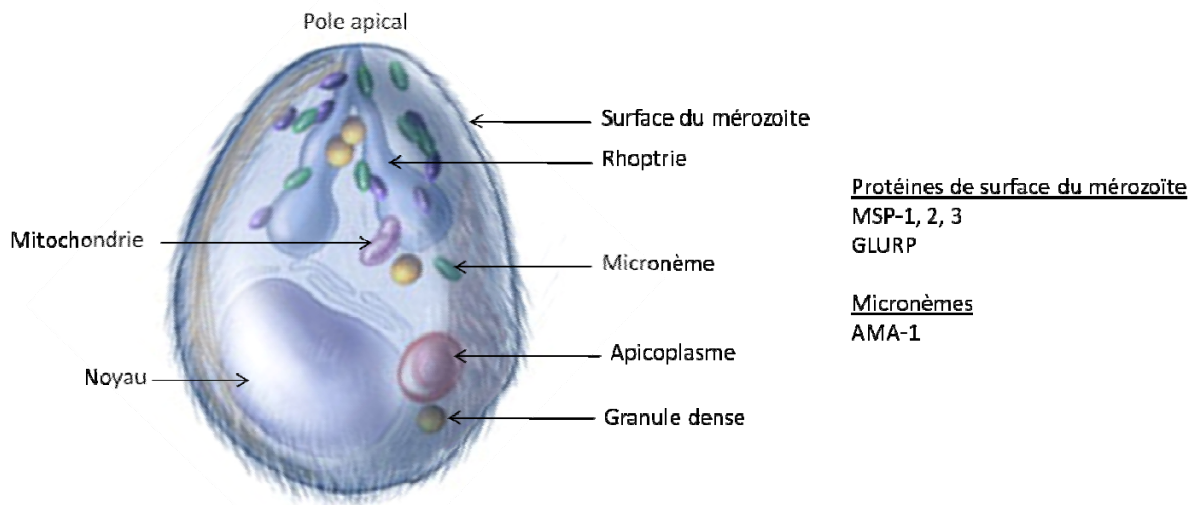
D'autres antigènes des stades sanguins asexués ont représenté par le passé de potentiels candidats vaccins (telle que la protéine ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA)) mais ont été délaissés suite à des essais vaccinaux d'efficacité décevante ou non répétable dans des contextes d'endémicités distincts.

Les vaccins dirigés contre le stade sexué de *Plasmodium* permettraient de bloquer la transmission vectorielle du paludisme. Les antigènes des gamètes en sont la cible. Cependant, pour stopper la transmission, il serait nécessaire de vacciner simultanément toute la population. De plus, cette vaccination ne confèrerait pas de protection individuelle et devrait potentiellement être combinée à un vaccin des stades pré-érythrocytaire ou érythrocytaire.

La complexité du parasite, sa grande diversité antigénique et les stratégies d'échappement immunitaire qu'il a mis en place rendent le développement d'un vaccin difficile. Les stratégies de recherche s'orientent vers des cibles antigéniques particulières tel que peut l'être l'antigène VAR2CSA, dont le tropisme est typiquement placentaire. Des efforts sont actuellement menés pour mettre au point un vaccin spécifiquement destiné à protéger la femme enceinte et son fœtus. Concernant le développement d'un vaccin efficace chez le tout jeune enfant, l'étude de la réponse immune naturellement acquise contre plusieurs antigènes parasitaires apporterait un éclaircissement essentiel [63,64]. Ce travail de thèse s'est concentré sur l'étude de la réponse anticorps spécifique d'antigènes du stade érythrocytaire - stade à l'origine des manifestations cliniques du paludisme.

### III/ LES ANTIGENES DES STADES SANGUINS ASEXUES ETUDIÉS

Les antigènes étudiés ont été sélectionnés suivant plusieurs critères. Ils font partie de la phase érythrocytaire, sont immunogènes, sont des candidats vaccins prometteurs induisant une réponse anticorps protectrice démontrée et des protéines recombinantes les reproduisant sont disponibles. Ainsi, 5 antigènes ont été sélectionnés : AMA1, MSP1, MSP2, MSP3 et GLURP. Ils sont localisés à la surface du mérozoïte (Figure 8) et sont donc accessibles aux anticorps lorsque les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine. Une brève description de ces antigènes est faite dans les paragraphes suivants.



**Figure 8 : Structure et antigènes étudiés du mérozoïte de *P. falciparum***

Schéma composé d'après ceux présentés dans les articles [29,65] ; MSP : Merozoïte Surface Protein, GLURP : Glutamate Rich Protein ; AMA : Apical Membrane Antigen

L'efficacité des anticorps produits après avoir été en contact avec un antigène parasite peut être testée selon 2 méthodes développées *in vitro*. La mise en présence d'IgG provenant de serum (purifiées ou non) et d'une culture de parasites induit l'inhibition de la croissance parasite (« Growth Inhibition Assay » (GIA)) [66,67]. La seconde méthode consiste en la coopération entre les monocytes et les IgG conduisant également à l'inhibition de la croissance des parasites d'une culture (« Antibody-Dependent Cellular Inhibition » (ADCI)) [68].

#### III-1/ Merozoite Surface Protein 1

MSP1 constitue l'une des protéines parasites les plus abondantes exprimée à la surface du mérozoïte [69]. Cette protéine varie de 180 à 225 kiloDaltons (kDa) selon les espèces de *Plasmodium*. Elle est ancrée à la surface du mérozoïte via le glycoposphatidylinositol (GPI). Elle est synthétisée au stade précoce du développement du schizonte et subit une première maturation protéolytique dont est issu un complexe formé de 4 polypeptides ayant approximativement pour tailles 83 kDa, 38 kDa,

30 kDa et 42 kDa [70]. Une seconde protéolyse se déroule au moment de l'invasion dans le globule rouge. Le fragment de 42 kDa est clivé en un fragment de 33 kDa qui n'est plus accessible et en un autre fragment de 19 kDa (MSP1<sub>19</sub>) qui reste fixé à la membrane du parasite (Figure 9). L'inhibition de cette étape essentielle pour le parasite par des inhibiteurs ou des anticorps diminue les phénomènes d'invasion érythrocytaire et de multiplication du parasite [71]. Le fragment de 19 kDa est composé de 2 domaines Epidermal Growth Factor (EGF) like reliés entre eux par des résidus qui lui confèrent une forme rigide et compacte [72–74].

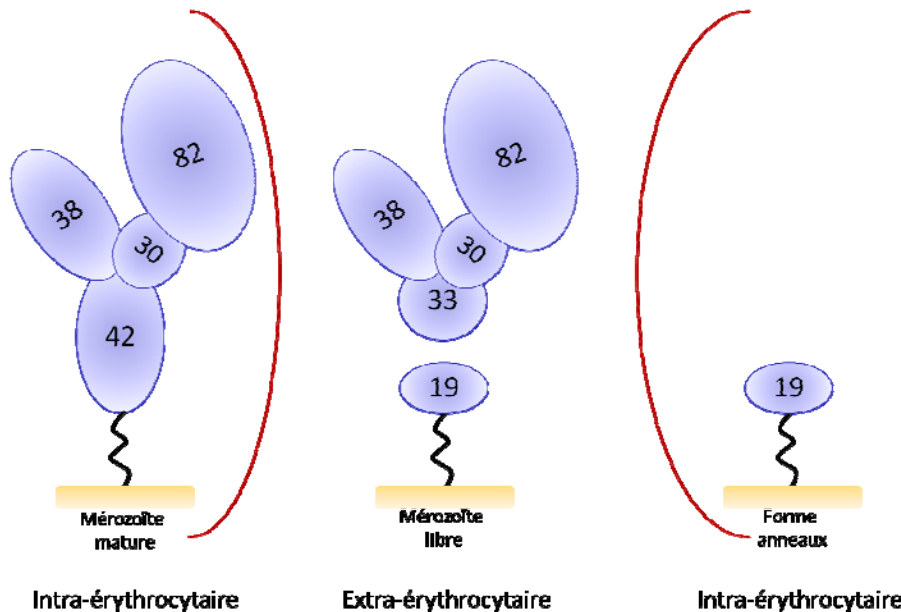


Figure 9 : Quatre fragments constituant MSP1 de *P. falciparum* et localisation du fragment de 19 kDa.

Schéma composé d'après ceux présentés dans les articles [75,76].

MSP1 est une des cibles de la réponse immunitaire développée contre une infection à *Plasmodium*. Siddiqui *et al.*, ont réalisé des immunisations chez le singe *Aotus* avec des protéines MSP1 issues d'isolats et ont observé une forte protection contre les cas létaux de paludisme [77]. Des protections contre les formes virulentes de *Plasmodium* ont été reportées chez le primate ou la souris pour des préparations variées de protéines recombinantes dérivées de MSP1 contenant les 2 domaines EGF like [78–81].

Chez l'homme, certaines études ne montrent pas d'association entre la protection et la présence d'anticorps anti-MSP1<sub>19</sub> [82] ; un essai de phase II chez des enfants kenyans âgés de 1 à 4 ans n'observe pas d'effet protecteur [83] ; et une étude en phase I chez 6 patients a généré une réponse anticorps spécifique de MSP1<sub>42</sub> modérée avec des anticorps n'ayant pas d'activité inhibitrice suffisante *in vitro* [84]. Cependant, une étude cas/témoins chez 150 enfants a observé une protection contre la parasitémie et les formes cliniques en présence d'anticorps anti-MSP1<sub>19</sub> et ont mis en évidence que des enfants n'ayant pas d'IgG spécifique de MSP1<sub>19</sub> ont 10 fois plus de risque de



développer une parasitémie [85]. Egan *et al.*, ont produit une protéine recombinante portant les motifs EGF des 2 principaux allèles de *msp1*. Seulement 10 à 20% des individus composant une cohorte de 200 enfants/adultes exposés au paludisme possèdent des anticorps spécifiques d'un de ces allèles. En produisant une protéine recombinante associant conformationnellement les 2 motifs, plus de 40% des individus sont porteurs d'anticorps reconnaissant cette protéine chimère [86]. En outre, plusieurs études ont mis en évidence la prédominance de la réponse protectrice d'anticorps IgG1 anti-MSP1<sub>19</sub> [86,87]. Du fait d'être exprimé à la surface du mérozoïte, d'être exposé aux anticorps pendant une brève période et de générer une réponse potentiellement protectrice, MSP1<sub>19</sub> semble être une cible intéressante pour agir sur le cycle parasitaire.

### **III-2/ Merozoite Surface Protein 2**

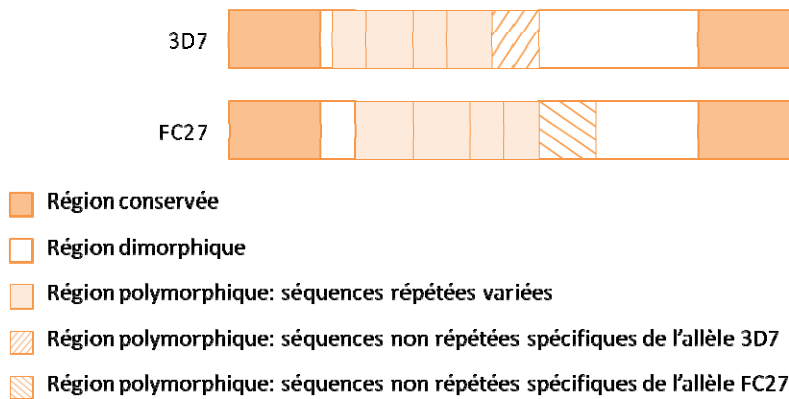
MSP2 est également une des protéines les plus abondantes à la surface du mérozoïte [88] et est ancrée à la membrane parasitaire par un GPI [89]. Sa masse est d'environ 30 kDa et elle a été initialement identifiée à l'aide d'anticorps monoclonaux [90]. A l'inverse de MSP1 et de nombreuses protéines de surface du mérozoïte, il n'a pas été décrit de phénomène de maturation protéolytique de MSP2. Il est présumé que MSP2 est impliqué dans l'attachement du mérozoïte aux cellules érythrocytaires de l'hôte [26].

MSP2 est hautement polymorphe. Elle est constituée de domaines N- et C-terminaux conservés encadrant une région centrale variable. Cette région est constituée de séquences en tandem répétées qui varient en taille, en nombre de répétitions et en séquence. Ainsi, il est possible de distinguer 2 grandes familles alléliques possédant des caractéristiques différentes notamment au niveau des parties variables : 3D7 et FC27 (Figure 10-A) [91–93]. A l'inverse de MSP1<sub>19</sub> ou d'AMA1 qui sont riches en cystéines et ont de multiples ponts disulfures intramoléculaires qui les stabilisent, MSP2 ne possède qu'un seul pont disulfure. En condition physiologique, elle existe sous de nombreuses conformations : elle fait partie des « Intrinsically unstructured proteins » (protéines intrinsèques non-structurées), ce qui explique pourquoi sa structure n'a pas encore été totalement élucidée [26] (Figure 10-B).

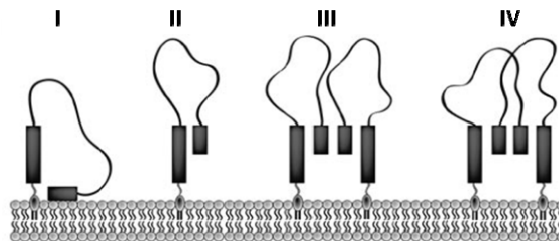
Le gène *msp2* est représenté en une seule copie dans le génome de *P. falciparum*. Etonnamment, il n'a pas été identifié d'orthologue de *msp2* dans le génome des autres *Plasmodium* à l'exception de *P. reichenowi*, un parasite de chimpanzé [94]. De ce fait, MSP2 a été peu évalué quant à ses capacités d'induire une réponse protectrice chez les rongeurs ou les primates. *In vitro*, plusieurs études ont montré que les anticorps spécifiques de MSP2 inhibent la croissance parasitaire [85–88].

Chez l'homme, des études montrent que les régions conservées de MSP2 ne sont pas immunogènes [95,96] et l'équipe de al-Yaman *et al.*, a montré que la région composée de séquences non répétées spécifiques de l'allèle 3D7 était plus particulièrement impliquée [97]. L'étude de Polley *et al.*, (menée sur une population de tous âges) montre que le faible taux d'anticorps spécifiques de MSP2 est associé à une augmentation de la susceptibilité au paludisme alors qu'un fort taux est associé à une protection clinique [98]. D'autres études confirment qu'une immunité clinique est fortement associée à la production d'anticorps spécifiques de MSP2 [97,99,100] et 2 études ont montré que ces anticorps sont généralement des IgG3 [96,101]. Rzepczyk *et al.*, conclut sur le fait que les réponses IgG3 sont de courte durée et requièrent des stimulations répétées pour se maintenir [101]. De plus, plusieurs études ont constaté une forte corrélation entre la réponse anticorps spécifique de MSP2 et l'âge ou les expériences palustres précédentes, ce qui suggère qu'une exposition répétée est nécessaire pour acquérir une immunité clinique.

#### A. Représentation schématique de la structure primaire de MSP-2



#### B. Structures tertiaire et quaternaire hypothétiques de MSP-2



I et II représentent des **monomères hypothétiques** de MSP-2 plaçant la région N-terminale accrochée à la membrane ou à la région C-terminale;

III et IV représentent des **dimères hypothétiques** de MSP-2 avec ou sans domaine croisé.

Figure 10 : Représentation schématique des structures primaire, tertiaire et quaternaire de MSP2 [26,102]

Un vaccin en phase I/II, basé sur la combinaison d'antigènes MSP1, MSP2 3D7 et RESA, se déroulant en Papouasie Nouvelle Guinée, a été testé chez des enfants de 5 à 9 ans. Les résultats montrent une

diminution significative de la densité parasitaire chez ces enfants [52]. Cependant, en 2004, Flück *et al.*, confirment les résultats obtenus par Taylor *et al.*, [96] en montrant que la réponse anticorps dirigée spécifiquement contre une famille allélique ne protège pas contre la seconde famille allélique [95]. Ainsi, ils suggèrent de compléter le vaccin avec une protéine recombinante représentant la deuxième famille allélique de MSP2 ce qui devrait améliorer son efficacité.

Au vu des différentes observations faites sur cette réponse anticorps, il semblerait que ce candidat vaccin soit intéressant. L'étude de l'acquisition de la réponse anticorps spécifique des 2 familles alléliques réalisée au cours du présent travail de thèse chez le tout jeune enfant sera complémentaire des travaux déjà publiés.

### **III-3/ Merozoite Surface Protein 3**

MSP3 a initialement été découverte comme étant la cible d'anticorps provenant d'un serum humain immun de Papouasie Nouvelle Guinée [103] et d'anticorps inhibant la croissance de *P. falciparum in vitro* (test ADCl) [104].

La structure de la protéine n'est pas totalement élucidée. MSP3 est une protéine d'environ 45 kDa qui ne possède pas d'ancrage GPI ni de domaine transmembranaire. Elle est composée d'une partie C-terminale relativement conservée, possédant néanmoins des domaines « leucine zipper like » variables responsables de la dimérisation de la protéine (représentés en vert sur la Figure 11). La partie N-terminale est une région hautement polymorphe contenant 3 motifs « heptad » répétés riches en alanine (représentés en rouge). Ces motifs sont une association de 7 acides aminés H P P H C P C (H : acide aminé hydrophobe, P : acide aminé hydrophile et C : acide aminé chargé). La plupart des polymorphismes de séquence sont localisés au niveau de ces régions qui sont présumées exposées à la réponse immune [105–107].

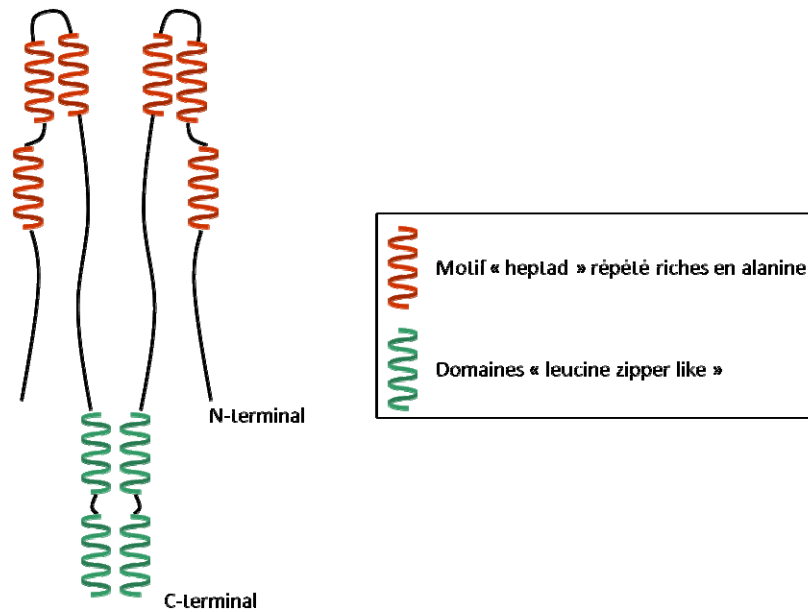


Figure 11 : Représentation schématique de la structure en dimère de MSP3 [105]

Les immunisations chez le singe *Aotus* avec des protéines recombinantes MSP3 entières le protège contre les formes graves [108]. Une autre étude ayant immunisé des *Saimiri sciureus* avec différentes combinaisons de fragments de la région conservée de MSP3/adjuvant a permis de contrôler pleinement ou partiellement leur parasitémie [109]. L'immunisation de souris et de lapins par la protéine complète ou par la partie N-terminale (24 kDa) ne semble pas inhiber l'invasion du mérozoïte ni le développement intra-érythrocytaire, mais réduit la croissance parasitaire *in vitro* (mesure par ADCI).

Chez l'homme, un vaccin en phase I basé sur la partie C-terminale conservée de MSP3 (un long peptide d'environ 70 acides aminés) semble être bien toléré mais ne semble pas stimuler la réponse humorale après immunisation de 30 adultes volontaires [110]. Dans d'autres études, les anticorps produits à partir de ce même peptide par des adultes volontaires inhibent la croissance parasitaire *in vitro* et *in vivo* chez des souris immunodéficientes [111,112], mais ne semblent cependant pas se maintenir dans le temps [29]. Une étude sur l'acquisition de l'immunité antipalustre en Asie du sud a mis en évidence l'association entre les anticorps spécifiques des régions conservées de MSP3/GLURP et une protection contre les formes cliniques. Il a également été montré au cours de cette étude que les anticorps cytophiles produits contre les régions conservées de MSP3 et GLURP étaient corrélés à cette protection [113]. Au regard de ces différents travaux, les réponses anticorps produites contre la partie C-terminale conservée de MSP3 semblent prometteuses.

### III-4/ Glutamate Rich Protein

GLURP est une protéine de 220 kDa exprimée lors du stade schizonte hépatique et à la surface du mérozoïte érythrocytaire [114]. Sa fonction est pour le moment encore inconnue. Elle est constituée

d'une région N-terminale ayant une diversité limitée nommée R0 [115] puis de 2 régions répétées polymorphes annotées R1 et R2.

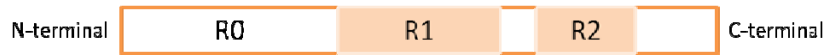


Figure 12 : Schéma de la structure primaire de GLURP [114]

L'équipe de Carvalho a réalisé 2 études sur *Saimiri sciureus* qui montrent d'une part que la parasitémie est partiellement contrôlée après immunisation avec GLURP<sub>27-500</sub> (incluant la région R0) et d'autre part qu'il existe une forte association entre le taux élevé d'anticorps spécifiques de GLURP et une protection clinique partielle [109,116]. Les études réalisées à partir d'anticorps humains sont très prometteuses. Les anticorps spécifiques des régions R0 ou R2 ont été purifiés à partir d'un pool de sérums d'adultes immuns par Theisen et *al.*; aucune purification n'a d'effet inhibiteur direct sur l'invasion par le parasite mais les anticorps agissent en collaboration avec les monocytes pour inhiber la croissance parasitaire *in vitro*. D'autre part, les IgG spécifiques de la région R2 ont un effet inhibiteur plus important que celles de la région R0 [117]. De nombreuses études immuno-épidémiologiques ont établi une association entre les anticorps spécifiques de GLURP et la protection clinique. En effet, l'étude d'Oouvray et *al.*, réalisée au Sénégal, montre une corrélation entre la protection contre les accès palustres et la présence d'IgG2 et d'IgG3 spécifiques de la région R0 et d'IgG3 spécifiques de la région R2 [118]. Doodoo et *al.*, ont suivi une cohorte d'enfants au Ghana et ont observé que les IgG1 dirigées contre la région R0 et les IgG3 dirigées contre la région R2 sont corrélées à la protection contre les formes cliniques du paludisme à *P. falciparum* [119]. L'implication des anticorps cytophiles est confirmée par d'autres études. L'immunisation de souris avec un long peptide synthétique dérivé de la région R0 a permis de conclure sur l'immunogénicité et la spécificité de ce vaccin [120]. Les anticorps générés après immunisation avec ce même peptide de 36 volontaires sont principalement des IgG1 qui inhibent la croissance parasitaire *in vitro* en coopération avec des monocytes [121]. Ces résultats semblent particulièrement prometteurs. Notre étude portera sur la région conservée R0 et la région répétée R2 qui semblent être à l'origine d'anticorps protecteurs.

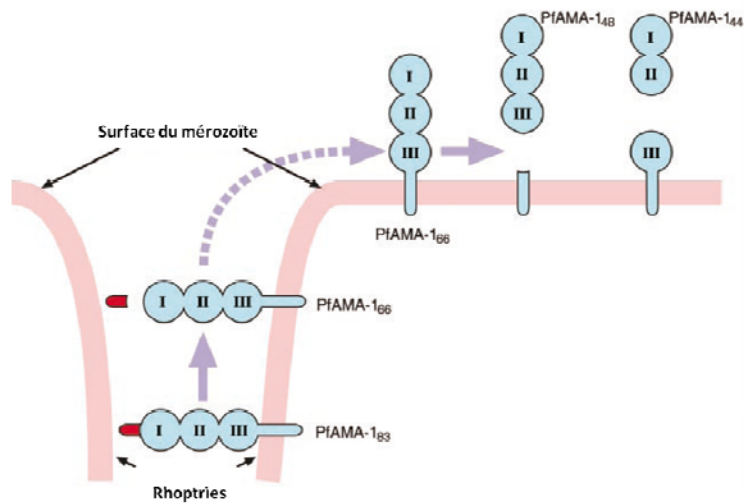
**III-5/ Apical Membrane Antigen 1**

Figure 13 : Processus de maturation protéolytique d'AMA1 [122]

AMA1 est retrouvé à la fois à la surface du sporozoïte hépatocytaire et du mérozoïte érythrocytaire, jouant un rôle essentiel dans l'invasion des cellules hôtes. Seule la phase érythrocytaire sera développée dans ce paragraphe. Le précurseur d'AMA1 (83 kDa) est transporté au niveau du pôle apical du mérozoïte où il subit une maturation protéolytique (Figure 13) qui le convertit en une protéine de 66 kDa. Au moment de l'invasion dans le globule rouge, AMA1<sub>66</sub> est délocalisée à la surface du mérozoïte. La majeure partie de l'ectodomaine d'AMA1<sub>66</sub> est alors clivée en 2 libérant 2 fragments possibles : soit un fragment de 48 kDa soit un autre de 44 kDa. L'ectodomaine d'AMA1, solidement stabilisé par 8 ponts disulfures, est composé de 3 domaines : I, II et III. La structure de la protéine a été confirmée par cristallographie [123].

Récemment, il a été découvert qu'AMA1 joue un rôle majeur dans la liaison du mérozoïte avec le globule rouge [23–27]. En interagissant avec des protéines de la famille RON (rhoptry neck protein), AMA1 formerait un complexe permettant la liaison au mérozoïte (Figure 14). La compréhension de ce mécanisme permet d'envisager l'inhibition de cette étape cruciale et fait d'AMA1 un candidat vaccin séduisant.

Un des obstacles à la mise en place d'un vaccin efficace basé sur AMA1 est que cet antigène possède un important polymorphisme génétique. Une étude longitudinale menée au Mali a examiné la diversité génétique des souches infectantes et ont conclu à 240 formes d'AMA1 différentes sur 506 infections. Ces polymorphismes étaient situés près du site de fixation impliqué dans le phénomène d'invasion [124]. Une seconde étude a mis en place un essai *in vitro* avec des parasites transgéniques

exprimant diverses AMA1, et a montré que les parasites transgéniques n'avaient pas la même sensibilité aux anticorps inhibiteurs que les lignées parentales apportant la conclusion que ces polymorphismes de séquence permettent aux parasites d'échapper à la réponse immunitaire [125].

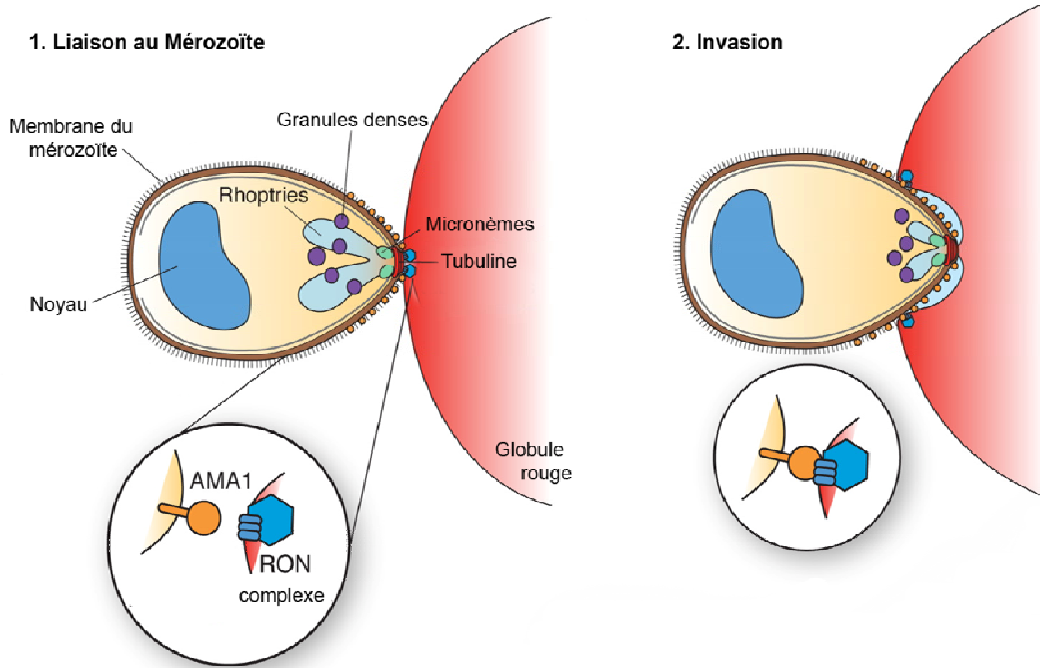


Figure 14 : Modèle des étapes précoces de l'invasion érythrocytaire par le mérozoïte proposé par Richards *et al.* [25]

Néanmoins, une immunisation de *Saimiri sciureus* avec AMA1<sub>66</sub> induit une protection clinique de 4 singes sur 6 (les 2 autres n'ayant produit que peu d'anticorps spécifiques d'AMA1). De plus, les anticorps produits inhibent l'invasion du mérozoïte *in vitro* [126]. Les immunisations chez le singe *Aotus* avec des protéines recombinantes AMA1 entières le protège contre les formes graves [127]. Des immunisations chez la souris avec soit AMA1 entière soit l'ectodomaine d'AMA1 entraîne la production d'anticorps protecteurs. Le transfert passif d'anticorps produits chez le lapin à partir de la protéine recombinante de l'ectodomaine d'AMA1 entraîne également la protection des souris préalablement infectées par la souche de *P. chabaudi adami DS* [128].

Chez l'homme, Stanisc *et al.*, ont réalisé un suivi longitudinal d'une cohorte d'enfant âgés de 5 à 14 ans, en Papouasie Nouvelle Guinée, et ont conclu qu'un fort taux d'IgG3 spécifiques d'AMA1 est fortement associé à une diminution du risque d'infection ultérieure et de haute densité parasitaire [129]. Un essai vaccinal en phase I réalisé à partir d'un mélange égal de protéines recombinantes produites à partir de 2 allèles d'AMA1 a mis en évidence que les anticorps protecteurs produits sont à l'origine d'une réponse immunitaire fonctionnelle. Cependant, la 3<sup>e</sup> dose de vaccin administrée 1 an après la seconde n'induit pas de production importante d'anticorps spécifiques d'AMA1. Cette observation permet de conclure que les anticorps ne perdurent pas et ne permettent donc pas une

protection de longue durée [130–132]. Au vu des observations réalisées dans ces différentes études, de la fonction attribuée à AMA1 et de sa localisation, cet antigène semble être un candidat vaccinal particulièrement intéressant à tester.

### **III-6/ L'acquisition de la réponse anticorps spécifique du paludisme**

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que la réponse anticorps contre les différents antigènes présentés est principalement une réponse cytophile. *In vitro*, chez les animaux ou chez l'homme, la protection conférée par les anticorps produits en réponse à une infection expérimentale est variée. Il a été décrit que, face à certains antigènes, la réponse anticorps générée pouvait ne perdurer que peu de temps et pouvait être spécifique de souche. De plus, il a également été décrit que les IgG spécifiques des antigènes MSP1, MSP2 ou encore AMA1 avaient une demi-vie plus courte que ce qui est généralement admis [133]. Ces observations sont corrélées à celles faites à partir de populations maliennes et ghanéennes exposées qui montrent qu'il est nécessaire d'être infecté de nombreuses fois et par des antigènes variés pour développer une semi-immunité [45–47]. Même si les résultats obtenus dans différentes études montrent que la protection n'est pas uniforme, tous les antigènes étudiés dans ce travail sont à l'origine d'une réponse protectrice. L'ensemble de ces observations permettent de conclure sur le fait que les connaissances sur l'acquisition d'une réponse immunitaire efficace ne sont pas encore suffisantes. Ce travail s'intéresse à ce point en particulier en étudiant la toute première acquisition ou en d'autres termes l'acquisition naturelle de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le nouveau-né.



### III/ Acquisition de la réponse anticorps en présence ou en absence d'infection palustre placentaire

#### I/ ACQUISITION DE LA REPOSE ANTICORPS EN ABSENCE D'INFECTION PLACENTAIRE

##### *I-1/ Le transfert d'anticorps maternels*

Pendant la grossesse, le fœtus est protégé des micro-organismes du milieu extérieur par la mère. A sa naissance, le nouveau-né est exposé à de nombreux pathogènes alors que son immunité acquise n'est pas encore développée. Pendant la grossesse, les IgG maternelles sont transportées à travers le placenta et transférées dans le compartiment sanguin fœtal. Il s'agit d'un phénomène actif de trans-endocytose qui fait intervenir des récepteurs spécifiques Fc $\gamma$  (Figure 15). L'efficacité de ce mécanisme est telle que les nouveau-nés ont à leur naissance un taux d'IgG comparable à celui de la mère [134–137].

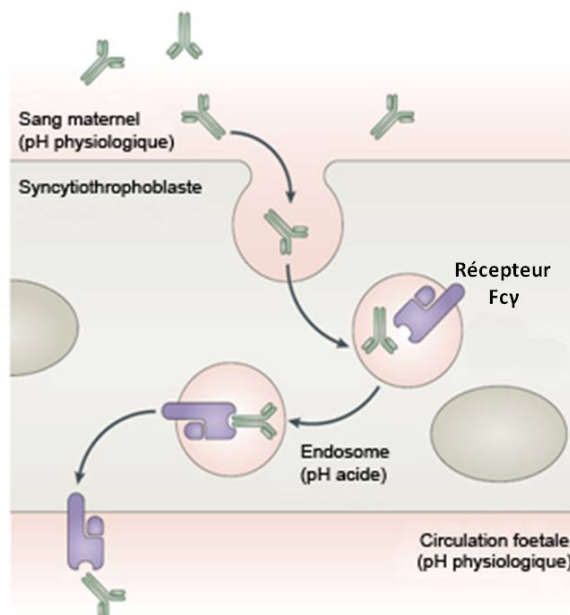


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme actif de transfert d'anticorps de la mère au fœtus pendant la grossesse [135]

Les anticorps maternels protègent donc l'enfant à la naissance et pendant ses premiers mois de vie laissant le temps au système immunitaire néonatal de se développer. Ainsi, après quelques mois, les anticorps de la mère déclineront pour laisser place aux anticorps néo-synthétisés du nourrisson (Figure 16).

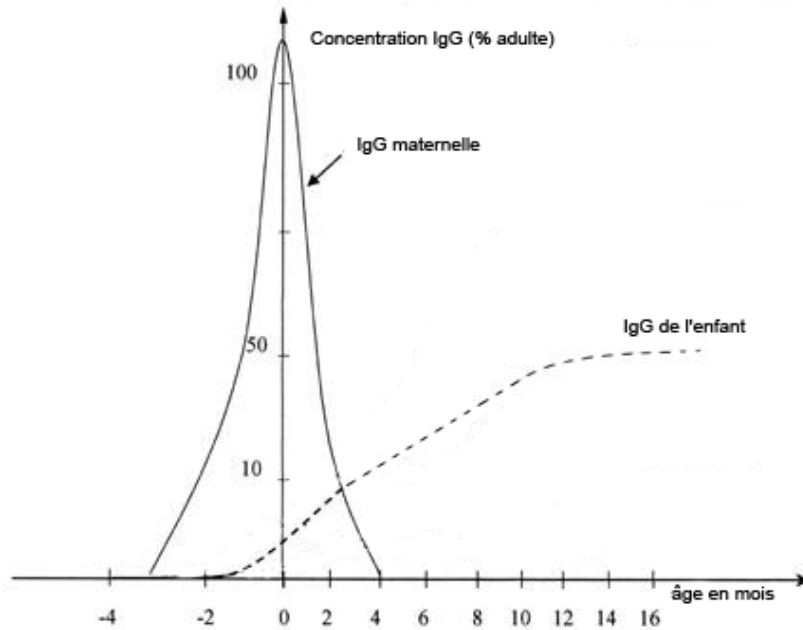


Figure 16 : Ontogénie des Immunoglobulines G maternelles et de l'enfant

Dans le cadre de notre étude sur la réponse anticorps spécifique du paludisme propre au nouveau-né, les premiers mois de vie représentent une zone d'ombre. En effet, les anticorps maternels et néonataux sont mêlés dans le plasma du nouveau-né et les mesures effectuées ne permettront pas de mettre en évidence la part de la réponse attribuée au nouveau-né. Nous nous proposons donc d'essayer d'éclaircir cette zone d'ombre en développant une technique permettant de distinguer les 2 isoformes que représentent les anticorps maternels et néonataux. Ce projet constitue un des objectifs de ce travail de thèse.

### ***I-2/ Les immunoglobulines***

Pour parvenir à distinguer les anticorps maternels et néonataux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la structure des immunoglobulines et à leur polymorphisme d'acides aminés.

#### **I-1-1/ Structure protéique des immunoglobulines**

Les immunoglobulines humaines sont des glycoprotéines constituées de 4 chaînes polypeptidiques identiques 2 à 2 : 2 chaînes légères et 2 chaînes lourdes reliées entre elles par des ponts disulfures. Chacune des chaînes lourdes et légères est constituée de domaines variables et constants (Figure 17).

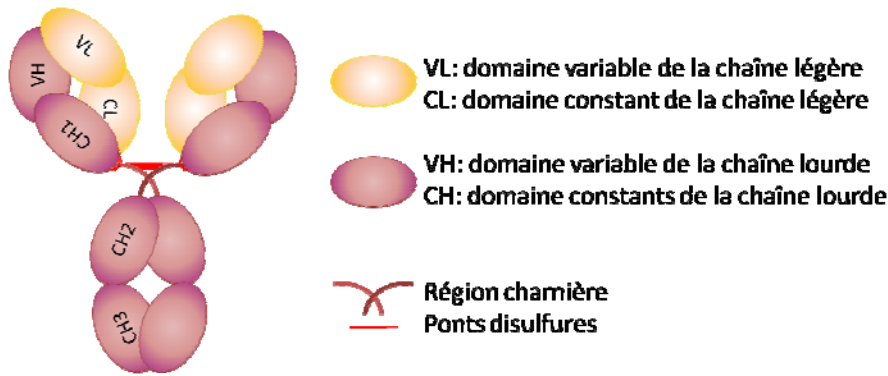


Figure 17 : Structure schématique d'une immunoglobuline G et ses différents domaines

Les chaînes légères peuvent être de 2 types : kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ) et sont communes à toutes les Ig. Les chaînes lourdes sont appelées gamma ( $\gamma$ ), alpha ( $\alpha$ ), mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ) et epsilon ( $\epsilon$ ) et définissent chacune des 5 classes qui sont respectivement et par ordre de concentration décroissante dans le sérum : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Les IgG et les IgA possèdent des sous classes d'Ig : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 et IgA2 représentées par les chaînes lourdes  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  respectivement [138].

#### I-1-2/ Polymorphisme protéique de la région constante d'une immunoglobuline

##### Spécificités propre à l'espèce ou isotypie :

Ces spécificités sont uniformes pour une protéine donnée chez tous les individus d'une espèce animale. Elles sont codées par les différents gènes C (défini dans le paragraphe suivant et sur la Figure 18) et permettent de définir les chaînes lourdes et les chaînes légères des Ig.

##### Spécificités propre à l'individu ou allotypie

Ces épitopes sont portés par les parties constantes des chaînes lourdes et légères des Ig. Au sein de certaines populations, il existe des allotypes prévalents portés par la majorité des individus d'une population donnée.

##### Spécificités propre à la protéine ou idiotypie

Ces spécificités sont portées par la partie variable d'une Ig dirigée spécifiquement contre un antigène. Les idiotypes sont synthétisés par un lymphocyte B (clone) déterminé.

Le polymorphisme de séquence protéique permettant de distinguer un individu d'un autre ou **allotypie** semblerait être adapté à notre problématique de distinction des anticorps maternels et néonataux. En effet, si la mère et le nouveau-né sont porteurs d'allotypes différents (et donc si le

père et la mère ont des allotypes différents), ce polymorphisme pourra être utilisé pour caractériser et distinguer les anticorps maternels de ceux néo-synthétisés.

#### I-1-3/ Polymorphisme génétique de la région constante d'une immunoglobuline

Les segments géniques codant pour les régions constantes des Ig sont appelés gènes C. Sur le chromosome 14 humain, les gènes C des chaînes lourdes (IGHC) de chaque classe et sous classe d'Ig sont ordonnés comme représentés dans la Figure 18.

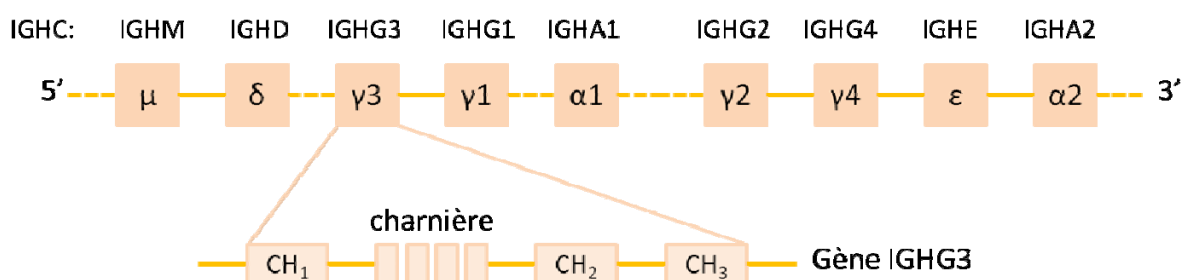


Figure 18 : Ordre des gènes C codant pour les domaines constants des chaînes lourdes d'immunoglobuline localisés sur le chromosome 14 humain

Les régions constantes des Ig ont des séquences nucléotidiques très conservées. Cependant, il existe un certain nombre de nucléotides polymorphes i) 8 d'entre eux sont répartis sur les gènes C $\alpha$ , ii) 15 sur les gènes C $\gamma$  (distribués sur les gènes C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 3) et iii) 2 sur les gènes C des chaînes légères kappa. Ce sont ces polymorphismes génétiques qui codent pour les allotypes.

Du fait de leur proximité sur le gène, des déséquilibres de liaison se produisent et font que certains nucléotides sont hérités ensemble. Les polymorphismes nucléotidiques portés par exemple sur les gènes C $\gamma$ 3 et C $\gamma$ 1 (contigus) conduiront à hériter des **combinaisons alléliques fixes** appelées **haplotypes**. Les haplotypes des IgG sont définis par les combinaisons fixes des allèles IGHG3, IGHG1 et IGHG2 (annotés selon l'ordre des gènes sur le chromosome). Les haplotypes sont codominants. Un individu diploïde possède donc 2 haplotypes et le phénotype de cet individu prendra en considération la part de chacun.

#### I-1-4/ Allotypes

Jacques Oudin introduit en 1956 le terme d'« allotypie » en démontrant que les anticorps de lapins dirigés contre les sérums d'autres lapins possédaient une spécificité permettant de distinguer les individus d'une même espèce [139]. Les nucléotides polymorphes décrits dans le paragraphe précédent codent pour différents acides aminés qui confèrent à la protéine d'Ig une certaine

conformation et donc une **immunogénicité**. L'utilisation d'une immunoglobuline comme un antigène à permis de mettre en évidence ces déterminants antigéniques que sont les allotypes.

Aujourd'hui, 3 principaux systèmes de déterminant allotypiques des domaines constants sont décrits :

- Le système Am : marqueurs des chaînes lourdes des IgA ;
- Le système Gm : marqueurs des chaînes lourdes des IgG ;
- Le système Km : marqueurs des chaînes légères kappa ;

(avec « m » pour marqueurs et par exemple « A » pour IgA).

Les allotypes sont des modifications peptidiques des domaines constants allant de 1 à 3 acides aminés polymorphes (et codés par les nucléotides polymorphes précédemment décrits). Comme les polymorphismes nucléotidiques des chaînes constantes sont hérités par combinaisons fixes, il n'existe pas un grand nombre de combinaisons d'allotypes possibles. Le système Am et le système Km possèdent chacun 3 allotypes et le système Gm possède 18 allotypes localisés sur les chaînes lourdes des IgG:

- i) 4 au niveau de l'IgG1 : G1m(1), G1m(2), G1m(3) et G1m(17),
- ii) 1 pour l'IgG2 : G2m23 et
- iii) 13 pour l'IgG3 : G3m(5), G3m(6), G3m(10), G3m(11), G3m(13), G3m(14), G3m(15), G3m(16), G3m(21), G3m(24), G3m(26), G3m(27) et G3m(28).

Une partie de notre travail s'est focalisée sur l'IgG3 qui s'avère être la plus polymorphe et donc la plus informative des sous-classes des IgG (Tableau 3).

Il est important d'insister sur le fait que la définition des allotypes est basée sur l'immunogénicité des Ig et non sur leurs séquences nucléotidiques ou peptidiques. La technique de référence permettant la caractérisation du phénotype allotypique d'une Ig est l'inhibition d'hémagglutination. Il s'agit d'une technique sérologique qualitative permettant de déterminer le phénotype des Ig en se basant sur leur caractère immunogène dû à la conformation des protéines. Les autres approches de biologie moléculaire ou de protéomique (ou biochimie), permettent par contre de mettre en évidence des polymorphismes de séquences. Cette information fondamentale permet d'introduire la notion d'allotype conformationnel. En effet, il existe des Ig dont les séquences d'allotypes sont strictement identiques mais ont une conformation différente (localisation d'un pont disulfure par exemple), entraînant une immunogénicité particulière. Ainsi, à l'inverse des IgA2 porteuses de l'allotype A2m1, les IgA2 porteuses de l'allotype A2m2 possède un pont disulfure impliquant la cystéine en position 123 du CH1.

Le système des allotypes est complexe et a été succinctement décrit dans ce paragraphe. D'autres notions plus détaillées peuvent être retrouvées dans les ouvrages et les articles suivants [138,140–144].

Allotypes Gm	position des acides aminés									
	domaines CH2									
IMGT	82	83	39	44	84	98	101	115	116	
IgG3*01 (référence)	Pro <u>c</u> cg	Arg <u>c</u> gg	Val <u>g</u> tg	Ser <u>a</u> gc	Met <u>a</u> tg	Gln <u>c</u> ag	Ileu <u>a</u> tc	Arg <u>c</u> gc	Phe <u>t</u> tc	
1. G3m5								Arg <u>c</u> gc	Phe <u>t</u> tc	
2. G3m6				Ser <u>a</u> gc		Glu <u>g</u> ag				
3. G3m10				Ser <u>a</u> gc			Ileu <u>a</u> tc			
4. G3m11				Ser <u>a</u> gc						
5. G3m13				Ser <u>a</u> gc		Gln <u>c</u> ag				
6. G3m14					Met <u>a</u> tg			Arg <u>c</u> gc	Phe <u>t</u> tc	
7. G3m15			Met <u>a</u> tg					His <u>c</u> ac	Tyr <u>t</u> ac	
8. G3m16		Trp <u>t</u> gg								
9. G3m21	Leu <u>c</u> tg									
10. G3m24				Ser <u>a</u> gc			Val <u>g</u> tc			
11. G3m26								Arg <u>c</u> gc		
12. G3m27							Ileu <u>a</u> tc			
13. G3m28								Arg <u>c</u> gc	Tyr <u>t</u> ac	

Tableau 3 : Acides aminés responsable de l'allotypie du système Gm des IgG3 [140]

Une table regroupant les annotations pour les acides aminés et leurs codons est disponible en Annexe 1. L'allèle \*01 de l'IgG3 (IgG3\*01) est la référence pour mettre en évidence les polymorphismes de séquence ; les bases incriminées dans le polymorphisme nucléotidique sont soulignées ; les acides aminés et codons répétés dans le tableau et correspondant à la référence sont essentiels pour faire la distinction entre 2 allotypes.

## I-1-5/ Fréquence des haplotypes d'allotypes dans les populations du monde

Les allotypes d'Ig sont particulièrement informatifs pour décrire la structure génétique et l'histoire d'une population (brassage, migration, peuplement...). Dans chaque population il existe des combinaisons d'allotypes prévalentes. Entre les différentes populations mondiales, les haplotypes prévalents varient. Par exemple, dans les populations amérindiennes, les haplotypes d'IGHG3 sont moins polymorphes que dans les populations d'Afrique du Nord [145]. Les haplotypes Gm les plus fréquents sont représentés dans le Tableau 4:

Provenance	position IMGT	CH2		CH3							
		82	83	39	44	84	88	98	101	115	116
	γ1	Pro	Arg	Val	Asn	Val	Lys	Gln	Val	His	Tyr
	γ2	-	-	-	-	Met	-	-	-	-	-
	γ4	-	-	-	-	-	Arg	Glu	-	-	-
C, N, M	G3m5,10,11,13,14,26,27	-	-	-	Ser	Met	-	-	Ile	Arg	Phe
N	G3m5,6,10,11,14,26,27	-	-	-	Ser	Met	-	Glu	Ile	Arg	Phe
N	G3m5,6,11,24,26	-	-	-	Ser	-	Arg	Glu	-	Arg	Phe
N	G3m10,11,13,15,27	-	-	Met	Ser	-	-	-	Ile	-	-
M	G3m10,11,13,15,16,27	-	Trp	Met	Ser	-	-	-	Ile	-	-
C, M	G3m21,26,27,28	Leu	-	-	-	Met	-	-	Ile	Arg	-

Tableau 4 : Les 6 allèles G3m les plus représentés dans le monde [140,144,146,147]

C: populations caucasiennes; N: populations noires; M: populations asiatiques

L'IgG3 (étant très polymorphe en Afrique sub-saharienne) semble adaptée à notre problématique. Nous proposons d'utiliser une approche par spectrométrie de masse pour distinguer les anticorps maternels de ceux du nouveau-né afin de détecter et quantifier les peptides porteurs d'acides aminés polymorphes provenant soit de la mère, soit de son enfant.

**I-3/ Hypergammaglobulinémie**

Plusieurs études comparant le taux d'anticorps total chez la mère et dans le sang de cordon ont mis en évidence qu'une forte concentration d'IgG dans le sang maternel pouvait être associée à une diminution du transfert d'anticorps. Mais en comparant des couples mères/enfants provenant de France ou du Gabon [148] et d'Allemagne ou du Nigeria [149], il a également été mis en évidence que le taux d'anticorps des femmes africaines est significativement plus élevé; ceci étant probablement dû à une exposition plus forte à des pathogènes divers [150]. Le nombre de récepteurs Fcγ étant limité, le taux d'anticorps transférés l'est également en raison d'un phénomène de saturation de ces récepteurs) [137,151]. Par conséquent, le ratio entre les anticorps maternels et ceux du sang de cordon diminue. L'hypergammaglobulinémie maternelle est donc un facteur

indispensable à prendre en compte pour caractériser le transfert d'anticorps maternels et étudier la réponse anticorps lors des premiers mois de vie.

## **II / ACQUISITION DE LA REPONSE ANTICORPS DANS LE CAS D'UNE INFECTION PALUSTRE PLACENTAIRE**

### ***II-1/ Le transfert d'anticorps maternels***

De nombreuses études ont décrit que le transfert d'anticorps maternels spécifiques de différents pathogènes pouvait être diminué en cas d'infection palustre placentaire [152–155]. Ces études ont pris en compte le taux d'anticorps de la mère à l'accouchement et l'hypergammaglobulinémie. Une étude se déroulant en Gambie et suivant 213 couples mères/enfants a mis en évidence que la prématurité et le faible poids de naissance étaient associés à une diminution du transfert d'anticorps spécifiques de *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* en présence d'une infection palustre placentaire. Les auteurs ont conclu que la réduction du transfert de ces anticorps de la mère au fœtus pourrait rendre les nourrissons plus vulnérables et les prédisposer aux infections bactériennes [154]. Pour ces 4 études, la diminution du transfert d'anticorps variait en fonction de la spécificité de l'anticorps [152–155].

Concernant le paludisme, Rasheed *et al.*, ont montré que les taux d'anticorps spécifiques d'antigènes de stade parasitaire sanguin dans le sang périphérique maternel et dans le sang de cordon étaient fortement corrélés [156]. Une autre étude a conclu que l'infection placentaire n'intervenait pas sur le transfert d'anticorps maternels [157]. Cependant, Bonner *et al.*, ont suivi pendant 1 année 100 enfants nés de mères infectées ou non à l'accouchement et ont observé que les enfants nés de mères ayant un placenta infecté avaient une acquisition réduite d'anticorps spécifiques du paludisme [158]. De plus, Hogh *et al.*, ont observé une plus faible probabilité de développer une infection chez les enfants nés avec des niveaux élevés d'anticorps spécifiques de MSP1<sub>19</sub> [159]. Les observations faites par ces 2 études peuvent permettre de poser la question de l'efficacité du transfert d'anticorps spécifique d'antigènes parasitaires en cas d'infection palustre placentaire.

Un des objectifs de ce travail de thèse sera donc de nous assurer, dans le contexte de notre étude de cohorte, si le transfert d'anticorps spécifiques du paludisme est altéré ou non en présence d'une infection placentaire et si cela a un impact sur la susceptibilité des nourrissons à développer une infection palustre.



## ***II-2/ Tolérance immunitaire : comparaison de l'acquisition de la réponse immune***

Quatre enquêtes épidémiologiques menées au Cameroun en 1997 [160], en Tanzanie en 2005 [161], au Kenya en 2006 [162] et au Gabon en 2008 [163] ont montré que l'infection placentaire joue un rôle déterminant dans la survenue des premières infections palustres des enfants. Le Port *et al.*, confirment ces observations à partir des données recueillies par le programme sur lequel est basé ce travail de thèse [164]. En effet, les enfants issus d'une mère ayant eu un placenta infecté présentent leur première infection palustre plus précocement que ceux nés d'une mère sans infection placentaire relevée à l'accouchement. Une hypothèse de tolérance immunitaire a donc été avancée.

L'accumulation d'érythrocytes infectés dans le placenta crée un environnement inflammatoire important : les leucocytes, incluant les monocytes, se retrouvent dans l'espace inter-villeux et la production locale de cytokines pro-inflammatoires engendre une réponse qui a été corrélée au petit poids de naissance et à l'anémie maternelle [165]. Le rôle majeur de l'immunité innée est de produire des cytokines immunorégulatrices telles que l'interleukine (IL)-12 et l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), qui semblent être essentielles pour le développement de la réponse des cellules T CD4+, des cellules B, des cellules présentatrices d'antigènes (telles que les cellules dendritiques) et de la réponse immune adaptative dépendante d'anticorps. Il a été montré que les lymphocytes localisés dans le sang de cordon produisent moins d'INF $\gamma$  [156,166] et prolifèrent moins bien [166] lors d'une infection palustre placentaire. Fievet *et al.*, ont également montré que l'infection placentaire, définie par la présence de pigment malarique dans les macrophages du sang placentaire recueilli à l'accouchement, était associée à une maturation partielle des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes [167] présentes dans le sang de cordon, ce qui pourrait être à l'origine d'un phénomène de tolérance immunitaire chez le nouveau-né [168]. Il a également été décrit qu'un sous-groupe de nouveau-nés issus de mères infectées pendant la grossesse avaient un phénotype particulier qualifié de « tolérant immunitaire », caractérisé par une augmentation de la production d'IL-10, une anergie des cellules T et une incapacité des cellules mononucléées du sang de cordon à produire de l'INF $\gamma$ . Il est important de noter que ces mêmes enfants ont également un risque accru de développer des infections palustres comparés aux enfants ne possédant pas un tel phénotype [169].

L'accumulation d'érythrocytes infectés dans le placenta est également à l'origine du transfert d'antigènes solubles dans le compartiment foetal [162,170,171]. Cette preuve d'une exposition *in utero* a également été faite par d'autres études qui ont établie la présence dans le sang de cordon d'IgM et/ou d'IgE – isotypes qui ne passent pas la barrière placentaire – spécifiques d'antigènes palustres [156,172,173]. Des études ont même montré qu'il était possible de retrouver de l'ADN

parasitaire dans le sang de cordon [174,175]. Deux études montrent également que la stimulation *in vitro* de lymphocytes B issus du sang de cordon de nouveau-nés vivant en zone d'endémie produisent des IgG spécifiques de MSP1<sub>19</sub> [176,177]. Chacune de ces études ont écarté les possibilités de contamination entre le sang maternel et le sang de cordon en précisant que toutes les précautions avaient été prises. Ces observations prouvent que la sensibilisation *in utero* par des antigènes parasitaires solubles est un phénomène plausible.

En 2005, Bonner *et al.*, ont démontré que l'infection palustre placentaire diminuait le développement de la réponse anticorps spécifique du paludisme pendant la première année de vie, âge considéré comme étant à risque de développer un accès sévère. Les auteurs ont également montré que la différence entre les enfants nés d'une mère infectée ou non s'accroissait après le premier mois de vie [158]. Une autre étude définit les phénotypes d'enfants « exposés » et « sensibilisés ». Les enfants pour lesquels le sang périphérique maternel, le sang de cordon ou le placenta était infecté (examen microscopique et/ou amplification d'ADN) sont considérés comme exposés. Les enfants exposés dont les lymphocytes du sang de cordon sécrètent de l'INF $\gamma$  après stimulation sont définis comme étant sensibilisés. Les auteurs montrent que les enfants sensibilisés *in utero* ont un niveau plus élevé d'anticorps spécifiques de MSP1<sub>19</sub> inhibant l'invasion érythrocytaire *in vitro* et que leurs anticorps sont plus efficaces (et ce jusqu'à 2 ans de vie) que les enfants exposés [177].

Un des objectifs de ce travail de thèse est d'essayer d'éclaircir ce phénomène de tolérance immunitaire d'un point de vue parasitologique afin de vérifier par cette approche indirecte si le contact *in utero* avec des antigènes parasitaires est responsable d'une plus grande sensibilité aux infections palustres.

## IV/ Problématique

Les manifestations cliniques du paludisme sont causées par les stades sanguins de *P. falciparum*. Il semble qu'une semi-immunité n'apparaît efficace qu'après un contact continu avec une large variété d'antigènes parasitaires. Il est donc nécessaire d'étudier simultanément la réponse immune naturellement acquise contre plusieurs antigènes parasitaires. Ainsi, sept antigènes des stades sanguins asexués de *P. falciparum* ont été retenus dans ce projet, en leur qualité de candidats vaccins : MSP1, MSP2 (3D7 et FC27), MSP3, AMA1, GLURP (R0 et R2). Ces antigènes interviennent de façon déterminante dans le développement d'une immunité protectrice dans la mesure où ils induisent la production d'anticorps associés à la protection clinique, notamment les immunoglobulines (Ig) G de type cytophile IgG1 et IgG3.

La plupart des études suivent les enfants jusqu'à la première infection palustre alors que le système immunitaire n'est pas acquis, ou bien réalisent une visite plusieurs mois après cette première infection et observent alors le résultat de la construction de la réponse immunitaire. Les mesures des réponses anticorps, réalisées à intervalles réguliers, comme cela est proposé dans le suivi de cette cohorte de nouveau-nés, représentent un atout majeur pour aider à élucider la mise en place effective de la réponse anticorps antipalustre.

Sachant que les anticorps maternels persistent jusqu'à environ 4 mois de vie chez le nouveau-né, les prélèvements effectués à la naissance, à 3 et 6 mois conduiront au dosage indistinct des anticorps de la mère et de l'enfant. Dans la mesure où notre problématique porte sur la construction de la réponse anticorps propre au nouveau-né, il est nécessaire de distinguer quantitativement les anticorps issus de la mère de ceux qui ont été néo-synthétisés par l'enfant. Aucune équipe ne s'est encore intéressée à cette dissection de la réponse anticorps spécifique chez le très jeune enfant. Les IgG présentent un polymorphisme de leurs séquences protéiques appelé allotypie qui pourrait se révéler être un moyen efficace pour distinguer les anticorps maternels et néonataux, mais il n'existe pas à ce jour de technique permettant la quantification de ces séquences et donc indirectement, des anticorps qui les portent. Dans ce travail, une approche a été mise en place pour distinguer, détecter et quantifier les anticorps de la mère de ceux du nouveau-né lors des premiers mois de vie du nourrisson.

Il a été observé que les enfants issus d'une mère ayant eu un placenta infecté présentent leur première infection palustre plus tôt que ceux nés d'une mère sans infection placentaire. Des études mettent en cause le contact *in utero* avec des antigènes parasitaires solubles. Cette exposition

conduirait le nouveau-né à être tolérant d'un point de vue immunitaire. L'hypothèse de notre travail se base sur le fait que, dans ce contexte, la tolérance du nouveau-né s'exercerait vis-à-vis des antigènes avec lesquels le fœtus a été en contact *in utero*. Certains des antigènes contre lesquels nous étudions la réponse anticorps sont codés par des gènes hautement polymorphes et immunogènes. C'est notamment le cas du gène dimorphique *msp2* (deux familles alléliques 3D7 et FC27) et du gène *glurp*. Pour tester notre hypothèse, les allèles codant pour les antigènes parasitaires présents chez la mère à l'accouchement et chez l'enfant au cours des infections qu'il présentera jusqu'à l'âge de 18 mois seront caractérisés et comparés aux devenir cliniques. Ainsi, nous pourrions, par une approche originale, vérifier si le contact *in utero* avec des antigènes parasitaires est responsable d'une plus grande sensibilité aux infections palustres.

**Objectif principal:**

Le principal objectif de ce travail de thèse est d'étudier la construction de la réponse immunitaire humorale dirigée contre *P. falciparum* durant les 18 premiers mois de vie, chez 600 enfants vivant dans une zone rurale d'endémie palustre, à Tori Bossito, dans le Sud-ouest du Bénin.

**Les objectifs spécifiques sont de :**

- déterminer pour chaque enfant le niveau trimestriel des anticorps dirigés contre plusieurs protéines recombinantes représentant des antigènes des stades sanguins asexués de *P. falciparum* et de détailler l'acquisition de la réponse anticorps de manière globale et en fonction de l'infection placentaire ;
- mettre au point une méthode permettant de distinguer et quantifier les anticorps maternels et néonataux afin de mesurer la part de la réponse anticorps propre au nouveau-né pendant ses premiers mois de vie;
- s'assurer si le transfert d'anticorps spécifiques du paludisme n'est pas altéré par l'infection palustre placentaire et n'est pas responsable, dans ce cas, d'une plus grande sensibilité de l'enfant aux infections palustres ;
- et s'assurer si la plus grande sensibilité à l'infection palustre des nourrissons nés de mères infectées n'est pas due à la rencontre avec des antigènes portés par les parasites infectant la mère à l'accouchement.

# MATERIELS ET METHODES

Le programme dans lequel s'insère ce travail de thèse est un projet multidisciplinaire financé par l'Agence Nationale pour la Recherche en 2006 et dont les opérations de terrain se sont déroulées entre 2007 et 2010. L'objectif principal de ce programme est de mieux comprendre la dynamique d'apparition et d'expression des premières infections palustres chez le nouveau-né. Il a été construit autour de 3 axes qui reprennent les facteurs de risque principaux à savoir : écologique (transmission vectorielle, habitat urbain/rural), biologique (constitution de la réponse immune) et génétique (contrôle de la susceptibilité individuelle à l'infection). L'objectif final de ce programme consistera, lorsque toutes les analyses seront finalisées, à faire des propositions d'interventions en matière de santé publique permettant d'identifier des populations dans des espaces à risque et de protéger prioritairement des groupes à risque ou d'éviter la constitution de situations à risque.

## I/ La zone d'étude

L'étude s'est déroulée dans la commune de Tori Bossito située dans le département de l'Atlantique, au sud du Bénin (Figure 19). Neuf villages ont participé au programme : Avamé, Gbedjougou, Houngo, Dohinoko, Cada Centre, Gbetaga, Zébé, Anavié et Zougoudo. Ces villages ont été sélectionnés en raison de leur proximité avec les centres de santé impliqués dans le programme : Tori Gare, Tori Avamé et Tori Cada. Dans la ville de Tori Bossito même, se situe le laboratoire qui centralisait les échantillons collectés, réalisait les premiers examens biologiques et aliquotait les échantillons.

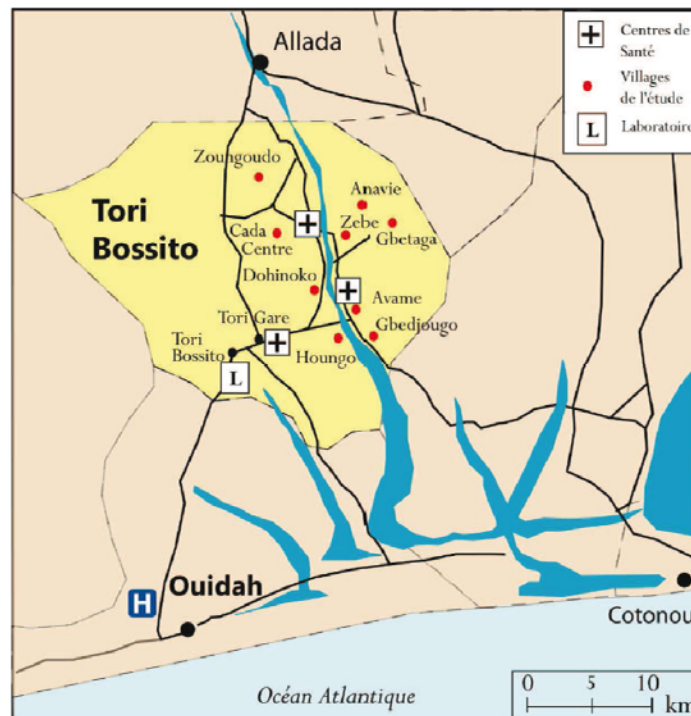


Figure 19 : Zone d'étude et localisation des centres de santé, Tori Bossito, Bénin

Source : C. Pierrat

## II/ Le suivi de la cohorte

### I / PRESENTATION DE LA COHORTE : INCLUSION

Six cent soixante femmes ont été incluses à l'accouchement (Figure 20). Dans l'étude de l'acquisition de la réponse anticorps, 656 enfants ont été pris en considération en excluant 31 femmes et leurs enfants pour des raisons diverses : critères d'inclusion non satisfaits, refus de participer à l'étude, mort-nés, décès ou perdus de vue avant le premier mois de vie.

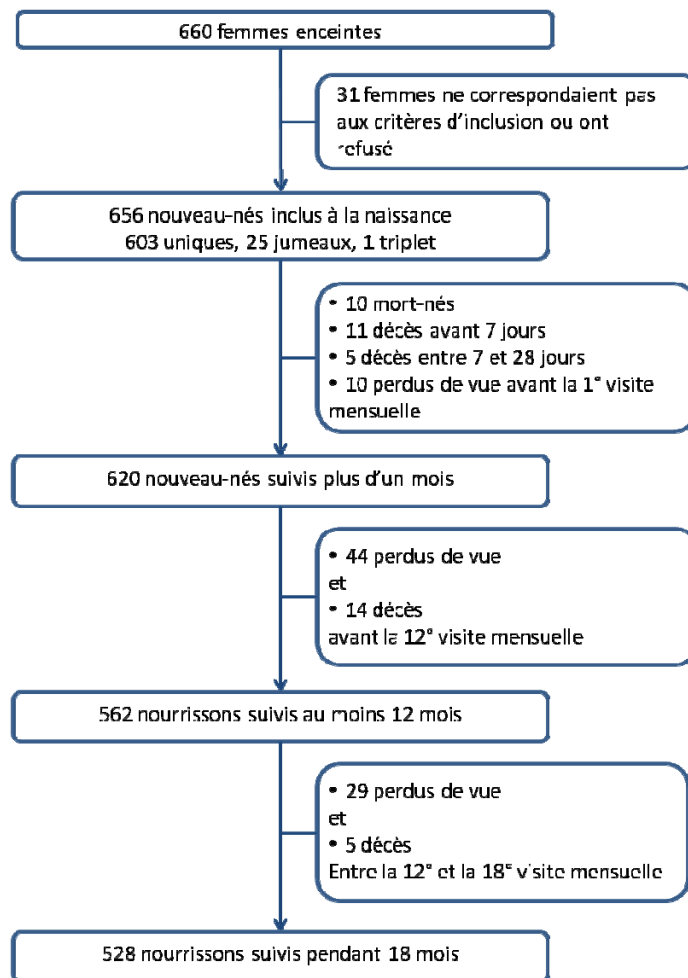


Figure 20 : Diagramme de flux sur 18 mois, Tori Bossito, 2007-2010 [178]

### II / LE SUIVI DES ENFANTS

Les enfants inclus à la naissance ont été suivis régulièrement jusqu'à l'âge de 18 mois (Figure 21).

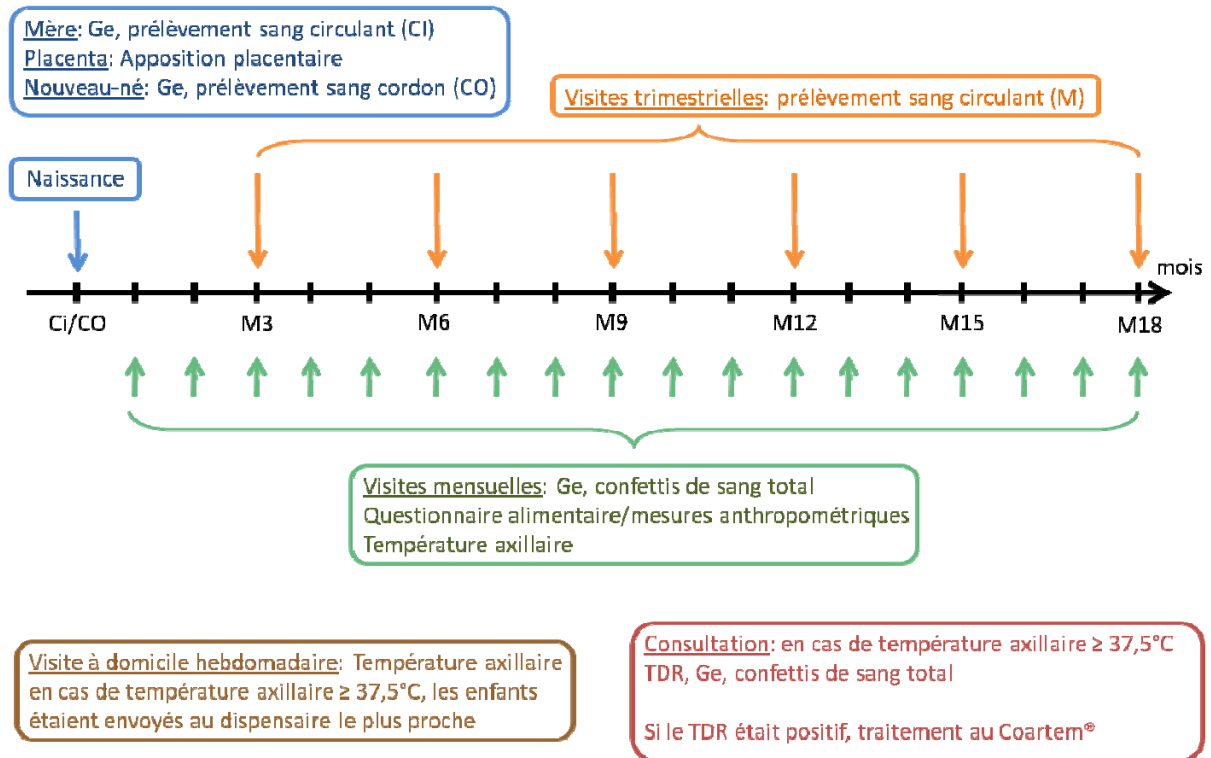


Figure 21: Schéma des données et échantillons recueillis pendant le suivi des enfants de la cohorte [178]

Ge : Goutte épaisse ; TDR : Test de Diagnostic Rapide ; Prélèvements Ci : sang circulant maternel, CO : sang de cordon, M : mois.

### II-1/ Chaque semaine : suivi actif

Une visite à domicile était réalisée pour contrôler la température axillaire. En cas de température supérieure à  $37,5^{\circ}\text{C}$ , il était vivement recommandé à la famille d'amener l'enfant au dispensaire le plus proche.

### II-2/ Chaque mois : suivi actif

Lors de la visite mensuelle qui se déroulait à domicile, une goutte épaisse était réalisée systématiquement afin de détecter les portages asymptomatiques de parasites sanguins de *P. falciparum*. Un questionnaire sur l'alimentation de l'enfant était également posé à la mère et des mesures anthropométriques étaient réalisées.

### II-3/ Chaque trimestre : suivi actif

La visite trimestrielle se déroulait au dispensaire. En plus des données collectées mensuellement, un prélèvement de sang périphérique était réalisé.



#### ***II-4/ Consultations : suivi passif***

En cas d'état fébrile, détecté lors de la visite hebdomadaire ou par la famille, l'enfant était reçu au dispensaire. Que la consultation conduise à une suspicion de paludisme ou non, l'enfant était pris en charge par le programme.

Si la température axillaire dépassait 37,5°C ou si la famille signalait des épisodes de fièvre dans les 48 heures précédentes, un Test de Diagnostic Rapide (TDR), une goutte épaisse et un confetti de sang total étaient systématiquement réalisés. Si le TDR était positif, l'enfant était traité avec du Coartem® (posologie adaptée à son poids).

En cas de problème plus grave, les enfants étaient référés à l'hôpital de zone qui se situe à Ouidah, au CNHU ou à l'Hôpital de la Mère et de l'Enfant - Lagune (HOMEL) à Cotonou.

### **III/ La collecte des échantillons et des données utilisés dans ce travail de thèse**

#### **I / SUIVI PARASITOLOGIQUE ET TRAITEMENT**

##### ***I-1/ A la naissance***

Des gouttes épaisses réalisées à l'accouchement à partir du sang périphérique de la mère et du sang de cordon étaient rapidement colorées et lues au laboratoire de Tori Bossito. Si la goutte épaisse du sang périphérique maternel était positive, la femme était traitée avec de la quinine. En cas de goutte épaisse du sang de cordon positive, un suivi supplémentaire était réalisé auprès des nouveau-nés afin de vérifier que la parasitémie devienne rapidement nulle. Après 3 jours, si la parasitémie était encore positive, l'enfant était traité avec du Coartem®.

Une apposition placentaire était également collectée. Ne rentrant pas en compte dans les décisions du protocole de suivi, la lecture de l'apposition placentaire n'était pas effectuée simultanément à l'accouchement.

Des confettis de sang total maternel, de sang de cordon et de sang placentaire ont été collectés et conservés à 4°C au laboratoire de Tori Bossito puis à Cotonou.

### ***1-2/ Chaque mois***

Lors des visites mensuelles systématiques, une goutte épaisse était réalisée. Ces échantillons n'étaient pas lus en priorité. Dans le cadre d'une infection, soit la parasitémie était contrôlée par le système immunitaire de l'enfant, l'infection était alors asymptomatique et donc non détectée et non traitée (conformément aux recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin) ; soit la parasitémie n'était pas contrôlée, des symptômes se déclaraient et l'enfant était pris en charge par le protocole déjà décrit (visite hebdomadaire, mensuelle ou consultation).

Des confettis de sang périphérique de l'enfant ont également été collectés à chaque visite mensuelle et conservés à 4°C.

### ***1-3/ Chaque consultation***

Que le TDR soit positif ou non, la goutte épaisse était lue au laboratoire. En cas de discordance entre les résultats de TDR (négatif) et de goutte épaisse (positive), du Coartem® était apporté à l'enfant. La bonne réalisation du TDR était généralement incriminée. Les discordances inverses (TDR positif et goutte épaisse négative) n'impliquaient pas de changement particulier du protocole, l'enfant étant traité dans ce cas.

Des confettis de sang périphérique de l'enfant ont également été collectés à chaque consultation et conservés à 4°C.

### ***1-4/ Lecture des lames***

Les lames étaient colorées au Giemsa dilué à 10% dans de l'eau à pH 7 pendant 10 minutes au laboratoire de Tori Bossito. Toutes les gouttes épaisses et appositions placentaires ont été lues 2 fois par 2 lecteurs différents. Le comptage de leucocytes et de trophozoïte était réalisé simultanément et sur plusieurs champs jusqu'à l'obtention de 500 de l'une ou de l'autre catégorie. La parasitémie était calculée selon la formule : nombre de trophozoïtes x 100 / nombre de globules blancs. En cas de discordance des 2 lectures, un troisième lecteur intervenait pour départager et conclure sur la parasitémie. Dans le cas où les 2 lectures ont conclu à une parasitémie positive, la moyenne des 2 mesures étaient prise en considération.

## **II / SUIVI IMMUNOLOGIQUE**

### ***III-2-1/ A la naissance***

Quatre millilitres de sang total maternel et de sang de cordon ont été prélevés dans des tubes Vacutainer® EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique). Au sein de la maternité, ces échantillons étaient conservés dans un réfrigérateur (fonctionnant au pétrole) avant d'être rapatriés (dans une glacière) le plus rapidement possible au laboratoire de Tori Bossito où des aliquots de plasma étaient effectués et conservés à -20°C.

#### ***Chaque trimestre***

Quatre millilitres de sang périphérique de l'enfant étaient collectés chaque trimestre et traités de la même manière que les prélèvements de la naissance. Des tubes Vacutainer® EDTA à ailettes étaient utilisés pour les enfants les plus jeunes selon le confort du préleveur.

L'ensemble des échantillons étaient rapportés au laboratoire de Cotonou 3 fois par semaine, dans une glacière. Les aliquots de plasma étaient alors stockés à -80°C.

#### ***Serothèque***

Les aliquots de plasma étaient réalisés dans des microtubes de 1,2 mL. Quatre aliquots de 600 µL étaient constitués par échantillon. Dans un premier temps, les échantillons étaient rangés au laboratoire de Cotonou par ordre d'arrivée du terrain. La serothèque a été complètement réorganisée par enfant avant de débiter les dosages immunologiques. Sa réorganisation a occupé 2 personnes pendant plusieurs semaines en raison du volume de cette serothèque qui regroupait 4 tubes pour chaque prélèvement, 8 prélèvements par enfant (Ci, CO, M3, M6, M9, M12, M15, M18), et 620 enfants, pour un total d'environ 19 800 tubes et 200 boîtes de microtubes.

## **III / AUTRES SUIVIS : NUTRITIONNEL ET ENVIRONNEMENTAL**

### ***III-1/ Volet nutritionnel***

Chaque mois, des mesures anthropométriques ont été collectées (poids, taille, périmètre brachial des enfants) et un questionnaire complet portant sur l'allaitement et l'alimentation de l'enfant était posé à la mère. Ce questionnaire reposait sur la méthode du « rappel des 24 heures ». La composition de chaque plat que la mère avait donné ou fait goûter à son enfant la journée précédente était recensée de manière à classer chaque ingrédient dans une des 24 catégories d'aliments définies selon les recommandations de l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) [179]. Un Score de Diversité Alimentaire était déduit de ce classement.

### **III-2/ Volet environnemental**

La prise en compte de paramètres environnementaux dans l'étude de la survenue des premières infections palustres est essentielle. Attribuer un risque d'exposition pour chaque enfant du suivi permet d'éliminer le biais environnemental de l'analyse des données biologiques. Ainsi, des mesures géographiques, entomologiques et climatologiques ont été collectées.

Dans la partie géographie, des données GPS des maisons de chacun des enfants du programme ont été positionnées sur l'image satellite de la zone d'étude (SPOT 5, image datant de mai 2003, Figure 22). L'image satellite a permis de recueillir des caractéristiques géographiques de la zone à fine échelle tel que l'indice moyen de végétation (Normalized Difference Vegetation Index) sur un rayon de 100 mètres autour de chaque maison de l'étude. Des données complémentaires concernant les pratiques d'utilisation des moyens de protection contre le paludisme (moustiquaire, insecticide...), la structure de l'habitat (nature des murs et toitures, nombre d'ouvertures...), l'occupation du sol à proximité des maisons et la nature des sols ont également été collectées. L'ensemble de ces données a été cartographié et comparé à la carte définissant les zones de concentration de la morbidité palustre. Une corrélation a ainsi été établie entre ces zones et certains facteurs de risque tels que les toits en tôle, la présence d'animaux domestiques dans les lieux de vie, les maisons éloignées des dispensaires, les zones agricoles ainsi que certains facteurs socio-économiques [180].

Pendant 2 ans, des captures de moustiques ont été réalisées toutes les 6 semaines, pendant 3 nuits consécutives dans chacun des 9 villages de l'étude. Au sein de chaque village, 4 maisons ont été sélectionnées par les entomologistes de l'UMR 224 (Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle ; IRD/Université de Montpellier 1). Les critères de sélection de ces maisons ont pris en compte la proximité des maisons voisines et le fait que la maison ait 2 pièces afin que la famille ne dorme pas dans la même pièce que le captureur. Les captures de moustiques sur « appât » humain étaient réalisées à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la maison de 22 heures à 6 heures du matin. Le lendemain, les moustiques étaient comptés et triés, seuls les anophèles étaient conservés. Des tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permettant de détecter la présence de CSP [20,181], ont permis de déterminer le taux d'inoculation entomologique défini par le nombre de piqûres infectantes par homme et par nuit.

Les données climatologiques ont été recueillies pendant toute la durée de l'étude. Un pluviomètre a été mis en place dans chaque village. Les relevés pluviométriques étaient effectués 2 fois par jour : le matin et le soir à heure fixe. Près des pluviomètres, des puces électroniques ont été disposées. Elles prenaient des mesures horaires de la température et de l'hygrométrie de la zone.

## IV/ Elaboration d'outils méthodologiques à partir des données brutes

### I / SYSTEME D'INFORMATION GEOGRAPHIQUE

La partie géographique a fait l'objet de la thèse de Charlotte Pierrat soutenue en novembre 2010. A partir des données géographiques, entomologiques et climatologiques, une approche de géographie de la santé a permis la construction d'un Système d'Information Géographique (SIG) utilisé pour mettre en relation les zones où se concentrent les différents facteurs de risque et les cas fébriles de paludisme (TDR positifs). Les zones de forte concentration de cas fébriles, aussi appelées « hot spots », ont été définies en prenant en compte les nombres de cas enregistrés dans les maisons de chacun des enfants du programme. L'outil « Hot Spot Analysis » d'arcGIS (laboratoire ESRI) analyse par un système de fenêtre mouvante le nombre de cas survenus dans chaque maison et dans les maisons alentours et assigne à ces maisons un score z. S'il y a un nombre élevé de cas dans la maison d'un enfant ainsi que dans les maisons voisines (appartenant aux enfants du programme), cette zone sera alors définie comme ayant une forte concentration de cas (Figure 22, « hot spot » zone en rouge). S'il y a peu de cas dans une maison et peu de cas alentour, la zone sera alors définie comme rassemblant une concentration de peu (ou pas) de cas ou « cold spot » (zone en vert). Enfin, la zone neutre correspond à un ensemble de maisons pour lesquelles l'analyse n'a pas pu déterminer de concentration particulière de cas (zone en jaune) et sa distribution est aléatoire.

Le GiZscore est la valeur de l'écart type associée aux valeurs p d'une distribution normale. Pour un test significatif à 99% de chances, la valeur de z doit être supérieure à 2,58 (ou inférieure à -2,58) (Figure 38 – schéma B). Dans le cas de la Figure 22, la zone en jaune a été définie comme étant neutre car les valeurs de z sont comprises entre -2,58 et 2,58. Pour les valeurs z inférieures à -2,58, la concentration est significativement forte mais avec un faible nombre de cas (« cold spot ») et pour les valeurs supérieures à 2,58, la concentration est significativement forte avec de nombreux cas (« hot spot ») avec une valeur de p inférieure à 0,01.

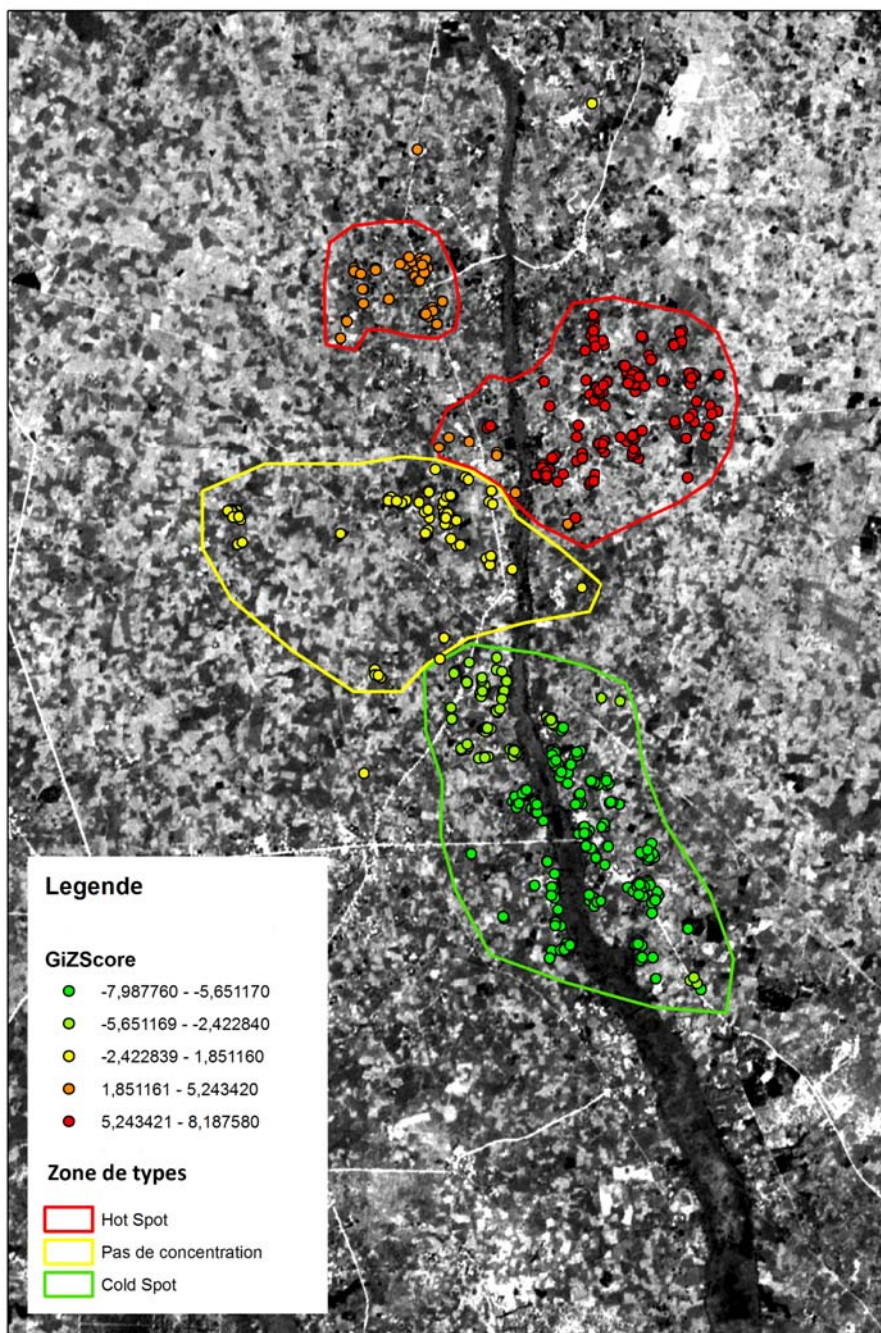


Figure 22: Carte de la zone d'étude de Tori Bossito et situation des zones de fort ou faible nombre de cas fébriles de paludisme [180]

Source C. Pierrat

## II / VARIABLE DU RISQUE D'EXPOSITION

Un modèle mathématique de prédiction spatio-temporelle du risque d'exposition entomologique des enfants a été mis en place par Gilles Cottrell (UMR 216, IRD/UPD), associant les données entomologiques (densités anophéliennes en tous points de captures à chaque mission) aux variables climatologiques (pluviométrie, saisons) et géographiques aux niveaux de village et de la maison. Les variables améliorant significativement la prédiction étaient : le village d'appartenance, la proximité

d'un cours d'eau, le type de sol, l'indice de végétation normalisé à proximité de la maison. Ce modèle a permis d'attribuer une valeur mensuelle de risque d'exposition à chaque enfant.

Ainsi, dans ce programme, les données recueillies ont permis l'étude fine de l'environnement dans lequel grandissent les enfants : la méthode du SIG a pu préciser les facteurs de risque de développer un accès palustre à une échelle aussi fine que la maison [180] et le modèle mathématique a, de manière complémentaire, réussi à prédire les variations spatio-temporelles de la transmission pour chaque enfant [20]. Ces 2 approches ont été utilisées dans 2 volets de ce travail de thèse et ont permis de prendre en compte les paramètres environnementaux influant potentiellement l'acquisition de la réponse anticorps de chaque enfant.

### **III / MODELE POUR LE TRAITEMENT DES DONNEES ANTICORPS**

Les dosages anticorps ont été réalisés par ELISA. Le traitement des données a été réalisé en plusieurs étapes et par plusieurs personnes. Tout d'abord, les densités optiques (DO) obtenues ont été traitées avec la macro ADAMSEL FLP b039 conçue par Ed Remarque (Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, Pays Bas), afin de calculer les concentrations d'anticorps pour chaque mesure (traitement décrit page 60).

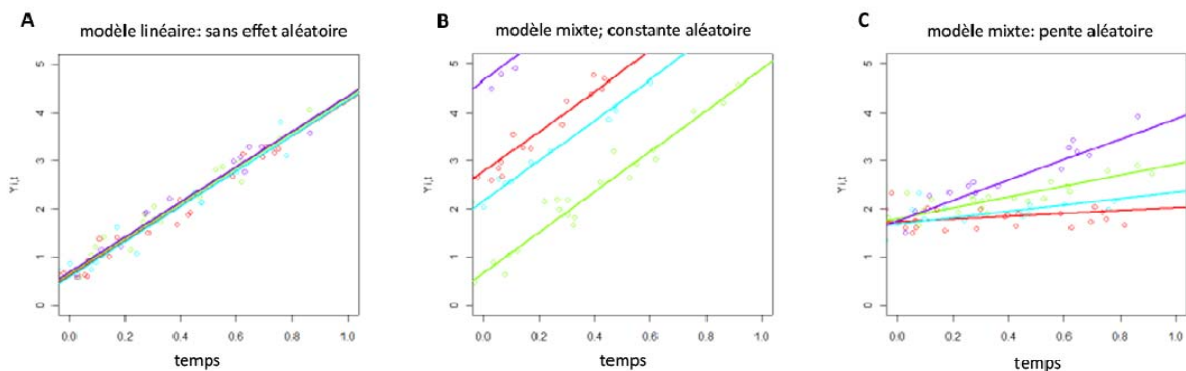
Le modèle mathématique n'a pas utilisé sur les données de concentrations brutes.

La première étape a été de gérer les données manquantes créées lors de la lecture des plaques ELISA. En effet, pour les DO dont la valeur dépassait 3 ou était en dessous du seuil de détection du spectrophotomètre, les valeurs de concentration étaient alors annotées « High » et « Low » respectivement. La gestion de ces données dites « tronquées » a fait l'objet du Master 2 Mathématiques Appliquées - Probabilités Statistiques et Applications de Djénéba Thiam (UMR 8145 - Mathématiques Appliquées à Paris 5 (MAP5)/UPD) encadrée par Grégory Nuel (UMR 8145 - MAP5/UPD) et André Garcia (UMR 216 – IRD/UPD). Son travail a permis de conclure que le remplacement des valeurs hautes et basses des concentrations maximales et minimales relevées respectivement sur cette même plaque ne représentait pas la meilleure solution. Djénéba a mis en place un modèle linéaire à partir des données existantes (non manquantes), basé sur des covariables recueillies à la naissance telles que l'âge de la mère, l'utilisation de la moustiquaire, la prise de TPI, la maternité d'accouchement, la gestité, la prématurité et le sexe de l'enfant. Ce modèle a ainsi pu prédire les données tronquées [182]. A partir des données prédites, l'analyse descriptive de l'acquisition de la réponse anticorps ainsi que l'analyse sur le transfert d'anticorps ont été réalisées.

La deuxième étape a consisté à déduire des concentrations prédites l'effet de l'ensemble des covariables citées ci-dessus. Cette étape permet, en quelque sorte, de rendre tous les enfants comparables et les valeurs résiduelles ainsi obtenues ont été analysées dans le modèle mathématique qui a été mis en place. Le modèle mathématique a analysé les données résiduelles en fonction des variables d'intérêt que sont le risque d'exposition (décrit page 50), la nutrition (page 47), les infections (page 62), l'infection placentaire et les concentrations anticorps de la mère (page 62).

Les données anticorps représentent 8 mesures pour chaque enfant (1 mesure de la mère à l'accouchement et 7 mesures de l'enfant). Le fait que les données de chaque enfant soient répétées dans le temps implique nécessairement de réaliser un modèle à effets mixtes (associant effets fixes et aléatoires) qui puisse prendre en compte le temps. La première étape est de réaliser ce modèle sur chacun des antigènes étudiés. C'est ce travail que je présenterai dans le cadre de cette thèse. Mais le travail sur ces données ira plus loin. La seconde étape sera de faire en sorte que les données des 7 antigènes soient analysées de manière conjointe (et non indépendante), ce qui semble être plus proche de la réalité. En effet, on peut tout à fait supposer que la production d'anticorps dirigés contre un antigène varie en fonction de la production d'anticorps spécifiques des autres antigènes présents lors d'une même infection.

Pour réaliser la première étape (analyse indépendante de chaque antigène), le modèle a été conçu linéairement, en considérant une pente et une constante aléatoires (Figure 23).



**Figure 23: Graphiques représentant un modèle linéaire avec une pente ou une constante aléatoires [183]**

Le choix d'une pente et d'une constante aléatoires s'explique. Le modèle A de la Figure 23 considère que les enfants ont tous la même concentration d'anticorps au début de leur vie (constante fixe) et la même acquisition de réponse anticorps (pente fixe) au cours du temps. Ce modèle ne semble pas tellement satisfaisant car il est tout à fait concevable que les enfants n'aient pas tous le même taux d'anticorps en début de vie (constante aléatoire, modèle B de la Figure 23) ou que l'évolution de ce taux d'anticorps au cours des premiers mois de vie varie en fonction de chacun (pente aléatoire,



modèle C de la Figure 23). Un modèle qui semble encore mieux expliquer les données est celui qui accorderait à chaque enfant la possibilité d'avoir sa propre concentration initiale et sa propre acquisition de réponse anticorps. Mathématiquement, cela se traduit par une droite propre à chaque enfant, soit, une combinaison des modèles B et C (constante et pente aléatoires). L'utilisation d'un modèle avec pente aléatoire seule par rapport au modèle avec pente et constante aléatoires est testée par l'intermédiaire du BIC (Bayesian Informative Criterion). Il s'agit d'un indice statistique qui permet de déterminer le meilleur modèle. Le choix s'est donc porté sur un modèle avec pente et constante aléatoires.

## V/ Les acteurs

Le programme sur le paludisme de Tori Bossito était vaste et a nécessité l'implication de nombreux acteurs :

- Chacun des 3 enquêteurs/infirmiers était responsable d'un des 3 centres de santé de la zone. Leur rôle était d'inclure les femmes et de réaliser le suivi mensuel des enfants. Ils étaient secondés par un quatrième enquêteur/infirmier « volant » ;
- Au sein de chaque centre de santé, nous avons collaboré avec les sages-femmes, les infirmiers, les aides-soignants et les pharmaciens. Leur rôle était d'inclure les femmes à l'accouchement, de réaliser les consultations et de délivrer les traitements adéquats ; Au sein de chaque village, 2 relais communautaires (soit 18 au total) ont réalisé les visites hebdomadaires à domicile et ont secondé les enquêteurs/infirmiers lors des visites mensuelles et trimestrielles ;
- Au laboratoire de base de Tori Bossito, 3 biologistes réceptionnaient les prélèvements, les traitaient et réalisaient les premiers examens ;
- La double lecture microscopique des lames a été répartie entre 6 lecteurs ;
- Un biologiste a assuré le recueil des données entomologiques en supervisant 90 captureurs de moustiques (10 pour chaque village) et a analysé les échantillons collectés. Neuf des 90 captureurs de moustiques avaient également pour rôle de réaliser quotidiennement les relevés pluviométriques ;
- Une équipe réalisant le lien entre le terrain et Cotonou était composée de 3 étudiantes en doctorat (une épidémiologiste, une géographe et une biologiste), 1 volontaire civil international, 3 internes en médecine, 1 logisticien, 1 chauffeur, une secrétaire et des étudiants de Master ou d'école en ingénierie biomédicale;

- La saisie des données a été assurée par 4 agents de saisie et la double saisie validée par les internes en médecine. La base de donnée a été conçue par Agnès Le Port qui réalisait son doctorat en Epidémiologie, et qui a également mis en place toute l'étude sur le terrain.

Plus de 140 personnes ont travaillé à la réussite de ce projet. J'ai intégré ce programme en tant que volontaire civil international un mois après le début des inclusions. Après 6 mois, Agnès Le Port est rentrée en France pour poursuivre son travail de thèse. J'ai travaillé pendant une année complète sur le terrain avant de m'inscrire en doctorat. Ma première année de thèse fut ma deuxième année de volontaire pendant laquelle une période de transition fut nécessaire : j'ai légué la partie terrain/secrétariat à Patrick Pomalegni (logisticien) et Sophie Atiogbe (secrétaire), puis je me suis concentrée à la réorganisation de la serothèque avec Désiré Bonou (un des lecteurs de lames). Avant mon retour en France, j'ai mis en place les dosages immunologiques et formé Aziz Bouraïma (biologiste et entomologiste) qui les a pris en charge.

La mise en place d'outils méthodologiques ayant servi à l'analyse des données biologiques a fait intervenir plusieurs personnes et plusieurs disciplines. Charlotte Pierrat, étudiante en doctorat de géographie, a réalisé un SIG qui a été utilisé dans la partie III (Antigènes solubles et tolérance immunitaire : importance des polymorphismes génétiques des parasites infectants) de ce travail de thèse. Gilles Cottrell a mis en place la variable risque d'exposition qui a été utilisée comme variable explicative dans l'acquisition de la réponse anticorps. Je n'ai pas participé à la mise en place de ces 2 outils. Djénéba Thiam a réalisé son Master 2 sur la gestion des données tronquées et une partie de sa thèse sur la mise en place du modèle mathématique qui a permis l'analyse des données anticorps. Mon travail a consisté au calcul des concentrations en utilisant la macro ADAMSEL, au nettoyage et formatage des données (validation des données brutes, mise en forme des fichiers pour l'analyse mathématique) et à l'analyse descriptive de l'acquisition de la réponse anticorps. Un travail collaboratif a eu lieu tout au long du Master 2 et de la thèse de Djénéba, au cours duquel je lui ai exposé les données recueillies et les hypothèses biologiques associées, tandis qu'elle m'expliquait la façon de traduire mathématiquement ces questionnements biologiques. Notre travail commun nous a permis de nous interroger davantage sur l'acquisition naturelle de la réponse anticorps en nous penchant notamment sur l'existence d'une mémoire immunitaire chez le jeune enfant.

#### Organisation de la suite du mémoire :

Les matériels et méthodes, les résultats et une brève discussion des conclusions, limites et perspectives propres à chaque volet de la thèse seront développés dans les paragraphes qui leur

seront dédiés. Les différentes approches seront ensuite discutées de manière globale dans le paragraphe DISCUSSION GENERALE.

# PARTIE I

## Acquisition de la réponse anticorps du jeune enfant face au paludisme

## Introduction

Dans la littérature, il est décrit qu'il est nécessaire d'être infecté de nombreuses fois et par des antigènes variés pour développer une immunité clinique. Il est également décrit que la réponse anticorps contre les différents antigènes des stades sanguins est variée, n'est pas unanimement protectrice et ne perdure que peu de temps. L'ensemble de ces observations permet de conclure que les connaissances sur l'acquisition d'une réponse immunitaire efficace ne sont pas encore suffisantes. Ce travail porte sur l'étude simultanée de la réponse anticorps à plusieurs antigènes parasitaires, de manière à mieux cerner les mécanismes d'acquisition de la réponse anticorps naturelle chez le nouveau-né. Les antigènes sélectionnés relèvent des stades sanguins asexués (phase symptomatique du cycle parasitaire), sont polymorphes et immunogènes et ont tous été à l'origine d'une réponse protectrice : AMA1, MSP1, MSP2 (les 2 familles alléliques 3D7 et FC27), MSP3 et GLURP (les 2 régions R0 et R2).

## Matériel et méthode

Six cent vingt enfants vivant en zone méso-endémique au sud du Bénin, ont été inclus à la naissance. Ces enfants ont été régulièrement suivis pendant 18 mois et un prélèvement de sang veineux a été collecté trimestriellement. Les dosages ELISA des IgG spécifiques des 7 antigènes ont été réalisés à partir des protocoles standardisés « Afro Immuno Assay ». Les données ont été analysées par un modèle linéaire mixte.

## Résultats

Les antigènes les plus prometteurs semblent être AMA1 et MSP1 pour lesquels une réponse forte est observée. Les taux d'anticorps spécifiques des 7 antigènes sont générés en réponse à une infection mais ne sont pas protecteurs contre les infections futures. Les enfants nés de mères porteuses de parasites placentaires à l'accouchement ont un taux d'anticorps transmis plus faible à la naissance et semblent avoir une réponse anticorps plus faible pendant la première année de vie. L'analyse multivariée a montré que le taux d'anticorps augmente avec l'âge et en présence d'une infection passée.

## Conclusion

La première année de vie des enfants nés de mères infectées à l'accouchement semble être une période de tolérance immunitaire. Nous avons pu observer les prémices des processus de maturation et de mémoire du système immunitaire. Les informations recueillies dans cette étude sont essentielles pour le choix du calendrier de vaccination des tout jeunes enfants.

# I/ Matériel et méthode

## I /CHOIX DES PROTEINES RECOMBINANTES

Sept antigènes ont été sélectionnés en leur qualité de candidats vaccins prometteurs. Les protéines recombinantes correspondantes ont été produites et données par différents collaborateurs.

MSP1<sub>19</sub> a été produite par plusieurs équipes de l'Institut Pasteur de Paris à partir de la souche Uganda-Palo-Alto et exprimée dans un système de cellules d'insectes et baculovirus [184]. PfMSP1-p19S est soluble et est composée des acides aminés aux positions 1-43 assemblés à ceux des positions 1615-1723. Ces 2 séquences ont été sélectionnées parce qu'elles sont conservées [185] et prennent en considération les résidus impliqués dans la conformation de la protéine native (au total 6 ponts disulfures) [74].

MSP2-3D7 et MSP2-FC27 ont été données par des collaborateurs de La Trobe University (Melbourne, Australia). Les protéines recombinantes ont été produites en entier sans la partie N-terminale (possédant un signal pour la sécrétion) ni la partie C-terminale (possédant un encrage GPI). Il s'agit donc des protéines complètes qui possèdent en plus une étiquette « hexa-histidine » en C-terminal. L'étiquette « hexa-histidine » est une succession de 6 histidines servant à la purification et à la reconnaissance de la protéine étiquetée par un anticorps anti-hexa-histidine. Ces protéines ont été exprimées dans *Escherichia coli*. MSP2-3D7 fait actuellement l'objet d'essais vaccinaux en phase I et I/II, seule ou en combinaison avec MSP1 [26,186].

MSP3 a été produite à partir de la souche F32 et exprimée dans *Escherichia coli*. La partie C-terminale, peu polymorphe, a été produite, composée des acides aminés aux positions 212–380. Elle a initialement été produite sous forme de protéine chimère avec GLURP R0. Le potentiel protecteur de la protéine hybride a été démontré *in vitro* par inhibition de la croissance parasitaire (test ADCl) [187]. L'immunisation de singes *Saimiri sciureus* avec la protéine MSP3<sub>212-380</sub> seule a montré que les anticorps produits pouvaient contrôler la parasitémie lors d'une infection expérimentale par *P. falciparum* [109].

GLURP R0 et GLURP R2 ont été produites par le Département Infection-Immunité du « Statens Serum Institute » de Copenhague au Danemark. Les protéines recombinantes ont été produites à partir de la souche parasitaire F32 et exprimées dans *Escherichia coli*. GLURP R0 est nativement codée par les acides aminés 24-489 et la région R2 par les acides aminés 816-1091. Les 2 protéines recombinantes

correspondantes englobent intégralement les régions R0 (acides aminés 25-514) et R2 (acides aminés 706-1178). Les sérums de 114 donneurs provenant du Libéria ont permis de mettre en évidence la réactivité des protéines GLURP R0 et GLURP R2 avec 75% et 94% d'échantillons répondeurs, respectivement. Leur spécificité a également été testée sur 165 échantillons de Danois non immuns [188].

AMA1 a été produite par le Biomedical Primate Research Centre situé à Rijswijk aux Pays Bas. La séquence ADN est issue de la souche FVO et la protéine est exprimée dans un système de levure *Pichia pastoris*. La protéine Pf4mH ainsi produite représente l'ectodomaine complet d'AMA1 allant des acides aminés 25 à 545. Ses propriétés antigéniques et sa conformation ont été validées en utilisant à la fois des anticorps monoclonaux spécifiques d'AMA1 dont les épitopes sont connus et des sérums provenant de région endémique. La non-réactivité de la protéine recombinante a également été testée sur des sérums de donneurs européens non immuns [189].

## II / DOSAGES ELISA

Les dosages ELISA ont été réalisés à partir des protocoles standardisés « Afro Immuno Assay » (AIA) de l'Organisation Non Gouvernementale « African Malaria Network Trust » (AMANET). L'objectif de ces protocoles est de pouvoir comparer aisément les résultats obtenus au cours des études réalisées dans les divers pays endémiques.

Sur chaque plaque ELISA était réalisée une gamme à partir d'IgG polyclonal purifié (Binding Site, France) afin de pouvoir déduire les concentrations de la DO. A la gamme s'ajoutaient des contrôles : un témoin positif constitué d'un pool d'une vingtaine de plasmas d'africains hyper-immuns et un témoin négatif constitué d'un pool de plasma d'européens non immuns.

Brièvement, 0,1 µg de protéines recombinantes diluées dans du PBS a été déposé au fond des puits d'une plaque MaxiSorp Nunc (Thermo Fisher Scientific, Danemark) et a été incubé pendant une nuit à 4°C. Les sites de fixations aspécifiques ont ensuite été bloqués pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de PBS contenant du lait à 3% et 0,1% de Tween 20. Les sérums ont été dilués dans une solution de PBS contenant du lait à 1% et 0,1% de Tween 20. Pour les échantillons où les anticorps maternels prédominaient, les dilutions ont été réalisées au 200<sup>ème</sup> pour toutes les protéines exceptées pour les dosages d'IgG spécifiques d'AMA1 où la dilution était au 2000<sup>ème</sup>. A partir des échantillons de 6 mois (inclus), les dilutions ont été faites au 100<sup>ème</sup> pour les IgG spécifiques de toutes les protéines et au 500<sup>ème</sup> pour les IgG spécifiques d'AMA1. Les sérums ont

ensuite été incubés pendant 2 heures à température ambiante. Après 4 lavages, 100 µL d'anticorps anti-IgG humain couplé à de la peroxydase (1/3000 ; Caltag, United of Kingdom) étaient ajoutés avant une incubation d'une heure à température ambiante. Enfin, la révélation a été faite en moins de 30 minutes à l'obscurité en ajoutant 100 µL de TMB One (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine ; Mast Diagnostic, France) puis 100 µL d'acide sulfurique 0,2M ont stoppé la réaction colorée. La lecture a été faite à 450 nm avec une référence à 620 nm.

Les concentrations d'IgG totales (non spécifiques) ont été mesurées en parallèle de la réponse spécifique. La protéine déposée au fond du puits était un anti-IgG humain polyclonal (Sigma Aldrich, France). La dilution des plasmas (pour les 8 points de mesures de chaque enfant) était au 1 000 000<sup>ème</sup>, le reste du protocole étant identique à celui décrit ci-dessus.

### **III / TRAITEMENT DES DONNEES BRUTES**

Comme il a été brièvement décrit précédemment, les DO obtenues ont été traitées avec la macro ADAMSEL FPL b039 (<http://www.emvda.bio.ed.ac.uk/software.php>) conçue par Ed Remarque (Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, Pays Bas), afin de calculer les concentrations d'anticorps pour chaque mesure. La Figure 24 illustre un des onglets de la macro. Le premier tableau correspond au plan de dilution et le second, aux données brutes (Figure 24 - A). La gamme est représentée graphiquement sur la droite, et les valeurs des points de gamme ainsi que les caractéristiques de la droite de régression sont indiqués sur la gauche (Figure 24 - B).

Cette macro a permis l'analyse automatique et standardisée de toutes les plaques. Pour chaque plaque, les échantillons étaient déposés en duplicat. Pour chaque enfant, 8 mesures étaient collectées et traitées simultanément. Ainsi, sur une plaque, il a été possible de traiter 5 enfants. Pour les dosages IgG spécifiques des 7 antigènes et IgG totales, 992 plaques ont été traitées par Aziz Bouraïma. L'analyse avec la macro m'a demandé 2 à 3 mois de travail.



A

Dilutions

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1		2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
B	2	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
C	4	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
D	8	25000	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
E	16	25000	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
F	32	1	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
G	64	1	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
H	128		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

File Open ama1\_plaque\_260\_267.csv

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.648	0.043	1.939	1.921	2.034	2.084	1.803	1.912	1.721	1.395	0.326	0.395
B	2.347	1.658	1.577	1.620	2.022	1.989	1.727	1.796	1.395	1.242	0.397	0.430
C	2.097	1.699	0.045	0.044	0.836	0.805	0.583	0.582	0.051	0.059	0.053	0.058
D	1.643	0.346	0.979	1.096	0.062	0.055	0.345	0.385	0.216	0.188	0.096	0.093
E	1.098	0.350	0.099	0.086	0.065	0.055	0.100	0.110	0.088	0.085	0.081	0.077
F	0.719	0.047	0.051	0.054	0.052	0.050	0.062	0.065	0.065	0.065	0.065	0.054
G	0.411	0.042	0.058	0.057	0.051	0.044	0.050	0.056	0.072	0.072	0.062	0.047
H	0.230	0.040	0.042	0.041	0.048	0.047	0.048	0.052	0.058	0.050	0.044	0.041

OD Values

Open

Clear

Names

B

File Open ama1\_plaque\_260\_267.csv

Operator cd

Conc	Od1	Od2	OD Avg	Od Pred.
32.000	2.648	<input checked="" type="checkbox"/>	2.648	2.650
16.000	2.347	<input type="checkbox"/>		2.437
8.000	2.097	<input checked="" type="checkbox"/>	2.097	2.095
4.000	1.643	<input checked="" type="checkbox"/>	1.643	1.630
2.000	1.098	<input checked="" type="checkbox"/>	1.098	1.128
1.000	0.719	<input checked="" type="checkbox"/>	0.719	0.701
0.500	0.411	<input checked="" type="checkbox"/>	0.411	0.408
0.250	0.230	<input checked="" type="checkbox"/>	0.230	0.235
0.125		<input type="checkbox"/>		0.141
0.063		<input type="checkbox"/>		0.092
0.031		<input type="checkbox"/>		0.068
0.016		<input type="checkbox"/>		0.056

Regression

R square 0.999629

MeanSq \* 1k 0.20480

MaxOd 2.89208

Scale 0.96778

Xmid 3.20762

Blank 0.0445

Blank CV 5.618%

Blanks

0.047 0.042

Controls

Fit Curve

Initialise Data

Add Comment

Legend

- Od1
- Od2
- Od Pred.

Regression Report

Iter.	Max Od	Scale	Xmid	mean Sq
1	2.8833	0.96142	3.17582	0.210476196256
2	2.8833	0.96142	3.17582	0.210476196256
3	2.8914	0.96679	3.20248	0.205018482170
4	2.8914	0.96746	3.20471	0.204823733288
5	2.8919	0.96763	3.20694	0.204800994369
6	2.8921	0.9678	3.20778	0.204797996375
7	2.8921	0.96778	3.2076	0.204797855816
8	2.8921	0.96778	3.20762	0.204797847972
9	2.8921	0.96778	3.20762	0.204797847549
10	2.8921	0.96778	3.20762	0.204797847519

Figure 24 : Traitement des densités optiques réalisé à partir de la macro ADAMSEL FLP b039

## **IV/L'ANALYSE DES DONNEES**

### ***IV-1/ Analyse descriptive***

Les données anticorps des enfants ont dans un premier temps été analysées de manière descriptive. Pour ce faire, les données brutes ont été utilisées. Lorsque les valeurs étaient tronquées (valeurs de DO supérieures au seuil haut ou inférieures au seuil bas de détection du spectrophotomètre), des données prédites les ont remplacées (plus de détails page 51). Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel Stata XI.

### ***IV-2/ Le transfert d'anticorps***

L'analyse du transfert d'anticorps a été réalisée à partir des mêmes données que pour l'analyse descriptive. Une régression linéaire multivariée a été appliquée après s'être assuré des covariables à prendre en compte dans le modèle. Les covariables testées sont celles décrites par Okoko *et al.*, à savoir le taux d'anticorps de la mère à l'accouchement, l'infection placentaire, la gestité, l'âge et le poids de la mère [155]. Les logarithmes des concentrations d'anticorps (pour la mère et pour le nouveau-né) ont été utilisés (distribution normale vérifiée visuellement par un histogramme). Pour représenter le transfert d'anticorps, un rapport de la concentration d'anticorps du nouveau-né sur la concentration d'anticorps maternels est établi (le logarithme de ce rapport est utilisé dans le modèle).

### ***IV-3/ Analyses univariée et multivariée de l'acquisition de la réponse anticorps***

L'analyse statistique des données anticorps s'est ensuite déroulée en deux temps. Dans un premier temps, une analyse univariée à été faite pour rechercher les covariables (voir ci-dessous) significativement associées à l'évolution du taux d'anticorps dans un modèle de régression mixte univarié. Les variables associées à un seuil de 0,15 ont été intégrées dans l'analyse multivariée. Les variables explicatives utilisées à ce stade sont le risque d'exposition (décrit page 50), les apports nutritionnels (page 47), l'infection placentaire, les concentrations anticorps de la mère dans le sang circulant lors de l'accouchement (Ci), dans le sang de cordon (CO) et le niveau d'Ac dans le sang circulant du jeune enfant à 3 mois (M3), décrites ci-après) et l'infection (décrite ci-après). La prise en compte de l'effet de l'âge a ensuite été effectuée à l'aide d'un polynôme de degré variable selon la réponse anticorps. Le choix du meilleur modèle a été fait à l'aide du BIC.

Les valeurs résiduelles des mesures anticorps obtenues à partir du sang périphérique maternel (Ci), du sang de cordon (CO) et du sang périphérique de l'enfant à 3 mois (M3) (prélèvement pour lequel les anticorps maternels sont encore nettement représentés) ont donc été considérées comme

variables explicatives à ce stade de l'analyse. En effet, il est concevable qu'un enfant ayant reçu et/ou conservant un fort taux d'anticorps maternels soit davantage protégé contre les infections palustres.

Dans la réponse anticorps, il semble essentiel de pouvoir distinguer l'effet d'une infection présente de l'effet d'une infection passée sur les anticorps nouvellement synthétisés. L'infection « présente » se définit comme une infection qui s'est produite dans le trimestre s'achevant par le dosage d'anticorps (ou trimestre en cours). L'infection « passée » est définie comme une infection qui s'est produite avant le trimestre précédent le dosage considéré (entre 6 à 3 mois avant le dosage anticorps). Pour ce faire, 2 variables ont été créées. L'une permet de prendre en considération les infections du trimestre en cours (par exemple entre 12 et 15 mois) et de les associer aux taux d'anticorps présents (à 15 mois). Cette variable a été conçue pour tous types d'infections, qu'elles soient symptomatiques ou asymptomatiques. La seconde variable permet de prendre en compte les infections passées (avant 12 mois, dans notre exemple) et de les associer aux taux d'anticorps présents (à 15 mois). Cette seconde variable a été source de questionnement. En effet, dans quelle fourchette de temps peut-on considérer que les infections passées ont un effet sur la réponse anticorps ? Cette variable a donc été conçue en « fenêtre mouvante » prenant en considération les infections des 6, 9, 12 ou 18 derniers mois. Les 4 modèles ont été testés et le modèle le plus statistiquement satisfaisant a été retenu. De plus, il est tout à fait concevable que la réponse à une infection varie avec l'âge. Par conséquent, l'effet de ces deux variables a également été recherché en fonction du temps. Un modèle linéaire mixte multivarié a donc été mis en place pour faire cette analyse fine de la réponse anticorps. Dans certains cas, des enfants ont été infectés à plusieurs reprises durant le trimestre (jusqu'à 4 infections). La prise en compte de ces cas a été réalisée en créant une variable dichotomique qui a été codée en « absence d'infection » versus « présence d'au moins une infection durant le trimestre ». Dans la suite du document l'effet de la morbidité palustre sur l'évolution du taux d'anticorps sera étudié grâce à cette variable dichotomique. La prise en compte du nombre d'infections ne change pas les résultats des effets de la morbidité sur l'évolution de l'acquisition de la réponse anticorps (résultats non montrés).

## II/Résultats : acquisition de la réponse anticorps

### I / ANALYSE DESCRIPTIVE

Les enfants inclus à la naissance sont au nombre de 656 (Figure 20). Parmi ces enfants, 53 sont des jumeaux (et triplés), 10 sont mort-nés et 31 sont perdus de vue ou décédés au cours du suivi, majoritairement dans leurs premiers mois de vie, et pour lesquels aucun dosage anticorps n'est associé. Sur les 562 enfants, 14 n'avaient pas de covariables associées aux dosages anticorps. Enfin pour générer les résidus de chaque individu, aucune des covariables entrant dans le modèle ne doit avoir de valeurs manquantes, or 29 individus n'ont pas un jeu de données complet (2 pour le TPI, 25 pour l'âge gestationnel et 2 pour l'âge de la mère).

En conséquence, l'analyse repose sur 519 enfants, qui se partagent en 240 (46,24%) enfants n'ayant « jamais » été infectés et 279 (53,76%) ayant été infectés au moins une fois au cours du suivi. Bien entendu, même si ce suivi était régulier et rigoureux, il est probable que certaines infections n'aient pas été détectées.

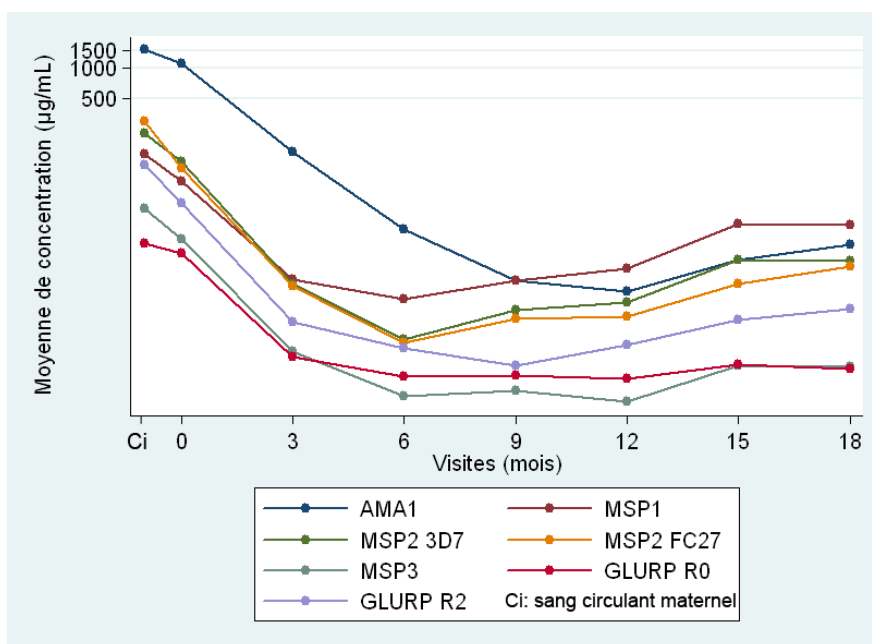


Figure 25 : Moyenne générale des concentrations d'anticorps spécifiques des sept antigènes en fonction du temps

Il a été mis en évidence que le nombre d'enfants infectés augmentait avec l'âge. Ainsi, 23 enfants ont été infectés au moins une fois avant leur 3 mois contre 137 enfants infectés à 18 mois. Entre 12 et 15 mois, le nombre d'enfants infectés est multiplié par 2, passant de 67 à 110 enfants (Figure 28). Ainsi, s'illustre sans doute la diminution du taux d'anticorps maternels dans le sang périphérique des enfants et la protection qu'ils conféraient. Une autre explication possible serait que les enfants plus

âgés dormiraient moins sous moustiquaire que lorsqu'ils sont très jeunes, et seraient davantage exposés aux piqûres infectantes.

La Figure 25 présente de manière générale, la moyenne du taux d'anticorps spécifiques de chaque antigène, tout au long du suivi. Dans cette figure, il semble que les anticorps maternels persistent jusqu'à 6 mois de vie pour la majeure partie des antigènes, laissant lentement place aux anticorps néo-synthétisés de l'enfant. Pour les anticorps anti-AMA1, dont la concentration initiale est nettement plus importante que celles des 6 autres antigènes, la courbe remonte à partir de 12 mois. A 18 mois, les antigènes dont les réponses anticorps ressortent de manière prépondérante sont MSP1, AMA1, puis MSP2. GLURP R2 donne une réponse intermédiaire alors que GLURP R0 et MSP3 n'induisent pas de réponse anticorps importante. Cet ordre « d'arrivée » peut suggérer l'importance de la réponse anticorps spécifique de ces antigènes.

Il serait intéressant de voir comment la réponse anticorps spécifique du paludisme évolue chez les enfants n'ayant jamais été infectés au cours de ce suivi en comparaison de celle des enfants l'ayant été au moins une fois. Une des problématiques de ce travail était de savoir si l'acquisition de la réponse anticorps spécifique du paludisme est différente entre les enfants nés d'une mère impaludée à l'accouchement et ceux nés d'une mère non impaludée. La Figure 26 représente la moyenne générale des IgG totales et des anticorps spécifiques d'AMA1, de MSP1 et de MSP2-3D7, selon l'infection placentaire et l'infection au cours du suivi.

Les mesures de concentrations d'IgG totales chez les mères et leurs enfants n'ont révélé aucune anomalie particulière. Les enfants ayant un taux d'IgG totales non spécifiques en dessous de la moyenne (variant de  $2,3 \text{ g.L}^{-1}$  à  $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  selon l'âge) ne sont pas particulièrement sujets aux infections palustres. Dans la Figure 26, on constate une chute du taux moyen d'anticorps à 3 mois plus forte pour les enfants issus de mères infectées par *P. falciparum* à l'accouchement. Après 3 mois, le taux moyen d'anticorps remonte jusqu'à 12 mois puis semble se stabiliser. Entre 3 et 12 mois, le taux moyen d'anticorps des enfants nés de mères porteuses de parasites placentaires reste plus faible, ceci étant probablement dû au fait que leur taux d'anticorps à 3 mois était très bas. Après 12 mois, les 4 courbes ne se distinguent plus vraiment.

Dans la Figure 26, la période entre 3 et 12 mois correspond au moment où les anticorps de l'enfant prennent le relais des anticorps maternels. Pendant cette période, les courbes des concentrations d'anticorps appartenant aux enfants infectés au moins une fois commencent à se séparer de celles

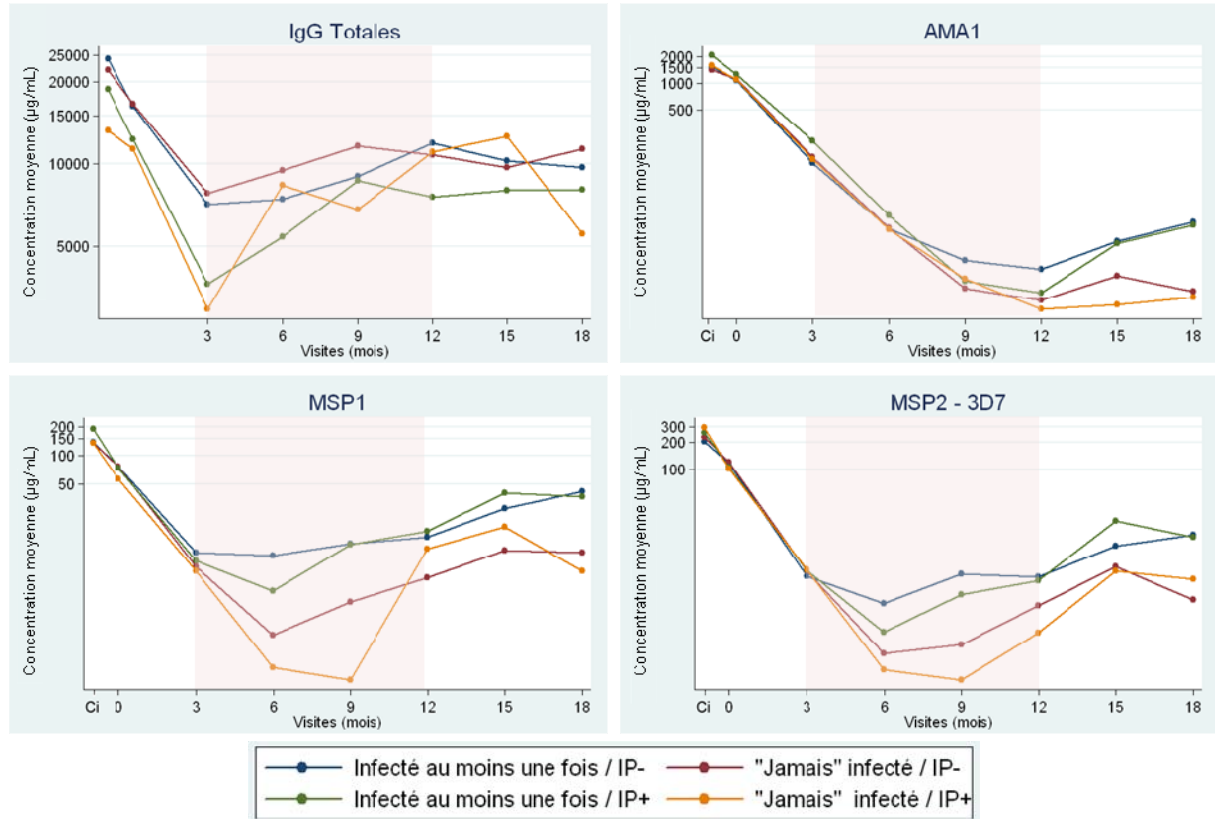
des enfants n'ayant pas été infectés pendant tout le suivi. Cette distinction s'accroît jusqu'à la fin du suivi. Ce profil est le même pour les différents antigènes étudiés (y compris pour ceux dont les graphiques ne sont pas montrés). AMA1 est le seul antigène pour lequel on ne constate pas de différence avant 12 mois, mais cette différence de réponse s'intensifie à la fin du suivi. Ceci suggère, comme il était attendu, que les enfants infectés produisent plus d'anticorps. Ceci semble également confirmer que les enfants ayant le statut « jamais infecté » l'ont sans doute été, mais le suivi mis en place n'a pas détecté ces infections. Enfin, concernant le taux d'anticorps spécifiques d'AMA1, le profil obtenu est similaire aux autres antigènes mais décalé dans le temps, probablement à cause de sa forte concentration initiale (dans le sang périphérique maternel).

Pour les différents antigènes présentés, on constate qu'à partir de 9 à 12 mois les anticorps des enfants nés de mères infectées à l'accouchement présentant eux-mêmes des infections (courbe verte) ou non (courbe orange) sont en concentration moindre que les anticorps des autres enfants (courbes bleus et rouge). Ce profil semble étayer l'hypothèse de tolérance immunitaire : dès que les anticorps maternels s'épuisent, les enfants nés d'une mère infectée par *P. falciparum* à l'accouchement développeraient une réponse anticorps plus faible. Des profils similaires sont représentés dans les graphiques des concentrations d'anticorps anti-MSP1 et anti-MSP2-3D7 mais de manière plus précoce. En effet, on constate que pour ces deux antigènes, c'est entre 6 et 9 mois que les concentrations d'anticorps des enfants nés de mères porteuses de parasites placentaires à l'accouchement sont plus faibles. Après 9 mois, les tendances s'inversent.

Pour l'ensemble des 3 antigènes montrés dans la Figure 26, à 18 mois, les effets potentiels de la tolérance immunitaire ne sont plus visibles : les courbes des enfants nés de mères impaludées (enfants infectés au moins une fois ou jamais au cours du suivi) se rejoignent. Il en est de même pour les enfants nés de mères non infectées par *P. falciparum* à l'accouchement. Ces observations mettent en évidence que la période de tolérance immunitaire se situerait entre 6 et 12 mois au moment de la transition entre les anticorps maternels et ceux du nouveau-né et que ce moment dépend de la concentration initiale d'anticorps maternels transmis. Les graphiques de la Figure 26 sont représentatifs des différents profils de réponses observés pour les autres antigènes, sauf pour GLURP R0 où la réponse est très faible et dans ce cas, les profils des 4 courbes ne sont pas différents les uns des autres.

Concernant l'acquisition de la réponse anticorps en elle-même, on peut se demander si son évolution varie en fonction du moment où l'enfant est infecté pour la première fois. Est-ce qu'un enfant infecté pour la première fois à 15 mois aura une évolution de réponse similaire à celle d'un enfant infecté

pour la première fois à 3 mois ? Ou est-ce que, même sans infection palustre, la réponse d'un enfant infecté pour la première fois à 15 mois induira une production d'anticorps plus importante ? Enfin, quelle est la part de la protection maternelle dans ces observations ?



**Figure 26 : Moyenne globale des IgG totales ou spécifiques d'antigènes parasite en fonction de l'infection placentaire et de l'infection au cours du suivi**

IP : Infection Placentaire, Ci : sang circulant maternel à l'accouchement, fond rosé : période de transition entre les anticorps maternels et les anticorps de l'enfant

La Figure 27 représente l'évolution de la réponse anticorps en fonction du moment de la première infection. Par graphique, seuls sont représentés les enfants pour lesquels l'infection a eu lieu pendant le trimestre en cours et l'évolution de leurs réponses anticorps. Ainsi, parmi les 279 enfants infectés au mois une fois, 25 ont eu une infection pour laquelle aucun prélèvement n'est associé. Il reste donc 254 enfants répartis au sein des différents trimestres en fonction de la survenue de leur première infection palustre.

Les infections qui ont lieu avant 6 mois d'âge n'induisent pas particulièrement de réponse anticorps lors de la visite suivant l'infection. Les anticorps maternels sont encore présents, protègent les enfants et ces infections n'induisent pas une production d'anticorps néo-synthétisés supérieure à la concentration d'anticorps maternels. Entre 6 et 9 mois, une augmentation de la concentration d'anticorps suite à l'infection est notable, notamment pour MSP1. Suite à cette infection, la

concentration d'anticorps reste plus élevée que pour les enfants dont la première infection était avant 3 mois. Les premières infections survenant après 9 mois sont marquées par une augmentation encore plus nette de la concentration d'anticorps. La réponse anticorps contre l'antigène AMA1 n'apparaît qu'après 12 mois, conformément aux conclusions tirées précédemment (la majeure partie des anticorps maternels spécifiques d'AMA1 ne sont plus présents après 12 mois).

Ces observations suggèrent que la réponse anticorps des tout jeunes enfants augmente en fonction de l'âge auquel la première infection survient, tout comme le nombre d'infections augmente avec l'âge de l'enfant. Par conséquent, une analyse plus poussée qui permettrait de distinguer l'effet cumulé des infections et l'effet de l'âge sur la hausse du taux d'anticorps est nécessaire.

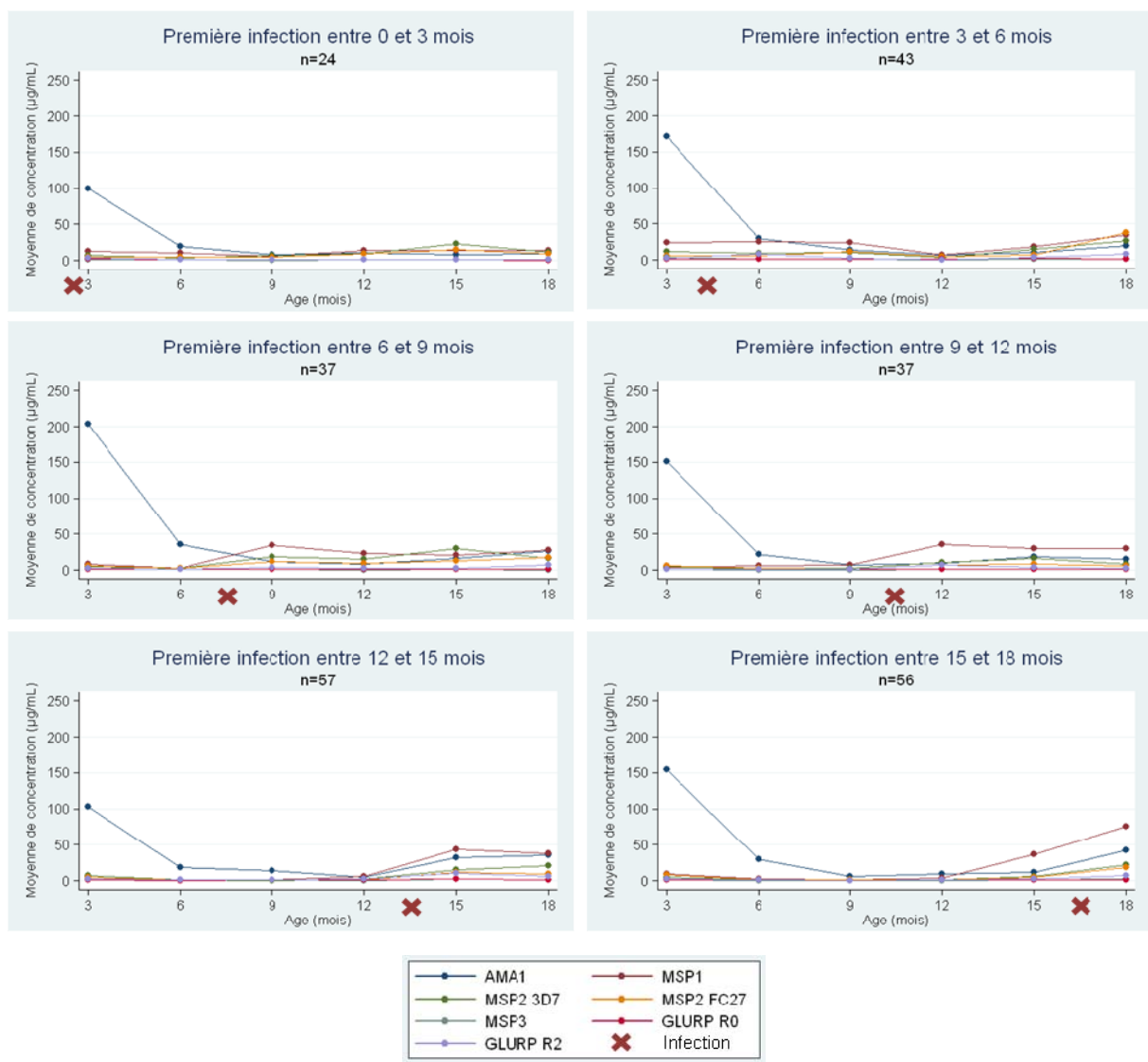


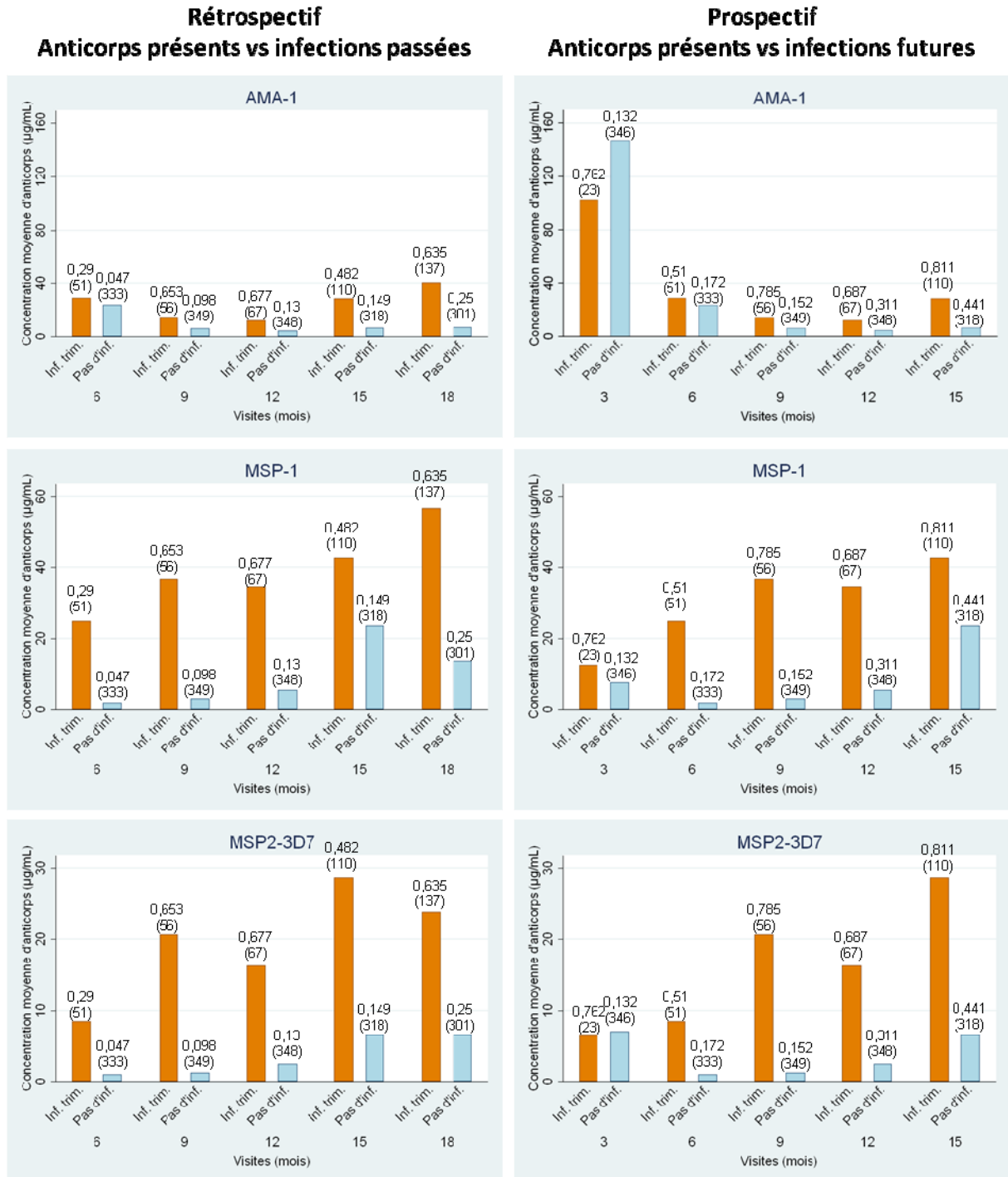
Figure 27 : Evolution de la réponse anticorps dirigés contre 7 antigènes parasitaires en fonction de l'âge de la première infection



Une dernière question serait de savoir si les anticorps produits suite à une infection sont protecteurs ou non pour les infections futures. Afin de proposer des arguments pour répondre à cette question, la réponse anticorps a été associée de manière prospective et rétrospective au nombre d'infections trimestrielles.

Dans la Figure 28, le taux d'anticorps des enfants ayant eu une infection dans le trimestre en cours (barres orange) est associé au nombre moyen d'infections (étiquettes au dessus des barres (effectif)) survenues dans le trimestre suivant (prospectif) ou le trimestre passé (rétrospectif). Par exemple, pour le graphique de MSP2-3D7, la valeur moyenne d'infections survenues entre 6 et 9 mois (0,653) est associée aux taux d'anticorps à 9 mois dans le cas rétrospectif. Pour le cas prospectif, c'est la valeur moyenne du nombre d'infections survenues dans le trimestre 9 à 12 mois (0,785) qui est associée au taux d'anticorps à 9 mois. Une comparaison avec les concentrations d'anticorps et les moyennes d'infections (passées ou futures) des enfants n'ayant pas fait d'infection dans le trimestre en cours est faite (barres bleues).

Pour les 3 antigènes (les profils sont similaires pour les 4 autres antigènes), la valeur moyenne du nombre d'infections passées est plus importante pour les enfants ayant un taux d'anticorps élevé. Ceci suggère que les enfants ayant eu une infection dans le trimestre passé produisent en conséquence un taux élevé d'anticorps (par rapport aux enfants n'ayant pas eu d'infection au cours du trimestre passé). Dans le cas prospectif, le nombre d'infections futures est plus élevé pour les enfants ayant un taux élevé d'anticorps. Ceci suggère que nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence un rôle protecteur des taux d'anticorps contre les infections survenant dans le trimestre suivant, sur la période 3 à 18 mois. Ces résultats semblent donc montrer que jusqu'à 18 mois, les enfants sont réactifs (d'un point de vue production d'anticorps spécifiques) à une infection mais que les anticorps produits ne les protègent pas des futures infections.



**Figure 28 : Influence prospective et rétrospective de l'infection palustre sur le taux d'anticorps**

vs : versus ; Inf. trim. : enfants ayant eu une infection dans le trimestre en cours ; Pas d'inf. : enfants n'ayant pas eu d'infection dans le trimestre en cours ; chiffres au dessus des barres : (n) : nombre d'enfants ayant permis le calcul des concentrations moyennes d'anticorps, nombre moyen d'infections survenues dans le trimestre passé (rétrospectif) ou futur (prospectif). L'effectif par trimestre n'atteint jamais les 519 enfants à cause du nombre variable de prélèvements manqués.

**II / LE TRANSFERT D'ANTICORPS**

Caractéristiques	Effectif (%)	Apposition placentaire		p
		négative (%)	positive (%)	
<b>Population des mères étudiées</b>				
Age de la mère (années)				
<28	256 (47,8)	223 (87,1)	33 (12,9)	0,045
≥28	279 (52,2)	258 (92,5)	21 (7,5)	
Parité				
primigravide	82 (15,3)	67 (81,7)	15 (18,3)	0,015
multigravide	453 (84,7)	414 (91,4)	39 (8,6)	
Hypergammaglobulinémie				
<16 g.L <sup>-1</sup>	366 (68,4)	329 (89,9)	37 (10,1)	1
≥16 g.L <sup>-1</sup>	169 (31,6)	152 (89,9)	17 (10,1)	
<b>Population des enfants étudiés</b>				
Genre				
Garçon	270 (50,5)			
Fille	265 (49,5)			
Age gestationnel (semaines)				
<37	56 (10,5)	49 (87,5)	7 (12,5)	0,45
≥37	479 (89,5)	432 (90,2)	47 (9,8)	
Poids de naissance (grammes)				
<2500	48 (9,0)	40 (83,3)	8 (16,7)	0,129
≥2500	487 (91,0)	441 (90,6)	46 (9,4)	

*Test exact de Fisher***Tableau 5 : Caractéristiques des populations des mères et des enfants étudiées**

Pour rappel, un des objectifs de ce travail de thèse était de s'assurer que le transfert d'anticorps spécifiques du paludisme n'est pas altéré en présence d'infection placentaire.

Une description précise de la cohorte a été publiée par Le Port *et al.*, [190,191]. Les analyses faites sur le transfert d'anticorps concernent 535 couples mère/enfant, en ajoutant aux 519 mères/enfants (définis page 64) 16 autres couples pour lesquels seuls les dosages d'anticorps à la naissance étaient disponibles. Une brève description de cette population d'étude est synthétisée dans le Tableau 5. La moyenne d'âge des femmes se situe aux alentours de 28 ans. Les femmes les plus jeunes et les primigestes ont davantage d'infection palustre placentaire (basée sur l'examen microscopique de l'apposition placentaire). L'infection placentaire n'a pas d'effet sur l'hypergammaglobulinémie maternelle, tout comme l'âge gestationnel et le poids de naissance de l'enfant.

Le rapport entre le taux d'anticorps du nouveau-né et le taux d'anticorps maternels représente le transfert d'anticorps. Si ce ratio augmente, le transfert d'anticorps augmente, impliquant que le taux d'anticorps chez le nouveau-né augmente et/ou que le taux d'anticorps maternels diminue. L'analyse univariée comparant l'âge de la mère, son poids, sa gestité ou son taux d'IgG totales au ratio des anticorps du nouveau-né et de la mère n'a pas révélé de différences significatives pour la majeure partie des antigènes (excepté le taux d'IgG totales maternelles pour l'analyse du transfert anticorps anti-AMA1). Seuls étaient significatifs le taux d'anticorps maternels spécifiques d'antigènes, l'apposition placentaire et l'hypergammaglobulinémie (et le taux d'IgG totales maternelles pour l'analyse d'AMA1). Ces trois variables ont été incluses dans l'analyse multivariée.

Le Tableau 6 montre le transfert d'anticorps de la mère à l'enfant pour chaque antigène. Les valeurs moyennes de ratios positives (MSP2-3D7 et MSP2-FC27) définissent un taux d'anticorps du nouveau-né supérieur à celui de la mère. Comme attendu, en cas d'infection placentaire les taux d'anticorps présents à la fois dans le sang circulant maternel et dans le sang de cordon augmentent. Cependant, pour tous les antigènes hors-mis MSP2, le transfert d'anticorps diminue significativement en présence d'infection placentaire. L'hypergammaglobulinémie a été prise en compte dans ces analyses et n'est pas associée à la réduction du transfert d'anticorps pour la majeure partie des antigènes. Dans le cas de l'antigène GLURP R2, l'effet de l'hypergammaglobulinémie et celui de l'infection placentaire sont associés à la diminution du transfert d'anticorps.

## Résultats

IgG spécifiques des antigènes	Moyenne des log [IgG]	Absence d'infection placentaire	Présence d'infection placentaire	p value
MSP1	IgG CO/IgG Ci	-0,272	-0,632	0,0001
	IgG Ci	3,390	3,942	
	IgG CO	3,110	3,309	
AMA1	IgG CO/IgG Ci	-0,120	-0,296	0,031
	IgG Ci	6,353	6,799	
	IgG CO	6,244	6,503	
MSP2-3D7	IgG CO/IgG Ci	0,586	0,806	0,099
	IgG Ci	4,442	4,870	
	IgG CO	3,856	4,064	
MSP2-FC27	IgG CO/IgG Ci	0,630	0,794	0,141
	IgG Ci	3,912	4,187	
	IgG CO	4,542	4,981	
MSP3	IgG CO/IgG Ci	-0,402	-0,647	0,007
	IgG Ci	2,096	2,639	
	IgG CO	1,701	1,992	
GLURP R0	IgG CO/IgG Ci	-0,496	-0,762	0,002
	IgG Ci	1,703	2,003	
	IgG CO	1,212	1,241	
GLURP R2	IgG CO/IgG Ci	-0,566	-0,878	0,001*
	IgG Ci	3,610	4,000	
	IgG CO	3,066	3,123	

Tableau 6 : Moyenne des ratios représentant le transfert d'anticorps spécifiques du paludisme

Log : logarithme ; [IgG] : concentration d'IgG ; CO : taux d'anticorps du sang de cordon ; Ci : taux d'anticorps du sang maternel ; \*hypergammaglobulinémie  $p=0,001$ .

En conclusion, en cas d'infection placentaire, le transfert d'anticorps est diminué de la mère à l'enfant, sauf pour les anticorps spécifiques de MSP2 pour lesquels aucune différence n'a été mise en évidence. On peut se demander pourquoi seul l'antigène MSP2 n'est pas retrouvé significatif dans cette analyse. Les mécanismes concernant le transfert d'anticorps sont encore mal connus, mais cependant, il a déjà été observé que selon la spécificité de l'anticorps le transfert pouvait différer [152–155]. Le transfert d'anticorps fait intervenir des récepteurs FcRN qui fixent la partie Fc des IgG.

Une des hypothèses pourrait être que la liaison des IgG spécifiques de MSP2 serait facilitée. Il a également été décrit que les IgG pouvaient être transportées dans les endosomes des syncytiotrophoblastes sous forme de complexe avec l'antigène et que ces endosomes sont à pH acide. Il est donc envisageable que certains complexes immuns supportent mieux l'acidité des endosomes que d'autres [192–194].

Des études plus approfondies concernant les mécanismes fondamentaux du transfert d'anticorps sont nécessaires pour mieux comprendre ce résultat.

### **III/ ANALYSE UNIVARIEE ET MULTIVARIEE DE L'ACQUISITION DE LA REPONSE ANTICORPS**

La variable « effet de l'infection passée » définie par des fenêtres opérant sur 6, 9, 12 et 18 mois a été testée pour chaque antigène, afin de déterminer la période modélisant le mieux les données. On constate que toutes les fenêtres temporelles ont un effet significatif sur le taux d'anticorps spécifiques, et ce pour la majeure partie des antigènes. En d'autres termes, même une infection datant de 18 mois maintiendra son effet en augmentant la réponse anticorps spécifique de l'enfant. Cependant, le choix s'est arrêté sur la fenêtre « 6 mois » pour 2 raisons. Premièrement, cette variable a un effet plus fort (meilleur coefficient) sur la réponse anticorps que les autres et deuxièmement, elle modélise mieux les données (ceci étant testé statistiquement avec le BIC). Cet effet n'est pas retrouvé statistiquement significatif pour MSP3 (données non montrées).

Dans l'analyse univariée, les covariables listées dans le Tableau 7 ont été testées. Seules les variables significatives seront par la suite intégrées dans le modèle multivarié.

## Résultats

Covariables	IgG anti-						
	AMA1	MSP1	MSP2- 3D7	MSP2- FC27	MSP3	GLURP R0	GLURP R2
Infection placentaire	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Taux d'anticorps maternels (résidus)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Taux d'anticorps du sang de cordon (résidus)	NS	NS	NS	NS	0,025* 0,077	0,015* 0,091	NS
Taux d'anticorps à 3 mois (résidus)	0,0001* 0,451	0,0001* 0,171	NS	0,004* 0,277	0,0001* 0,185	NS	0,0001* 0,015
Risque environnemental trimestriel	0,01† 0,009	NS	0,028† 0,006	0,007* 0,009	NS	NS	NS
Nutrition trimestriel	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Infection en cours	0,0001* 0,126	0,001* 0,13	0,008* 0,076	0,0001* 0,069	0,0001† 0,091	0,11	0,0001* 0,119
Infection fébrile en cours	0,0001* 0,136	0,01* 0,11	0,027* 0,071	0,001* 0,072	0,001† 0,077	0,371	0,0001* 0,129
Infection non fébrile en cours	0,0001* 0,144	0,001* 0,181	0,034* 0,085	0,007* 0,085	0,001† 0,092	0,077	0,001* 0,121

**Tableau 7 : Analyse univariée de l'effet des covariables sur le taux d'anticorps spécifiques d'antigènes**

Les valeurs chiffrées sont les p value (au dessus) et les coefficients (au dessous) obtenues pour chaque test ; NS: non significatif; \* reste significatif en analyse multivariée; † devient non significative en analyse multivariée.

Il en ressort que les enfants nés de mères porteuses de parasites placentaires à l'accouchement ont un taux d'anticorps similaire à celui des enfants nés de mères non infectées.

Les taux d'anticorps maternels et dans le sang de cordon ne sont pas associés à la réponse anticorps de l'enfant. Ceci suggère que quelque soit le taux d'anticorps transmis de la mère à l'enfant, la réponse anticorps de l'enfant ne varie pas, excepté pour l'antigène MSP3 (dont la réponse anticorps spécifique augmente). En revanche, le taux d'anticorps à 3 mois (majoritairement des anticorps maternels) augmente la réponse anticorps de l'enfant. Ceci est assez inattendu au vu des résultats à la naissance. Cependant, cette variable doit être interprétée avec prudence, car le nombre de

prélèvements manquants à 3 mois est important (dû aux difficultés de prélever de très jeunes enfants) et le nombre de données n'est pas le même qu'avec les taux d'anticorps maternels ou dans le sang de cordon.

Le risque environnemental et l'indice de nutrition n'ont pas d'influence sur le taux d'anticorps. Pour MSP2-3D7 et AMA1, le risque environnemental intervient dans l'analyse univariée mais son effet disparaît dans l'analyse multivariée. Ceci indique que l'effet observé en univarié est expliqué par les autres variables (incluses dans le test multivarié). Seul l'effet sur la réponse anticorps spécifique de MSP2-FC27 reste significatif.

Enfin, toutes les variables « infection » sont significatives, montrant que le taux d'anticorps augmente avec l'infection en cours (sans distinction de présence ou non de symptomatologie associée).

L'analyse multivariée est synthétisée dans le Tableau 8. Aucune variable mesurée n'est significativement associée aux réponses spécifiques de MSP3 et de GLURP R0 (y compris la variable « effet de l'infection passée »). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le taux d'anticorps anti-MSP3 est très bas (Figure 25 et Figure 27). En effet, les valeurs de ces anticorps varient entre 0,02 et 48  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  après 3 mois et la moyenne est de 0,77  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Seule l'analyse univariée nous apprend que le taux d'anticorps augmente lorsqu'une infection survient. Les valeurs de concentrations d'anticorps spécifiques de GLURP R0 sont situées dans la même fourchette que celle des anticorps anti-MSP3. Ainsi, il est difficile de conclure sur les résultats obtenus avec ces 2 antigènes.

Par contre, le Tableau 8 permet de conclure sur les autres antigènes. De manière globale, le taux d'anticorps spécifiques augmente lors d'une infection en cours (effet « direct ») et l'effet d'une infection datant de 6 mois reste significatif et se maintient au moins jusqu'à 18 mois (effet « cumulé »). De plus, il existe une interaction significative entre l'âge de l'enfant et ces effets (infection récente et infection passée). Ces interactions signifient que plus l'infection survient « tard » plus son effet direct et cumulé sur la production d'anticorps spécifiques est fort. Les résultats montrent également que les infections symptomatiques ou asymptomatiques sont génératrices d'une réponse anticorps similaire. Enfin, les antigènes qui ressortent de manière prépondérante de cette analyse sont AMA1, MSP1 et GLURP R2 pour lesquels la réponse anticorps semble fortement augmentée avec l'infection en cours, l'infection passée et l'âge.



Questions	Variables d'intérêt et interactions	IgG anti-						
		AMA1	MSP1	MSP2-3D7	MSP2-FC27	MSP3	GLURP R0	GLURP R2
Est-ce que l'infection en cours joue un rôle sur le taux d'anticorps?	Infection en cours	0,0001	0,006	0,026	0,0001	NS	NS	0,0001
		0,216	0,106	0,065	0,128			0,097
Est-ce que l'infection datant de 6 mois joue un rôle sur le taux d'anticorps?	Infection datant de 6 mois	0,003	0,0001	0,017	0,045	NS	NS	0,0001
		0,123	0,157	0,079	0,077			0,133
Est-ce que le fait d'avoir eu une infection passée va induire l'infection présente?	Interaction entre l'infection en cours et l'infection datant de 6 mois	NS	0,09	NS	NS	NS	NS	NS
Est-ce que l'effet d'une infection passée sur le taux d'anticorps évolue avec l'âge?	Interaction entre l'âge et l'infection datant de 6 mois	0,0001	0,002	0,027				0,0001
		0,051	0,33	0,018	0,06	-	-	0,029
Est-ce que l'effet d'une infection en cours sur le taux d'anticorps évolue avec l'âge?	Interaction entre l'âge et l'infection en cours	0,0001	0,005	0,001	0,047			0,0001
		0,064	0,024	0,02	0,018	-	-	0,021
Est-ce que l'infection datant de 6 mois joue encore un rôle sur le taux d'anticorps en parallèle de l'effet combiné de l'âge et de l'infection en cours?	Infection datant de 6 mois	0,002	0,004	0,014	0,016			0,0001
		0,129	0,16	0,082	0,097	-	-	0,134

**Tableau 8 : Analyse multivariée de l'effet des variables d'intérêt et de leurs interactions sur le taux d'anticorps spécifiques d'antigènes**

Les valeurs chiffrées sont les p value (au dessus) et les coefficients (au dessous) obtenues pour chaque test ; NS : non significatif ; " - " : non testé ; les covariables significatives en analyse univariée (Tableau 7) ont été intégrées

### III/Conclusion

Dans cette étude, il a été montré que les réponses anticorps spécifiques d'antigènes de *P. falciparum* étaient générées par l'infection palustre en cours, mais que ces réponses n'étaient pas protectrices contre les infections futures, conformément à ce qui a été décrit dans la littérature. Les antigènes qui semblent les plus prometteurs sont AMA1 et MSP1. En effet, les infections présentes ou passées induisent une réponse spécifique de ces 2 antigènes particulièrement élevée. GLURP R2 et MSP2 sont également des antigènes immunogènes qui induisent une réponse suite à une infection mais de niveau plus faible. Enfin, MSP3 et GLURP R0 sont les antigènes les moins prometteurs de cette étude. Ils sont peu immunogènes et les taux d'anticorps spécifiques de MSP3 ou de GLURP R0 restent faibles tout au long du suivi. Ces 2 protéines recombinantes sont les seules de cette étude à avoir été produites à partir des parties conservées des antigènes. Il est donc plausible de penser que ces régions ne sont pas particulièrement immunogènes et que pour avoir un taux d'anticorps élevé, une exposition répétée est nécessaire. Les enfants de cette étude étant jeunes, l'exposition aux régions conservées de ces antigènes n'est peut être pas suffisante, ce qui expliquerait les résultats obtenus.

Un des objectifs de ce travail était de voir l'effet de l'infection placentaire sur l'acquisition de la réponse anticorps spécifique du paludisme. Pour ce faire plusieurs approches ont été élaborées. Dans un premier temps, une analyse du transfert d'anticorps a montré que l'infection placentaire était associée à une diminution du taux d'anticorps spécifiques des antigènes transmis de la mère au fœtus. Une seconde approche, plus descriptive, a mis en évidence que la période entre 6 et 12 mois semblait critique pour les enfants nés de mères infectées à l'accouchement. En effet, pendant cette période, ces enfants auraient un taux d'anticorps moindre. Enfin, l'analyse univariée n'a pas pu mettre en évidence l'effet de l'infection placentaire sur l'acquisition de la réponse anticorps. Cependant, avec ce même jeu de données, Le Port *et al.*, ont démontré que les enfants nés de mères porteuses de parasites placentaires à l'accouchement avaient un risque accru de développer une infection palustre précoce sur un suivi à 12 mois [164]. Deux hypothèses peuvent être émises au regard de ces différentes observations. La première est que la tolérance immunitaire peut être un phénomène plus influencé par la fonctionnalité des anticorps que par leur quantité, ce qui expliquerait pourquoi l'analyse univariée ne donne pas de résultats significatifs. Une seconde hypothèse pourrait être que la période de transition entre les anticorps maternels et les anticorps du nouveau-né (entre 6 et 12 mois) semblerait être une phase de tolérance immunitaire chez l'enfant. Pour confirmer cette hypothèse, l'analyse univariée pourrait être refaite en n'utilisant que les données jusqu'à 12 mois, supprimant ainsi la période suspectée comme étant non tolérante et pour

laquelle les taux d'anticorps sont les plus élevés. Le rôle du transfert d'anticorps diminué en cas d'infection placentaire en rapport avec le phénomène de tolérance immunitaire n'a pas encore été démontré. Les observations faites dans cette étude mènent à penser qu'en cas d'infection placentaire, l'enfant aurait moins d'anticorps maternels protecteurs et en conséquence serait plus facilement infecté. Cependant, il a également été observé qu'en cas d'infection placentaire, la quantité d'anticorps maternels transmis à l'enfant, est supérieure à celle des enfants nés de mères non infectées à l'accouchement. Cette remarque pourrait remettre en question l'hypothèse de travail. L'analyse doit donc se poursuivre afin de vérifier si le transfert d'anticorps diminué en cas d'infection placentaire aurait un effet sur le délai de survenue des premières infections et sur le nombre d'infections palustres pendant le suivi ou pendant la première année de vie.

L'analyse multivariée a montré qu'il existe un effet des anticorps cumulés par le passé et un effet de l'âge sur la réponse anticorps spécifique du paludisme pendant les 18 premiers mois de vie. Ces observations s'approchent des définitions des processus de la « mémoire » et la « maturation » du système immunitaire. En effet, la mémoire immunitaire se définit comme étant la capacité à produire une réponse adaptative plus rapide et plus forte lors de contacts successifs d'un antigène particulier. Le terme « mémoire » apporte la nuance essentielle d'une protection de longue durée. La maturation du système immunitaire est un processus de maturation d'affinité. Au fur et à mesure des expositions répétées au même antigène, l'affinité des anticorps spécifiques augmente. En combinant la mémoire et la maturation du système immunitaire, la réponse anticorps est de plus en plus forte et spécifique et par conséquent de plus en plus efficace et durable au fur et à mesure des infections.

Cependant, peut-on vraiment employer les termes de « mémoire » ou de « maturation » du système immunitaire chez des enfants aussi jeunes infectés par *P. falciparum*, sachant qu'une immunité clinique ne s'observe qu'à partir de l'âge de 5 ans et que l'immunité d'un adulte n'est pas stérilisante [195] ? De plus, les réponses anticorps des enfants de l'étude sont produites suite à une infection mais ne semblent pas les protéger des infections futures. Pour répondre à cette question, une analyse plus fine de la réponse immunitaire humorale, incluant les lymphocytes B dans l'analyse (phénotypage des marqueurs de surface CD19 et CD20 et niveau d'expression de CD27) devrait être réalisée. Dans cette étude, nous pouvons conclure que la mise en place des processus complexes de maturité et de mémoire immunitaire a pu être observée chez des enfants âgés de moins de 18 mois.

## PARTIE II

# Distinction des anticorps de la mère et du nouveau-né

## Introduction

Les anticorps maternels protègent le nouveau-né pendant ses premiers mois de vie, laissant le temps au système immunitaire néonatal de se développer. Ainsi, après quelques mois, les anticorps de la mère déclineront pour laisser place aux anticorps néo-synthétisés du nourrisson. Dans le cadre de l'étude sur l'acquisition de la réponse anticorps spécifique du paludisme propre au nouveau-né, les premiers mois de vie représentent une zone d'ombre. En effet, les anticorps maternels et néonataux sont mêlés dans le plasma du nouveau-né et les mesures effectuées ne permettent pas de mettre en évidence la part de la réponse attribuée au nouveau-né. Nous nous proposons donc d'essayer d'éclaircir cette zone d'ombre en développant une technique permettant de distinguer quantitativement les 2 isoformes que représentent les anticorps maternels et néonataux.

## Matériel et méthode

Les IgG présentent un polymorphisme de leurs séquences protéiques appelé allotypie. L'IgG3 a été sélectionnée pour son caractère polymorphe avec 13 allotypes G3m se combinant pour donner 6 allèles G3m prévalents. Ce polymorphisme concerne surtout les populations d'Afrique subsaharienne. Dans un premier temps, une liste de peptides porteurs d'acides aminés discriminants a été établie. Les IgG3 ont été purifiées par chromatographie d'affinité et digérées par une combinaison de protéases afin d'isoler les peptides d'intérêt. Une analyse par spectrométrie de masse a été effectuée afin de détecter et de quantifier les peptides porteurs d'acides aminés polymorphes provenant de différentes isoformes d'IgG3.

## Résultats

Une première série d'expériences a montré la sensibilité de la méthode en réalisant un mélange artificiel de plasmas provenant d'individus homozygotes pour des allèles G3m distincts. Il a été montré que les peptides discriminants pouvaient être détectés simultanément par spectrométrie de masse. Une deuxième série d'expériences sur des individus hétérozygotes pour des allotypes distincts a confirmé la faisabilité de la méthode. Une troisième série d'analyse sur des plasmas provenant d'une mère hétérozygote pour 2 allèles G3m et de son enfant homozygote pour l'un de ces allèles n'a pas permis à ce jour de conclure sur la faisabilité de la méthode en conditions « réelles ».

## Conclusion

D'autres couples mère/enfant doivent être testés pour compléter la démonstration. Cette méthode qui quantifie des IgG néo-synthétisées permettra d'améliorer les connaissances quant à l'acquisition de la toute première réponse anticorps d'une part et représentera un outil de diagnostic prometteur pour les maladies à transmission verticale d'autre part.

# I/ Article

## Mother and Neonate with Distinct IgG Polymorphism:

### Mass Spectrometry IgG Detection for Neonatal Serological Diagnosis

Dechavanne C.<sup>1,2</sup>, Guillonnet F.<sup>3</sup>, Sago L.<sup>3</sup>, Lévy P.<sup>1,2</sup>, Salnot V.<sup>3</sup>, Guitard E.<sup>4</sup>, Ehrenmann F.<sup>5</sup>,  
Chiappetta G.<sup>9</sup>, Broussard C.<sup>3</sup>, Chafey P.<sup>6</sup>, Le Port A.<sup>1,2</sup>, Vinh J.<sup>9</sup>, Mayeux P.<sup>3,8</sup>, Dugoujon J-M.<sup>4</sup>, Lefranc  
M-P.<sup>5,7</sup>, Migot-Nabias F.<sup>1,2</sup>

#### Affiliations

<sup>1</sup> Institut de Recherche pour le Développement, UMR 216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Paris, France.

<sup>2</sup> Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

<sup>3</sup> Plate-forme protéomique de l'Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>4</sup> Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, UMR 5288, CNRS, Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France

<sup>5</sup> IMGT<sup>®</sup>, the international ImMunoGeneTics information system<sup>®</sup>, Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire, LIGM, Université Montpellier 2, UPR CNRS 1142, Institut de Génétique Humaine, IGH, Montpellier, France

<sup>6</sup> Institut Cochin, Inserm U1016, PeBIC, Paris, France

<sup>7</sup> Institut Universitaire de France, Paris, France

<sup>8</sup> Institut Cochin, Inserm U1016, Département d'Hématologie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, CNRS, Paris, France

<sup>9</sup> Unité de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), USR 3149 CNRS, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, Paris, France

**Short title:** Differential IgG detection using mass spectrometry

## 1. Introduction:

Systemic transfer of maternal antibodies occurs *in utero* across the placenta. It is limited to the immunoglobulins (IG) of the IgG class which are transported across the syncytiotrophoblasts via a specific pathway involving the placental Fc receptor (FCGRT) [1]. This active transport mechanism of maternal IgG to the foetus usually results in about 90% of the maternal serum level of IgG in the full-term newborn at delivery [2]. Plasma IgG concentrations are in the 7-15 g/L range and IgG account for 75% of serum IG in a human adult. They are constituted of IgG1 (60-70%), IgG2 (20-30%), IgG3 (5-8%) and IgG4 (1-3%) [3]. The length of time for which maternal antibodies persist in the infant's blood depends on the starting antibody concentration at birth. In general, maternal antibodies fall to minimal levels by 4 months of age and infant's antibody titres begin to rise from about 6 months of age, following active immunization. Presence in infant's plasma of both maternal and intrinsic antibodies hampers the neonatal serological diagnosis. If a direct diagnosis is impossible or is not sufficient, the detection of the neonate's own antibodies can bring essential information especially for vertically-transmitted diseases for which the methods of antigen detection are not reliable. It is the case of parasitic diseases such as toxoplasmosis (causal agent: *Toxoplasma gondii*) and the American trypanosomiasis also named Chagas disease (causal agent: *Trypanosoma cruzi*), for which the determination of specific antibodies neo-synthesized by the newborn would be helpful during the first months of life to diagnose a congenital infection [4-6]. The decision to establish or to shorten medical treatments would be facilitated by the observation of specific antibodies elaborated by the newborn. This requires being able to distinguish IG synthesized by the infant from those transferred from the mother.

On the constant regions of their heavy gamma1, gamma2 and gamma3 chains, the IgG1, IgG2 and IgG3 subclasses carry antigenic determinants or Gm (for *gamma marker*) allotypes [7,8]. Twenty Gm allotypes are currently identified (18 'classical' ones and two 'surnumerary' ones). The 18 'classical' Gm allotypes comprise four G1m, G1m (1, 2, 3, 17), one G2m, G2m (23), and thirteen G3m, G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) [8]. The two 'surnumerary' allotypes,

G1m27 and G1m28, correspond to allotypes demonstrated to be located in gamma1 chains in African populations, instead of being on gamma3, as expected [8,9]. Except for G1m3 and G1m17 located on the CH1 domain of gamma1, all other Gm allotypes are located on the Fc (on CH2 or on CH3) [8]. The correlation between Gm allotypes and amino acid changes has been possible following the sequencing of gamma chains and/or IGHG genes [10], and the complete nucleotide sequencing of many IGHG3 alleles from individuals homozygous for well characterized G3m alleles [8,10-12]. The thirteen G3m allotypes are inherited in different combinations or G3m alleles (encoded by one or several IGHG3 alleles) [8]. The six prevalent alleles are G3m5\* (G3m5,10,11,13,14,26,27), G3m6\* (G3m5,6,10,11,14,26,27), G3m24\* (G3m5,6,11,24,26), G3m15\* (G3m10,11,13,15,27), G3m16\* (G3m10,11,13,15,16,27) and G3m21\* (G3m21,26,27,28) [8]. Several G3m allotypes depend on the combination of two or even three amino acids, distant on the linear sequence but close to each other in three-dimensional structures (illustrated in the 'IMGT G3m allele butterfly' representation) [8]. The G1m, G2m and G3m alleles themselves, encoded by alleles of the closely linked IGHG genes, are inherited in fixed combinations or Gm haplotypes [7,8].

The Gm polymorphism has been extensively studied in human populations, showing that a limited number of haplotypes are observed worldwide, with high frequency variations among populations from different continents [13]. To date, the classical way to determine Gm allotypes is a serological hemagglutination inhibition method [14,15]. This qualitative method will be abandoned in a next future, principally because of depletion in the collections of monospecific anti-allotype sera, obtained in the past from blood donors, and because of the difficulty of obtaining well characterized reagent monoclonal antibodies [16]. Subjectivity of appreciation of small and unstable agglutinates may also impede in some cases the reproducibility of the measures. This approach is unfortunately not able to distinguish the maternal and neonatal phenotypes. Molecular techniques implying either polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) [17] or extensive gene sequencing [12] allow discrimination between



sequences coding for the various allotypes. However these methods are not adapted to our problematic of detection and quantification of neonatal antibody production.

As the sequences of the IGHG genes and alleles and their correspondence with the Gm alleles are known [8], a proteomic approach aimed at measuring by mass spectrometry peptides containing discriminatory amino acids of Gm allotypes could therefore represent a novel methodology to determine Gm and IGHG alleles and to distinguish maternal and neonatal antibodies. The objectives are i) to determine in silico the peptides that could discriminate the maternal and neonatal antibodies ii) to purify the IgG fraction with an enrichment in IgG3 iii) to detect and semi-quantify the discriminatory peptides by mass spectrometry iv) to test the sensitivity of our approach.

This study demonstrates the feasibility of using mass spectrometry to detect and quantify G3m alleles, and to distinguish maternal and infant polymorphic IgG3, in neonate plasma samples where both are physiologically present.

## 2. Methods

### 2.1. Definition of a theoretical list of peptides specific for G3m alleles

The list of proteotypic peptides list was established by comparing the peptide sequences of the constant regions of the four IgG subclass heavy chains gamma1, gamma2, gamma3 and gamma4, encoded by the IGHG1, IGHG2, IGHG3 and IGHG4 genes, respectively [3,18] [IMGT Repertoire (Sections: Protein display, Allotypes) at IMGT<sup>®</sup>, the international ImMunoGeneTics information system<sup>®</sup> [19] (<http://www.imgt.org>)]. Sequences were virtually cleaved by AspN and trypsin allowing potential miscleavage. All peptides were compared to determine those that are specific to IGHG3 and discriminatory between G3m alleles [8,10,12,20]. A list was defined, which comprised 32 proteotypic peptides suitable for analysis using each of the MALDI-TOF-TOF and the ORBITRAP equipments respectively (Table 2).

For example, in comparison with the G3m24\* (G3m5,6,11,24,26) allele, the peptide WQQGNIFSCSVMHEALHNR is discriminatory for the G3m5\* (G3m5,10,11,13,14,26,27) allele, as it contains the amino acids characteristic for the G3m10,13,27 allotypes: IGHG3 CH3 Q98 which, associated to S44, corresponds to G3m13, and IGHG3 CH3 I101 which corresponds to G3m27 and, associated to S44, to G3m10 [8] (positions are according to IMGT unique numbering for C domain [21]). For the G3m24\* allele, the peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR is discriminatory, as it contains the amino acids characteristic for the G3m6,24 allotypes: IGHG3 CH3 E98 which, associated to S44, corresponds to G3m6, and to IGHG3 CH3 V101 which, associated to S44, corresponds to G3m24 [8] (Table 1).

## 2.2. Plasma samples collection

Samples came from two geographical distinct areas: Europe and Africa. One European blood sample was collected in France from a healthy adult volunteer who gave her written informed consent for her blood to be used for the purpose of the present study. Plasma samples from four African individuals were obtained from two studies performed on human genetic determinants of malaria in the south of Benin by the UMR 216 team, and for which ethical clearance was obtained. Two samples originated from a study conducted in 2006-2007 among 155 schoolchildren belonging mainly to the Fon ethnic group [22]. Acceptance of the study was first obtained near the coordinating doctor of the sanitary zone and the inspector of education. Oral information on the study was thereafter provided by the research team to the school director and the teachers before to be dispensed to the members of the association of parents of schoolchildren. A collective written informed consent was obtained from the responsible of the association of parents, by taking into account the individual positions of parents. The study was authorized by the institutional "Ethics Committee of the Faculté des Sciences de la Santé" (FSS) from the Université d'Abomey-Calavi (UAC) in Benin. The five other plasma samples concerned a mother and child pair issued from a malaria birth cohort of 627 neonates and their mothers who were followed-up from 2007 to 2010 in a semi-rural area [23]. At delivery,

peripheral blood of the mother as well as cord blood was drawn and thereafter, child blood was collected quarterly until he reached eighteen months. We selected plasma samples at 3, 6 and 9 months of age for the purpose of the study. On arrival at the maternity clinic for delivery, women were given information on the study protocol. The informed consent written in French and in Fon was then submitted for approval. The protocol was approved by both the institutional "Ethics Committee of the Faculté des Sciences de la Santé" (FSS) in Benin and the IRD "Consultative Committee on Professional Conduct and Ethics" (CCDE) in France.

In all cases, blood was collected into 5 mL EDTA Vacutainer<sup>®</sup> tubes and after centrifugation, plasma samples were frozen at -20°C. One milliliter of fresh plasma from the French individual was also analyzed by comparison with the frozen one.

### 2.3. Serological determination of Gm immunoglobulin allotypes

Gm allotypes in plasma specimen were analyzed by a qualitative standard hemagglutination inhibition method [14,15]. In brief, human blood group O Rh+ erythrocytes were coated with anti-Rh antibodies of known Gm allotypes, plasma samples, and reagent monospecific anti-allotype antibodies. After sedimentation, plasma containing IgG of a particular allotype inhibit hemagglutination by the corresponding reagent anti-allotype antibody, whereas plasma that are negative for this allotype do not.

### 2.4. Total IgG3 purification

Fresh or frozen (at -20°C) plasma samples were tested in parallel in order to evaluate potential differences in the final result. Frozen plasma samples were used after centrifugation in order to eliminate the fibrin aggregates. A quantity of 250 µL of plasma was sufficient to detect and quantify allotype peptides from purified total IgG3.

First, a Protein A column (HiTrap Protein A HP, GE Healthcare, France) was used according to the manufacturer's instructions. This column is intended to retain IgG1, IgG2 and IgG4 leaving IgG3 in the

filtrate. Efficient binding of IgG1, IgG2 and IgG4 to the Protein A column necessitates a low ionic strength, a pH value of 7. The flow-through fraction was injected in a Protein G column (Protein G Sepharose HP SpinTrap, GE Healthcare, France) which presents high affinity for the Fc fragment of IgG from a large variety of species including human IgG3. Antibody binding was performed at neutral pH and elution was obtained by lowering the pH. The eluted material was neutralized to preserve the integrity of acid-labile IgG.

### 2.5. Reduction, alkylation and enzymatic digestion

Reduction, alkylation and enzymatic digestions by trypsin and AspN may be realized either in solution or in fragments of polyacrylamide gel containing the IgG heavy chains after electrophoretic migration of purified samples on a 12% denaturant Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) in reducing conditions. Pilot experiments showed that treatment of IgG 3 purified samples with GluC or with papaine before protein digestion with trypsin and AspN did not improve peptide recovery and mass spectrometry detection of the allotype-specific peptides. Details according to the use of purified samples in gel or in solution are described below.

#### *Use of SDS-PAGE gel samples:*

Fifteen microliters of a 2X  $\beta$ -mercaptoethanol/Laemmli buffer were added to 15  $\mu$ L of purified samples. After boiling at 100°C during 5 minutes, samples were migrated on a 12% SDS-PAGE. Gels were colored with colloidal Coomassie Blue. The 60 kDa bands corresponding to the IgG heavy chain were excised. Gel samples were destained with 50% acetonitrile (ACN, Carlo-Erba, France). Dithiothreitol (DTT; final concentration 10 mM) was added during 30 minutes at 56°C to the gel sample in order to reduce disulfide bonds. Chloroacetamide (final concentration 25 mM) was added for protecting thiol groups. After addition of 1 volume of ACN to dehydrate the gel, the supernatant was discarded and AspN (Roche Diagnostics, France) at 10 ng/ $\mu$ L was added onto the gel. Samples were incubated overnight at 30°C or 3 hours at 37°C. An additional digestion was performed with freshly

activated trypsin (Promega, France) at 10 ng/ $\mu$ L. The resulting supernatant was collected and peptides were extracted successively with 10  $\mu$ L of 4% formic acid and 10  $\mu$ L of 50% ACN. Supernatants were pooled and then completely dried using a vacuum concentrator. Peptides were lastly solubilized in 10% ACN and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, Pierce, France).

#### *Use of samples in solution:*

Samples in solution were reduced with 20 mM DTT for 30 minutes at 56°C, and alkylated with 25 mM chloroacetamide for 30 minutes at room temperature. AspN (10 ng/ $\mu$ L) was added before incubation during 3 hours at 37°C or overnight at 30°C. The same incubation conditions were then applied to trypsin (10 ng/ $\mu$ L). The enzymatic digestion was stopped with TFA (0.5% final).

### 2.6. Mass spectrometry (MS) analysis

#### *Nanochromatography:*

Peptides were concentrated and separated with an Ultimate3000 (Dionex) series HPLC. Briefly, 10  $\mu$ L of elution fraction were injected and trapped using solvent A (TFA 0.1%, ACN 2%) at a 30  $\mu$ L/minute loading flow for 3 minutes in a C18 trap column (Acclaim C18pepmap100, 5  $\mu$ m particles, 100 Å pore, 300  $\mu$ m i.d., 5 mm length) and separated in the analytical column (C18pepmap100, 3  $\mu$ m particles, 100 Å pore, 15 cm length, 75  $\mu$ m i.d.) with a gradient rising from 7% solvent B (ACN 80%, solvent A 20%) at microvalve switch to 20% in 7 minutes and from 20% to 60% in 58 minutes at a flow rate of 300 nL/minute. 192 fractions were collected and spotted on a MALDI target using a Probot (Dionex, France) fraction collector. Spotted fractions were mixed 1:9 with 2 mg/mL of HCCA (Laser Biolabs) in ACN 70% TFA 0.1% containing 3 fmoles/spot of a standardization peptide (Glu fibrinopeptide) and analyzed using a 4800 MALDI TOF TOF analyzer (Applied Biosystems, France).

#### *MALDI-MS:*

Spectra acquisition and processing were performed using the 4000 series explorer software (Applied

Biosystems, France) version 3.5.28193 build 1011 in positive reflectron mode at fixed LASER fluency with low mass gate and delayed extraction. External plate calibration was performed using 4 calibration points spotted throughout the plate, moreover internal calibration using Glu-fibrinopeptide yielded less than 10 parts per million (ppm) measurement errors. For each fraction, sets of 50 spectra in the range of 700 to 4000 Da were acquired at a 200 Hz LASER shot frequency. Five hundred spectra per sample were summed, processed to obtain monoisotopic values from isotopes clusters with a raw spectra signal-to-noise (s/n) ratio of 20.

#### *MALDI-MSMS:*

In each MS spectrum, the 8 most abundant peaks with a minimum s/n of 20 were selected for fragmentation starting with the least abundant. Neighbouring precursors within resolution of 200 were excluded. One thousand MSMS spectra per precursor were summed by increments of 50.

Processing included baseline subtraction and Stavitsky Golay smoothing with 3 points across peak and a polynomial order of 4. Peaklists reflect monoisotopic values from isotopes clusters with an s/n ratio of minimum 22. Generated MSMS peaklists were subsequently submitted to an in-house Mascot (Matrix science) version 2.2 search engine [24] to identify peptides (see “database searching” below).

#### *LTQ-ORBITRAP MS and MSMS:*

Analyses were realized using an Ultimate 3000 Rapid Separation liquid chromatographic system (Dionex, Netherland) coupled to a hybrid LTQ-ORBITRAP Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José CA). Briefly, peptides were loaded and washed on a C18 reverse phase precolumn (3  $\mu\text{m}$  particle size, 100 Å pore size, 75  $\mu\text{m}$  i.d., 2 cm length) using a loading buffer containing H<sub>2</sub>O 98%, ACN 2% and TFA 0.1% at 5  $\mu\text{L}/\text{minute}$ . Peptides were then separated on a C18 reverse phase analytical column (2  $\mu\text{m}$  particle size, 100 Å pore size, 75  $\mu\text{m}$  i.d., 15 cm length) with a 45 minutes

gradient from 100% A (ACN 5%, formic acid 0.1% and H<sub>2</sub>O 95%) to 40% B (ACN 80%, formic acid 0.085% and H<sub>2</sub>O 20%).

The Linear Trap Quadrupole ORBITRAP mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data dependent scheme as follows: full MS scans were acquired with the ORBITRAP, followed by up to 10 LTQ MSMS CID spectra on most abundant precursors detected in the MS scan. Exclusion latency was set to 24 seconds for previously fragmented precursors. Mass spectrometer settings were: full MS (Automatic Gain Control (AGC): 1\*10<sup>6</sup>, resolution: 3\*10<sup>4</sup>, mass-to-charge ratio (m/z) range 400-2000, maximum ion injection time: 1000 ms); MSMS (AGC: 1\*10<sup>4</sup>, maximum injection time: 200 ms, minimum signal threshold: 2000, isolation width: 2Da). The fragmentation was permitted for precursor with a charge state of 2, 3 or 4.

#### *Selected Reaction Monitoring (SRM):*

Analyses were realized using a TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José CA) coupled with an Ultimate 3000 RSLC system (Dionex, Netherlands). Briefly, peptides were loaded and washed on a C18 reverse phase precolumn (3 µm particle size, 100 Å pore size, 75 µm i.d., 2 cm length) using a loading buffer containing H<sub>2</sub>O 98%, ACN 2% and TFA 0.05% at 6 µL/minute. Peptides were then separated on a C18 reverse phase analytical column (2 µm particle size, 100 Å pore size, 75 µm i.d., 15 cm length) with a 60 minutes gradient from 99% A (ACN 2%, formic acid 0.1% and H<sub>2</sub>O 98%) to 50% B (ACN 90%, formic acid 0.1% and H<sub>2</sub>O 10%) at 300nl/minute.

All the data were acquired in triplicate runs and blank runs were interposed until necessary to avoid peptide carry-over effects. SRM acquisitions were performed in scheduled mode. The SRM transitions were recorded for +/- 4 min respect to the peptides elution times calculated during the optimization step. In the highest transition overlapping region the SRM method is less than 2 s.

For the first and third quadrupole a pick width of 0.7 Da was set and the transitions were chosen as mentioned in Table 4 [25]. For all the transitions related to the WQQGNIFSCVMHEALHNR and WQEGNVFSCVMHEALHNR peptides dwell times of 10 ms and 70 ms were used, respectively.

*Spectra Processing:*

Proteome discoverer 1.2 was used to extract peaklists and to generate Mascot generic files (.mgf files) with a signal to noise threshold value of 3. SRM data were processed using Pinpoint version 1.2.

*Database Searching:*

MSMS spectra originating from both mass spectrometers were submitted to Mascot. The database search was a home-made concatenation of IMGT<sup>®</sup> IGHG Immunoglobulin allele amino acid database [20], with the SwissProt fasta database release 2011\_01, 529942 sequences, 189364547 residues. The precursor mass tolerance was set to 20 or 3 ppm and the fragment mass tolerance to 0.35 and 0.45 Da for MALDI MSMS and ESI-orbitrap MSMS respectively. Two miscleavages and the partial oxidation of methionines were permitted. The search was not species-restricted. Selected enzymes were Trypsin and AspN. A filter was applied to the search in order to keep the probability of false positive peptide identification below 5%. A minimum Mascot score value of 25 was set for peptide selection.

*Label-free semi-quantitative information:*

Progenesis software (Version 3.0; Nonlinear Dynamics Ltd) was used to quantify the variation of discriminatory peptides on the basis of retention time, m/z and peak intensity (peak area) on samples. Progenesis software processed the raw data files in two steps: alignment followed by normalization. The data file that yielded most features (ratio 1:1) was used as reference to align retention time in all other measurements. Correction for experimental variations was done by calculating the robust distribution of all ratios (log (ratio)). The peaks (the features) were converted into intensity list by using the raw data files.

The data were filtered using the following criteria: features with masses between 300 and 1700 Da, retention time 8-25 minutes and charge state 2 to 4.



A matrix of all samples was generated, consisting in all masses with corresponding peak intensities of every sample. A resulting .mgf file was exported from Progenesis and imported in Mascot software, interrogation was performed on Parasitowisprot database. A resulting XML file was then imported in Progenesis to assign peptide to features.

The results of peptide normalized abundances were analyzed using Excel software.

### **3. Results**

#### 3.1. Serological determination of Gm immunoglobulin allotypes in plasma samples

Serological determination allowed assignment of Gm phenotype for i) the European individual; ii) the two Beninese children issued from a previous study [22] who were homozygous for distinct alleles and iii) a paired mother and her child pair. Concerning the child, the allotype determination was assessed at 15 months of age to avoid any residual presence of maternal antibodies [23]. The concomitant serological determination of the father' allotypes allowed deducing that the mother was G3m heterozygous and her child was G3m homozygous. These results are synthesized in the table 3 where the expected proteotypic peptides are also presented for each individual.

#### 3.2. IgG3 purification from a plasma sample issued from a Caucasian individual

All fractions from Protein A and Protein G affinity chromatography were i) migrated on a 12% SDS-PAGE (Figure 1) ii) assayed in an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA, data not shown) in order to measure the quantities of each IgG subclass all along the purification process.

As seen the non-reducing SDS-PAGE, the filtrate fractions of the Protein A column (AF) were constituted by IgG3 with a band at 160 kDa approximately and by many plasma proteins. The elution fraction from Protein A column (AE) contained, IgG1, IgG2, IgG4 and some plasma proteins. The elution fraction from Protein G column (GE) contained enriched IgG3 but also unexpected plasma proteins. On the reducing SDS-PAGE, separated IgG3 heavy and light chains migrated at 65 kDa and

20 kDa respectively. Only the IgG3 heavy chain band that contained the discriminatory peptides was excised and prepared.

The measurement of IgG subclass levels by ELISA revealed an abnormal presence of IgG3 in the AE and in the filtrate fractions from Protein G column (GF), and an unexpected presence of IgG1, IgG2 and IgG4 in GE fractions. At last, the GE fractions were impoverished in IgG1 and IgG2 subclasses at 65% and 92% respectively in comparison to the IgG subclasses in human plasma. Interestingly, they were enriched more than 3.6 times in the IgG3 subclass (data not shown).

In conclusion, the Proteins A and G columns allowed purifying a majority of IgG3 without excluding completely the other IgG subclasses. As the list of discriminatory peptides defined in table 2 is specifically representative of IGHG3, the mass spectrometric analysis should not to be hampered by the presence of contaminating heavy chains from IgG1, 2 and 4.

### 3.3. MALDI TOF-TOF spectrum of the digested heavy chain of IgG3 purified from a European individual

The French individual homozygous for the G3m5\* (G3m5,10,11,13,14,26,27) allele according to serological determination was considered. Total IgG3 have been purified and the heavy chain subjected to enzymatic digestion by trypsin. MALDI TOF-TOF experimentation allowed detecting the proteotypic peptide **WQQGNIFSCSVMHEALHNR** with  $m/z = 2314.06$  (Figure 2). We assayed comparatively the same plasma sample, either freshly collected or after being frozen, thawed and centrifuged and we did not observe any difference in the peptides spectra obtained.

### 3.4. Simultaneous detection of proteotypic G3m allotype peptides by mass spectrometry

Experiments were done on a series of controlled mixtures of plasma samples from the two Beninese individuals known to be homozygous for distinct alleles. The first individual harbored only the G3m5\* (G3m5,10,11,13,14,26,27) allele represented by the discriminatory peptide **WQQGNIFSCSVMHEALHNR** and the second one, the G3m24\* (G3m5,6,11,24,26) allele represented

by the discriminatory peptide WQEGNVFSCVMHEALHNR (Table 1). Volume/volume ratios of 1:0, 16:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 0:1 were made before reduction, alkylation and enzymatic digestion. Figure 3 is a 3 dimensional representation of the 1:1 mixture after LC-MS analysis (heatmap) where consecutive MS spectra display mass to charge ratio as a function of retention time and greyscale represents signal intensity. The two arrows underline the coordinates of the discriminatory peptide pair from which the corresponding peptide fragmentation MSMS spectra are shown on A (WQQGNIFSCVMHEALHNR) and B (WQEGNVFSCVMHEALHNR) to assess the signal provenance and proper detection. The respective signal intensities measured by the Progenesis software reveal a signal ratio of about 1:2. This may reflect an actual concentration difference between the two individuals from who originated the samples, or a purification bias during sample processing, or a detection bias during peptide MS measurement. However from all the ratios measured this way, the signals are very well correlated to the actual ratios of sample mixtures (not shown).

### 3.5. Application of the mass spectrometry approach to paired mother and child plasma samples

Similar experiments were performed on total IgG3 purified from plasma samples of one Beninese mother and her baby (cord blood, 3, 6 and 9 months) (Figure 4). This result is based on 3 technical replicates. As the mother is G3m5\*/G3m24\* heterozygous, she should harbor a combination of the pairs of peptides DIAVEWESSGQPENNYNTTPML / WQQGNIFSCVMHEALHNR and DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL / WQEGNVFSCVMHEALHNR. The child being homozygous for G3m5\* only the DIAVEWESSGQPENNYNTTPML / WQQGNIFSCVMHEALHNR peptides are expected. The expected decrease of the maternal DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL / WQEGNVFSCVMHEALHNR peptides during the follow-up of the child should allow deducing the quantity of the neonate DIAVEWESSGQPENNYNTTPML / WQQGNIFSCVMHEALHNR peptides and therefore the quantity of neonatal IgG3.

The Figure 4 graph illustrates the decrease in the **WQQGNIFSCVMHEALHNR** peptide between birth (CO sample) or three months of age (M3 sample) and six months of age (M6 sample) of the child. This is concomitant to the loss of maternal-transmitted IgG3 comprising partially this peptide. At nine months of age (M9 sample), only **WQQGNIFSCVMHEALHNR** peptide corresponding to IgG3 neo-synthesized by the infant is visualized.

The peptide **WQEGNVFSCVMHEALHNR** was expected in the mother's sample (CI) as well as in the samples corresponding to the first months of life of her child (CO, M3, M6), but it was not visualized. The expected peptides **DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL** and **DIAVEWESSGQPENNYNTTPML** were not observed. The detection threshold of these peptides seems to be too low in the sample.

### 3.6. Development of a SRM method to quantify IgG3 isoforms: preliminary results

In order to improve the dynamic range analyzable by our LC MSMS analysis and to set up a robust mass spectrometry tool for the quantitative analysis of IgG3 variants, a SRM analysis was performed. Transitions were optimized using a 1:1 mixture of plasma samples from the two Beninese homozygous for G3m5\* and G3m24\* alleles respectively.

In particular for the proteotypic peptides **WQEGNVFSCVMHEALHNR**, **DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL**, **WQQGNIFSCVMHEALHNR** the MH2+ and MH3+ precursor ions were monitored. Moreover the presence of oxidation products (methionine oxidation) and un-carbamidomethylated cysteine forms of the peptides were also monitored. For the choice of the best SRM transition we monitored all the b and y ions in the range of 200 and 1400 Da and then we used the 6 most intense transitions. The peptide **DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL** was not more detected also by SRM. The peptides **WQEGNVFSCVMHEALHNR** and **WQQGNIFSCVMHEALHNR** were mainly detected in their un-modified forms (Figure 4 B). These data were also validated recording a complete MSMS spectrum of the species (Figure 5). The carbamidomethylated forms of the two

proteotypic peptides were also observed in SRM mode but not validated by MSMS. This is probably due to the lesser MSMS scan sensitivity compared to the SRM.

We used the optimized SRM strategy (see Material and Methods) to analyze the total IgG3 purified from plasma samples of the Beninese mother and her baby (cord blood, 3, 6 and 9 months), monitoring all the predicted forms of the WQEGNVFSCVMHEALHNR and WQQGNIFSCVMHEALHNR peptides. We obtained an estimation of the polymorphic IgG3 variation in our samples through a label-free relative quantification.

The peptide WQQGNIFSCVMHEALHNR was found in both un-modified and carbamidomethylated forms but the forms containing an oxidized methionine were not detected. The detection by SRM mode of the carbamidomethylated form of this peptide was validated recording an MSMS spectrum. The semi-quantitative data obtained for these peptides are consistent with the semi-quantitative data obtained by the ORBITRAP.

The quantitative data are consistent with the ORBITRAP so far but still the detection of peptide WQEGNVFSCVMHEALHNR was not detected, either in its oxidized form or in the non carbamidomethylated form and at all measurable charge states. Thus, for the IgG3 variant related to the G3m24\*allele we were still not able to use the SRM tool to quantify this isoform in our sample.

A perspective consists to use an isotope enriched form of WQEGNVFSCVMHEALHNR in order to validate the results obtained in the label-free mode.

#### **4. Discussion**

In their first months of life, newborns are protected by maternal antibodies transferred through the placenta. After few months, the concentration of maternal antibodies decreases in the infant's plasma, giving way to neo-synthesized neonatal antibodies. The detection of the neonate's own antibody response might be essential in some clinical cases in terms of undirected diagnosis. The aim

of the study was to settle a new method based on mass spectrometry aimed at distinguishing maternal and neonatal antibodies in plasma samples from infants.

At each step, from the plasma purification up to the peptide sequence analysis, the most adequate amongst different tested protocols were chosen, leading to the final conclusion that a distinction between maternal and neo-synthesized antibodies is achievable in samples from infants where both antibodies are present.

The IgG3 purification step is a crucial point. Affinity chromatography using successively Protein A and Protein G columns was chosen in the present study. An alternative choice would be to process plasma samples on fast protein size-exclusion liquid chromatography in order to optimize the quantity of recovered material and also to standardize the experiment thanks to an automated system.

Reduction, alkylation and enzymatic digestions were realized either in solution or on polyacrylamid gel bands corresponding to the IgG heavy chains. The normalization would be difficult from a gel analysis because: i) the 2 isoforms have to be co-migrated for an accurate gel band excision, ii) the yield of each step of reduction, digestion and peptides gel extraction needs to be equivalent for both isoforms. For these reasons, the preparation of the samples in solution was chosen in order to simplify the protocol and to optimize the conditions of accuracy in the measure of the peptides of interest.

The peptides cartography obtained with the MALDI was incomplete probably because of a lack of ionization efficiency. The electrospray ionization analysis led to the detection of multicharged peptides and seemed therefore adapted to this problematic. The high resolutive ORBITRAP analyzer allowed an accurate detection of the proteotypic peptides. This detection was satisfying in the samples homozygous for the G3m alleles: the concomitant increases and decreases of two proteotypic peptides contained in preparations which were mixed at sequential ratios allowed validating the relative quantification in label free approach (data not shown). In spite of some

improvements that are yet to be brought, this study represents the first demonstration of the technical feasibility of detecting peptides representing distinct G3m alleles, by the means of a protocol which is reproducible and easy to put in place with a prompt utilization.

The detection of the peptide **WQQGNIFSCVMHEALHNR** in mother and child samples presents the same profile in the ORBITRAP and the triple quadrupole in SRM mode. The peptide **WQEGNVFSCVMHEALHNR** was detected and identified in the volume/volume ratios of homozygous mixture samples but was not in the mother and child samples.

Two explanations may be advanced for the absence of this peptide: 1) it was at multiple modification states and each one was too diluted and 2) it was at a too low quantity in order to be detected. For the first hypothesis, the protocol would be modified to increase the detection yield of one modified peptide. The carbamidomethylation step would be abolished to increase the non-carbamidomethylated peptide form, for example. For the second hypothesis, the quantities of the distinct G3m allele peptides contained in a heterozygous individual sample could be impacted by the purification process. Each plasma sample of the two Beninese children homozygous for distinct G3m alleles was purified independently. The IgG3 quantity was similar according to the estimation of the intensities of the bands resulting from identical volumes of each purified product (data not shown) or to the label free semi-quantitative approach. This observation does not support the hypothesis of an allotype selection during the purification step. Another explanation could be that an individual heterozygous for G3m alleles could express differently each of them in spite of the fact that G3m allotypes are encoded by codominant genes. The production of IgG3 does not depend on the allotype-associated promoters [26]. In the one hand, a study demonstrated that IgG3 serum levels from G3m5\* homozygous individuals were higher than those of G3m21\* (G3m21,26,27,28) homozygous individuals, aged more than 3 years [27]. On the other hand, in the volume ratios samples, the SRM analysis detected both peptides of interest with comparable ionization efficiency. However, in the mother-and-child samples, **WQEGNVFSCVMHEALHNR** may have been present but in quantities below the signal/background threshold. The absence of this peptide is another

argument to sustain the hypothesis of an intrinsic variation of the level of each IgG3 isoform in an heterozygous individual.

This study did not describe absolute levels of IgG3 but it would suggest a possibility of different proportions of expressed G3m allotypes in the case of the IgG3 contained in the plasma sample from the Beninese G3m5\*/G3m24\* (G3m5,10,11,13,14,26,27/G3m5,6,11,24,26) heterozygous mother.

This will be assayed by a triple quadrupole in SRM mode with an absolute quantification approach involving synthesized peptides and applied to several heterozygous adults.

Quantification of polymorphic peptides, and therefore of the IgG harboring them, may not only bring important information on the IGHG gene expression, but it may also allow following the decrease of the specific IgG produced in the case of therapeutic treatment of neonates. Otherwise, the triple quadrupole in SRM mode would be the adequate equipment in the cases where the measure of an absolute quantity of polymorphic peptides would be necessary.

This study provides the first demonstration of the feasibility of detecting and measuring IGHG3 amino acid polymorphisms from infant total IgG3 that contain both mother and child IgG3. Although the samples used in this study were selected on their G3m allotypes to insure that the IgG3 polymorphisms from the mother and her child were distinct, only one of the two distinguishable peptides could be detected allowing relative comparison between several time points after birth. Restrictions to the use of the method would be encountered in the case of identical IGHG3 alleles in both mother and child. The recourse to the IGHG1 polymorphism and to the less informative IGHG2 and IGHG4, may be necessary in order to reinforce the capacity to distinguish maternal and infant IGHG alleles. For the needs of our approach of differential detection of mother and newborn IgG, the probability for a mother and her child to bear Gm alleles differing by at least one amino acid, has to be important. This probability is highly dependent on the probability for the biological relatives of a child to harbor distinct Gm alleles. An approached calculation consisted to determine the probability for two randomly selected individuals from a defined population group to bear distinct Gm alleles.



This calculation was made thanks to Gm data already published on population groups settled in different continents [13]. It resulted that in Africa, the probability for two individuals to present distinct Gm alleles averages 83% (ranging from 70.2% to 88.4%) meanwhile it is 75.3% in France and 49.9% in French Guiana (Table 5). The tested population groups are considered as representative of Africa, Europe and South of America respectively. Consequently, mother and child would harbor distinct genotypes in most cases, but we must be aware that the feasibility of our proteomic approach remains conditioned by the geographical origin of the individuals.

An interesting development is to apply this methodology to specific IgG3 targeting antigens from particular infectious diseases. Indeed, the diagnosis in newborns of vertically-transmitted diseases is difficult when the methods of antigen detection are not reliable. It is the case of some parasitic diseases such as toxoplasmosis or Chagas disease, for which the determination of specific antibodies neo-synthesized by the newborn would be helpful during the first months of life to diagnose a congenital infection. In the case of malaria, the infant protection during his first months of life is mainly due to maternal antibodies transferred across placenta. Different epidemiological studies in Cameroun, Tanzania, Gabon and Kenya [28-31] showed that fetal malaria experience induces a greater susceptibility to malaria infection during infancy. The investigation of the IgG response through this new methodology could contribute to know if this phenomenon may be attributable to a deficiency in the acquisition of neonatal specific antibodies. Otherwise, this approach may open a new field of knowledge on the kinetics of the neonatal antibody synthesis. As a consequence, the timing of malaria vaccine strategies may be improved on the basis of an optimal infant's antibody response. By extension, this approach will be suitable to bring essential information for a large number of diseases and it may have a huge incidence in infant public health.

## Acknowledgments

We thank Marie Corvec for her precious contribution to this study. We are grateful to ThermoFisher Scientific for the loan of the mass spectrometer TSQ Vantage. Célia Dechavanne was supported by the Treilles Foundation, 2010-2011. Financial support was provided by the Institut de Recherche pour le Développement, the Paris Descartes University, the ESPCI ParisTech and the Centre National de la Recherche Scientifique.

## References

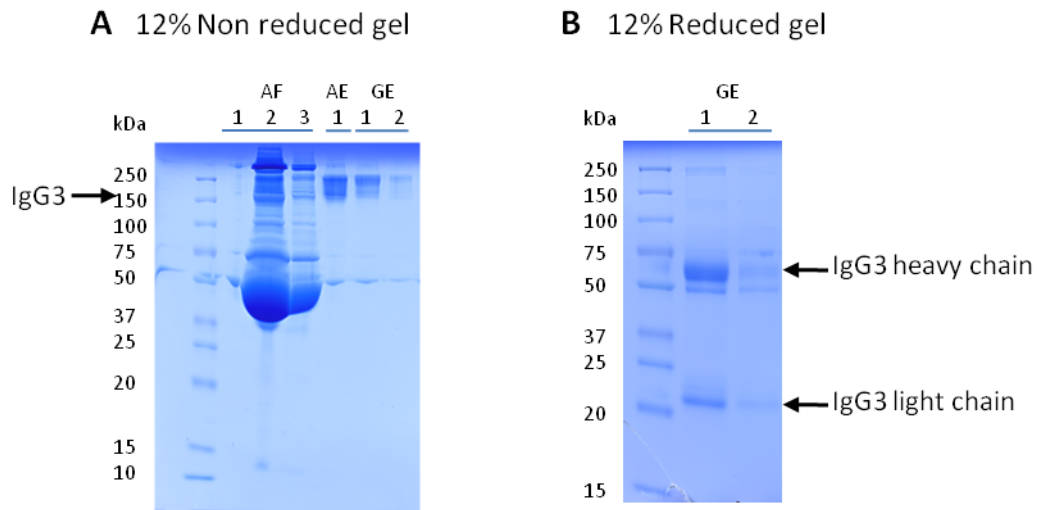
1. Simister NE, Story CM (1997) Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J. Reprod. Immunol* 37: 1-23.
2. Williams AI, McFarlane H (1969) Distribution of malarial antibody in maternal and cord sera. *Arch. Dis. Child* 44: 511-514.
3. Lefranc M-P, Lefranc G (2001) *The Immunoglobulin FactsBook*. Academic Press. London, UK.
4. Schijman AG, Altchek J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, et al. (2003) Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother* 52: 441-449.
5. Chippaux J-P, Clavijo ANS, Santalla JA, Postigo JR, Schneider D, et al. (2010) Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop. Med. Int. Health* 15: 87-93.
6. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, et al. (2001) Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J. Clin. Microbiol* 39: 2267-2271.
7. Lefranc MP, Lefranc G (1990) Molecular genetics of immunoglobulin allotype expression. Dans: *The human IgG subclasses*: molecular analysis of structure, function and regulation. Shakib, Farouk. p. 43 - 78.

8. Lefranc M-P, Lefranc G (in press) Human Gm, Km and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. In: *Methods in Molecular Biology*.
9. van Loghem E, de Lange G, van Leeuwen AM, van Eede PH, Nijenhuis LE, et al. (1982) Human IgG allotypes co-occurring in more than one IgG subclass. *Vox Sang*. 43: 301-309.
10. Huck S, Fort P, Crawford DH, Lefranc MP, Lefranc G (1986) Sequence of a human immunoglobulin gamma 3 heavy chain constant region gene: comparison with the other human C gamma genes. *Nucleic Acids Res*. 14: 1779-1789.
11. Huck S, Lefranc G, Lefranc MP (1989) A human immunoglobulin IGHG3 allele (Gmb0,b1,c3,c5,u) with an IGHG4 converted region and three hinge exons. *Immunogenetics* 30: 250-257.
12. Dard P, Lefranc MP, Osipova L, Sanchez-Mazas A (2001) DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur J Hum Genet* 9: 765-72.
13. Dugoujon JM, Hazout S, Loirat F, Mourrieras B, Crouau-Roy B, et al. (2004) GM haplotype diversity of 82 populations over the world suggests a centrifugal model of human migrations. *Am J Phys Anthropol* 125: 175-92.
14. Field LL, Dugoujon JM (1989) Immunoglobulin allotyping (Gm, Km) of GAW5 families. *Genet Epidemiol* 6: 31-3.
15. Dugoujon JM, de Lange GG, Blancher A, Alie-Daram S, Marty Y (1989) Characterization of an IgG2, G2m(23) anti-Rh-D antibody. *Vox Sang* 57: 133-136.
16. Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, et al. (1992) Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett*. 31: 143-168.
17. Brusco A, de Lange GG, Boccazzi C, Carbonara AO (1995) Molecular characterization of Gm(n+) and G2m(n-) allotypes. *Immunogenetics* 42: 414-417.
18. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc M-P (2005) IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res*. 33: D256-261.

19. Lefranc M-P, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, et al. (2009) IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res* 37: D1006-1012.
20. Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M-P (2010) IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. *Nucleic Acids Res.* 38: D301-307.
21. Lefranc M-P, Pommié C, Kaas Q, Duprat E, Bosc N, et al. (2005) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 185-203.
22. Migot-Nabias F, Noukpo JM, Guitard E, Doritchamou J, Garcia A, et al. (2008) Imbalanced distribution of GM immunoglobulin allotypes according to the clinical presentation of *Plasmodium falciparum* malaria in Beninese children. *J Infect Dis* 198: 1892-5.
23. Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouédraogo S, Dechavanne C, et al. (2011) Infections in Infants during the First 12 Months of Life: Role of Placental Malaria and Environmental Factors. *PLoS ONE* 6: e27516.
24. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
25. Roepstorff P, Fohlman J (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11: 601.
26. Pan Q, Petit-Frère C, Hammarström L (2000) An allotype-associated polymorphism in the gamma3 promoter determines the germ-line gamma3 transcriptional rate but does not influence switching and subsequent IgG3 production. *Eur. J. Immunol* 30: 2388-2393.
27. Oxelius VA, Aurivillius M, Carlsson AM, Musil K (1999) Serum Gm allotype development during childhood. *Scand. J. Immunol* 50: 440-446.
28. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, et al. (1997) Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 146: 826-31.

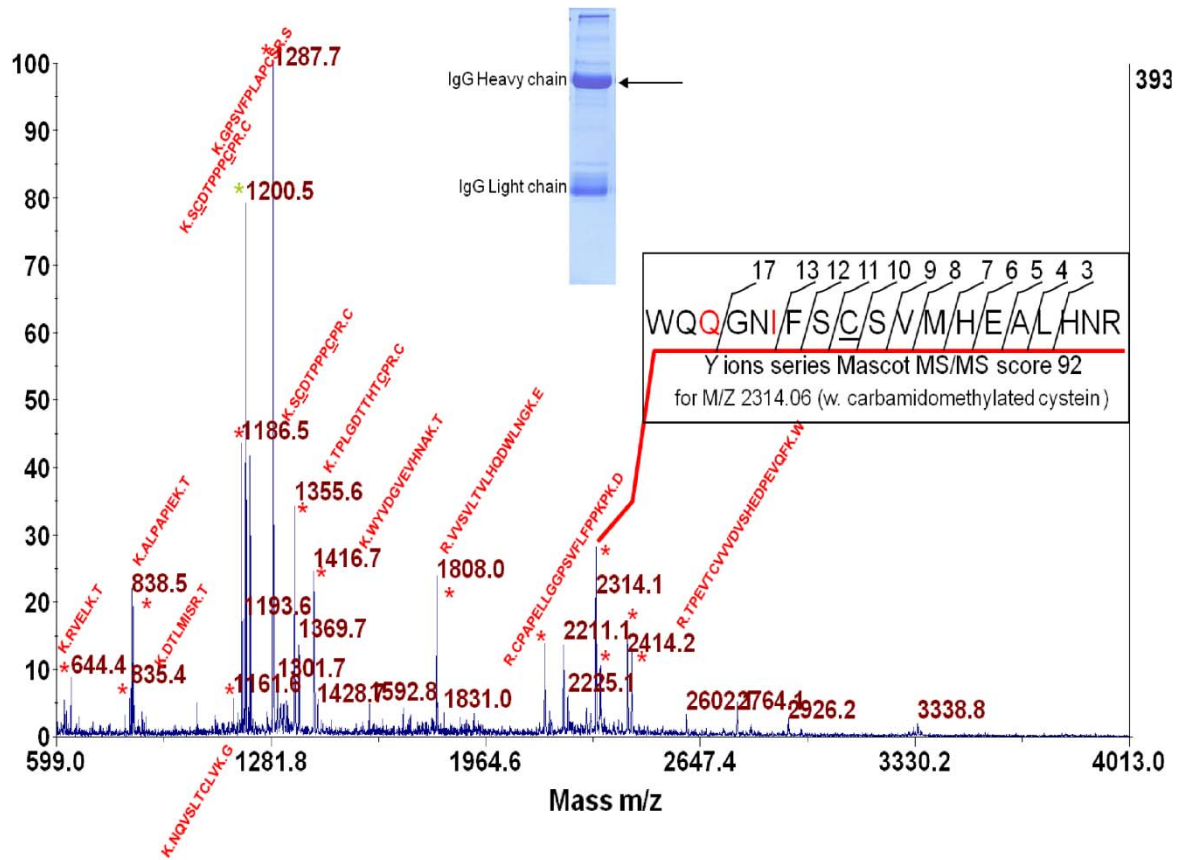
29. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, et al. (2005) Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med* 2: e407.
30. Schwarz NG, Adegnika AA, Breitling LP, Gabor J, Agnandji ST, et al. (2008) Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. *Clin Infect Dis* 47: 1017-25.
31. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, et al. (2009) Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med* 6: e1000116.

**Figure 1: Migration on an acrylamid gel of the Protein-A and Protein-G purification fractions from plasma samples**

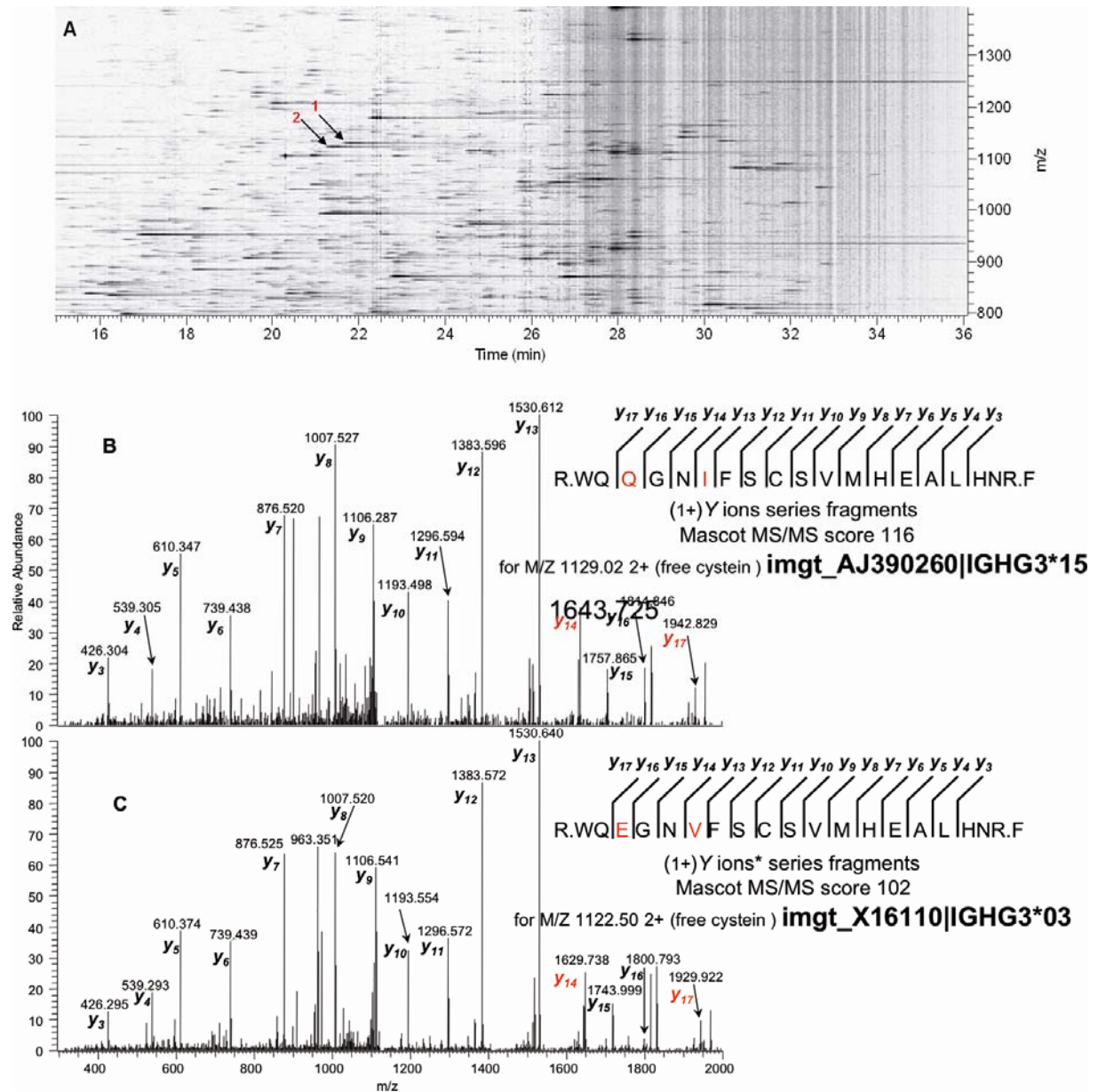


AF1 to AF3: Consecutive filtrate fractions of a Protein-A column containing IgG3 and plasma proteins;  
AE: Elution fraction of a Protein-A column containing IgG1, IgG2, IgG4; GE1 and GE2: consecutive elution fractions of a Protein-G column containing IgG3.

Figure 2: MALDI-TOF spectral of a purified IgG3 heavy chain trypsin digestion



The assigned tryptic peptides corresponding to labeled masses (\*) are indicated in red (green\* for propionamidated cystein). The selected precursor at  $m/z$  2314.06 was subjected to CID fragmentation in MALDI MSMS mode. The fragmentation spectrum gave a mascot result confirming unambiguously IGHG3 peptide 347-365: R.WQQGNIFSCSVMHEALHNR.F which mass allows discrimination of the possible amino acids variations (in red) corresponding to the two other haplotypes of interest R.WQEGNIFSCSVMHEALHNR.F  $m/z$  2315.04 or R.WQEGNVFSCSVMHEALHNR.F  $m/z$  2301.03 (Table 2). The mascot score is 102 (Expect:  $1.3e-06$ ) for swiss-prot entry IGHG3\_Human.

**Figure 3 : Simultaneous detection of two discriminatory peptides in the 1:1 volume ratio sample**

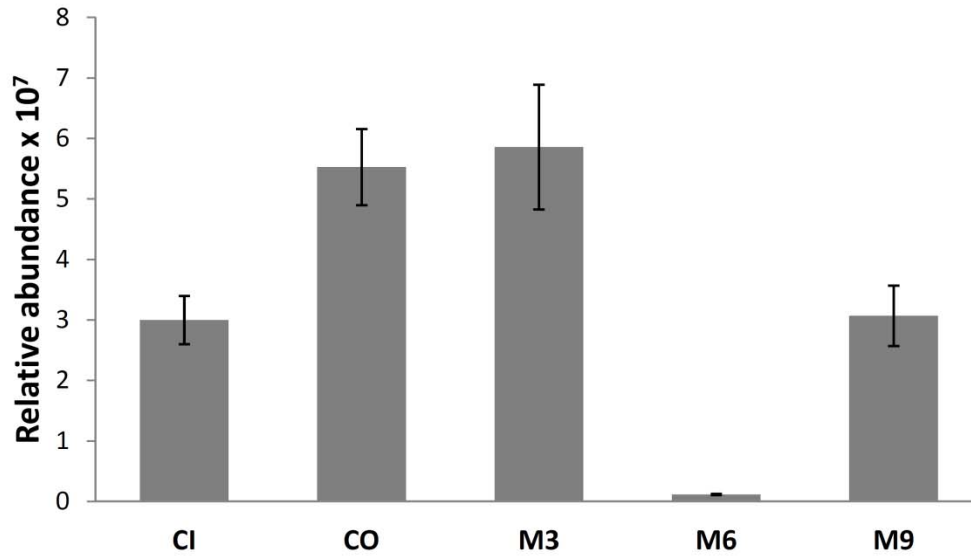
**A.** Heatmap reflecting detection intensity and LC-MS resolution of the two discriminatory allelic peptides among all affinity-purified IGHG3 peptides. 1: WQQGNIFSCSVMHEALHNR 2: WQEGNVFSCSVMHEALHNR. Coordinates are: X: Retention time in minutes, Y: Mass to charge ratio, Grayscale: intensity.

**B and C.** Spectra showing MSMS fragmentations from the discriminatory allelic peptides; **B** sequence 332-350 for IMGT reference AJ390260|IGHG3\*15 and **C** sequence 347-365 for IMGT reference X16110|IGHG3\*03; \*accepted nomenclature for fragment ions as proposed by Roepstorff and Fohlman [25].

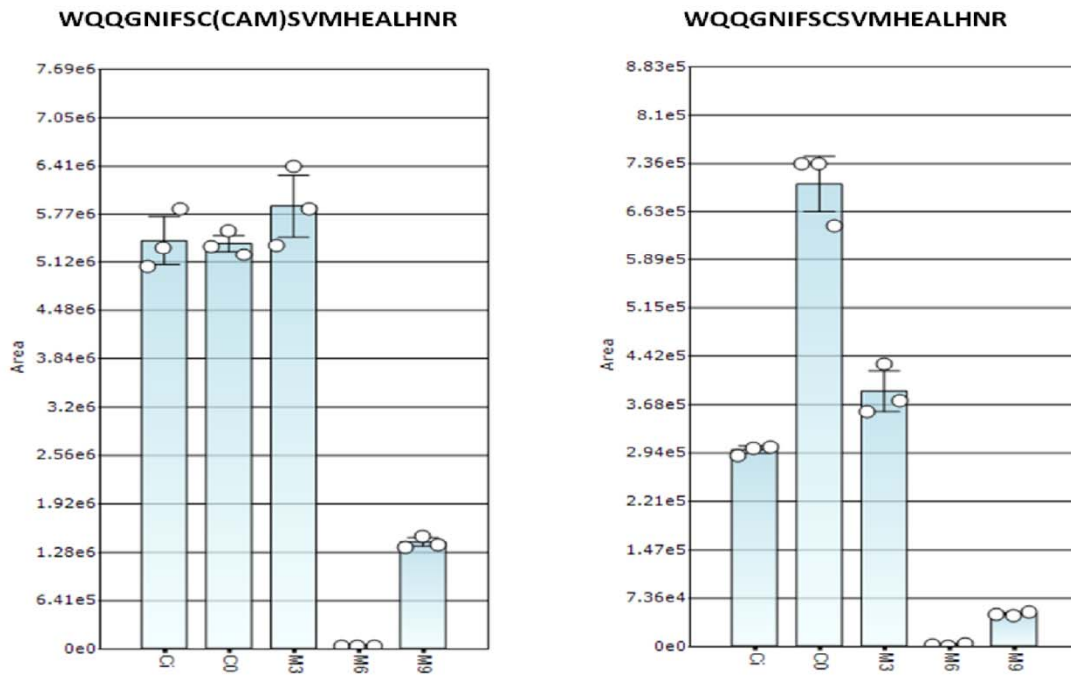


**Figure 4 : Relative abundance of the WQQGNIFSCVMHEALHNR peptide in plasma samples from a mother and her newborn**

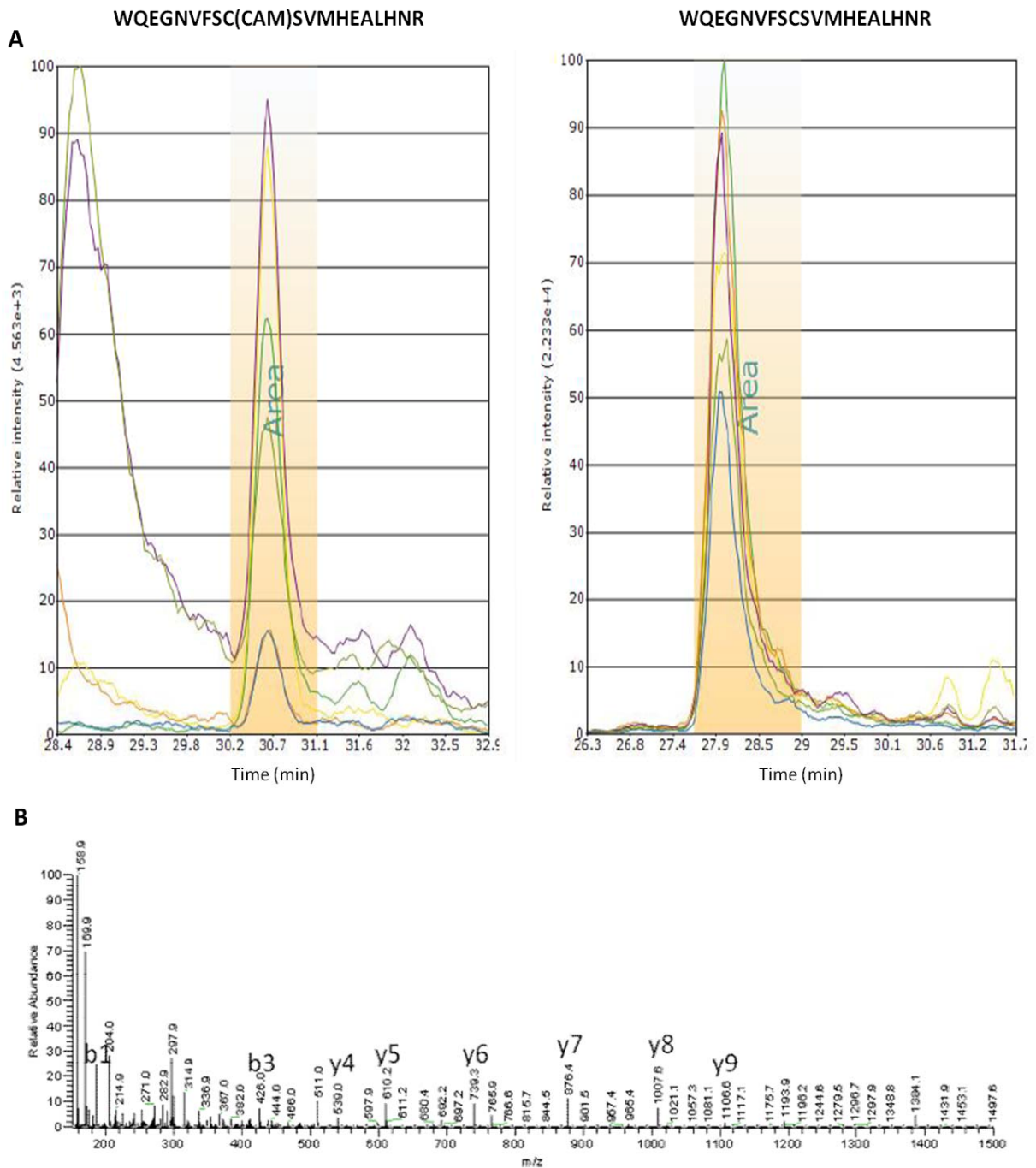
A. ORBI-TRAP



B. SRM



CAM: carbanometylated cystein, CI = mother circulating plasma, CO = plasma from cord blood, M = Infant plasma at 3, 6 and 9 months.

**Figure 5 : SRM spectral of a purified IgG3 from the individual homozygous for the G3m24\* allele**

**A.** Extract ion chromatogram of the SRM transitions related to the peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR, CAM: carbanomethylated cystein, the colored peaks correspond to the different SRM transitions of the peptide; **B.** MS/MS spectrum related to the peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR; m/z: mass to charge, accepted nomenclature for fragment ions as proposed by Roepstorff and Fohlman [25].

**Table 1: Characteristics of the thirty two G3m alleles peptides observable after enzymatic digestion of IGHG3 chain**

Theoretical proteotypic peptides	N°	CH domains	Positions in CH domains [21]	Allotype and other polymorphic amino acids [8]	IGHG3 alleles from IMGT/GENE-DB [18]	G3m alleles	
						Simplified form [8]	Complete description [8]
K . TKPWEEQYNSTFR . V	1	CH2	79-85	P82 (nG3m21), <b>W83</b> (G3m16), Y84.3	IGHG3*18	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
					IGHG3*19	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
K . TKPREEQYNSTFR . V	2	CH2	79-85	P82 (nG3m21), R83 Y84.3	IGHG3*01, *02 <sup>a</sup> , *04, *05, *10	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
					IGHG3*03		
					IGHG3*06, *07	G3m24*	G3m5,6,11,24,26
					IGHG3*08		
					IGHG3*09		
					IGHG3*13	Unusual <sup>b</sup>	G3m5,14,26
					IGHG3*17	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
G3m6*	G3m5,6,10,11,14,26,27						
G3m15*	G3m10,11,13,15,27						
K . LREEQYNSTFR . V	3	CH2	81-85	<b>L82</b> (G3m21), R83, Y84.3	IGHG3*14	G3m21*	G3m21,26,27,28
					IGHG3*15	G3m21*	G3m21,26,27,28
					IGHG3*16	G3m21*	G3m21,26,27,28
V . DGVEVHNAKTKPWEEQYNSTFR . V	4	CH2	43-85	P82 (nG3m21), <b>W83</b> (G3m16), Y84.3	IGHG3*18	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
					IGHG3*19	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
R . EEQYNSTFRVSVLTVLHQ . D	5	CH2	83-95	R83, Y84.3,	IGHG3*01, *02 <sup>a</sup> , *04, *05, *10 IGHG3*03	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27

## Distinction des anticorps de la mère et du nouveau-né

Article							
				L92	IGHG3*06, *07		
					IGHG3*08	G3m24*	G3m5,6,11,24,26
					IGHG3*13	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
					IGHG3*14	Unusual <sup>b</sup>	G3m5,14,26
					IGHG3*15	G3m6*	G3m5,6,10,11,14,26,27
					IGHG4*16	G3m15*	G3m10,11,13,15,27
					IGHG3*17	G3m21*	G3m21,26,27,28
						G3m21*	G3m21,26,27,28
						G3m21*	G3m21,26,27,28
R . EEQYNSTFRVSVLTVVHQ . D	6	CH2	83-95	R83, Y84.3, V92	IGHG3*09	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
K . TKPWEEQYNSTFRVSVLTVLHQ . D	7	CH2	79-95	P82, <b>W83</b> (G3m16), Y84.3, L92	IGHG3*18 IGHG3*19	G3m16* G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27 G3m10,11,13,15,16,27
K . GFYPSDIAVEWESSGQPENNYK . T	8	CH3	26-80	V39, <b>S44</b> (G3m11), K79	IGHG3*06 IGHG3*07 IGHG3*13	G3m5* G3m5* G3m6*	G3m5,10,11,13,14,26,27 G3m5,10,11,13,14,26,27 G3m5,6,10,11,14,26,27
K . GFYPSDIAMEWESSGQPENNYK . T	9	CH3	26-80	<b>M39</b> (G3m15 <sup>d</sup> ), <b>S44</b> (G3m11), K79	IGHG3*17 IGHG3*18 IGHG3*19	G3m15* G3m16* G3m16*	G3m10,11,13,15,27 G3m10,11,13,15,16,27 G3m10,11,13,15,16,27
K . GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMML . D	10	CH3	26-84.2	V39, <b>S44</b> (G3m11), N79, <b>M84</b>	IGHG3*01, *04, *05, *10 , IGHG3*09 IGHG3*11, *12 <sup>c</sup>	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27

## Distinction des anticorps de la mère et du nouveau-né

Article							
K . GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPVL . D	11	CH3	26-84.2	V39, <b>S44</b> (G3m11), N79, V84	IGHG3*03	G3m24*	G3m5,6,11,24,26
K . GFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPML . D	12	CH3	26-84.2	V39, N44 (nG3m11), N79, M84	IGHG3*08 IGHG3*14 IGHG3*16	Unusual <sup>b</sup> G3m21* G3m21*	G3m5,14,26 G3m21,26,27,28 G3m21,26,27,28
S . DIAVEWESSGQPENNYK . T	13	CH3	33-80	V39, <b>S44</b> (G3m11), K79	IGHG3*06, *07 IGHG3*13	G3m5* G3m6*	G3m5,10,11,13,14,26,27 G3m5,6,10,11,14,26,27
S . DIAMEWESSGQPENNYK . T	14	CH3	33-80	<b>M39</b> (G3m15 <sup>d</sup> ), <b>S44</b> (G3m11), K79	IGHG3*17 IGHG3*18 IGHG3*19	G3m15* G3m16* G3m16*	G3m10,11,13,15,27 G3m10,11,13,15,16,27 G3m10,11,13,15,16,27
S . DIAVEWESSGQPENNYNTTPPML . D	15	CH3	33-84.2	V39, <b>S44</b> (G3m11), N79, <b>M84</b>	IGHG3*01, *04, *05, *10 , IGHG3*09 IGHG3*11, *12 <sup>c</sup>	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
S . DIAVEWESSGQPENNYNTTPPVL . D	16	CH3	33-84.2	V39, <b>S44</b> (G3m11), N79, V84	IGHG3*03	G3m24*	G3m5,6,11,24,26
S . DIAVEWESNGQPENNYNTTPPML . D	17	CH3	33-84.2	V39, N44 (nG3m11), N79, <b>M84</b>	IGHG3*08 IGHG3*14 IGHG3*16	Unusual <sup>b</sup> G3m21* G3m21*	G3m5,14,26 G3m21,26,27,28 G3m21,26,27,28
K . SRWQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNHYTQK . S	18	CH3	93-120	<b>Q98</b> (G3m13 <sup>e</sup> ),	IGHG3*17	G3m15*	G3m10,11,13,15,27

				<b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>H115</b> + <b>Y116</b> (nG3m5, G3m15 <sup>e</sup> )	IGHG3*18 IGHG3*19	G3m16* G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27 G3m10,11,13,15,16,27
K . SRWQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . F	19	CH3	93-116	<b>Q98</b> (G3m13 <sup>e</sup> ), <b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5, G3m14 <sup>h</sup> )	IGHG3*01, *04, *05, *10 IGHG3*06, *07	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
K . SRWQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . Y	20	CH3	93-116	<b>Q98</b> , <b>I101</b> (G3m27), <b>R115</b> (G3m26) + <b>Y116</b> (G3m28)	IGHG3*09 IGHG3*11, *12 <sup>c</sup> IGHG3*14 IGHG3*15 IGHG3*16	G3m21*	G3m21,26,27,28
K . SRWQEGNVFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . F	21	CH3	93-116	<b>E98</b> (G3m6 <sup>i</sup> ), <b>V101</b> (G3m24 <sup>j</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5)	IGHG3*03	G3m*24	G3m5,6,11,24,26
K . SRWQEGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . F	22	CH3	93-116	<b>E98</b> (G3m6 <sup>i</sup> ), <b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5, G3m14 <sup>h</sup> )	IGHG3*13	G3m6*	G3m5,6,10,11,14,26,27
R . WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNHYTQK . S	23	CH3	95-120	<b>Q98</b> (G3m13 <sup>e</sup> ),	IGHG3*17	G3m15*	G3m10,11,13,15,27

				<b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>H115</b> + <b>Y116</b> (nG3m5, G3m15 <sup>e</sup> )	IGHG3*18	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
					IGHG3*19	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
R . WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . F	24	CH3	95-116	<b>Q98</b> (G3m13 <sup>e</sup> ), <b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5, G3m14 <sup>h</sup> )	IGHG3*01, *04, *05, *10	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
					IGHG3*06, *07 IGHG3*09 IGHG3*11, *12 <sup>c</sup>		
R . WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . Y	25	CH3	95-116	Q98, <b>I101</b> (G3m27), <b>R115</b> (G3m26) + <b>Y116</b> (G3m28)	IGHG3*14 IGHG3*15 IGHG3*16	G3m21*	G3m21,26,27,28
R . WQEGNVFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . F	26	CH3	95-116	<b>E98</b> (G3m6 <sup>i</sup> ), <b>V101</b> (G3m24 <sup>j</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5)	IGHG3*03	G3m24*	G3m5,6,11,24,26
R . WQEGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR . F	27	CH3	95-116	<b>E98</b> (G3m6 <sup>i</sup> ), <b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5, G3m14 <sup>h</sup> )	IGHG3*13	G3m6*	G3m5,6,10,11,14,26,27
R . WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNYTQKSLSPGK	28	CH3	95-130	<b>Q98</b> (G3m13 <sup>e</sup> ),	IGHG3*17	G3m15*	G3m10,11,13,15,27

				<b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>H115</b> + <b>Y116</b> (nG3m5, G3m15 <sup>e</sup> )	IGHG3*18	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
					IGHG3*19	G3m16*	G3m10,11,13,15,16,27
R . WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	29	CH3	95-120	<b>Q98</b> (G3m13 <sup>e</sup> ), <b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5, G3m14 <sup>h</sup> )	IGHG3*01, *04, *05, *10 IGHG3*06, *07 IGHG3*09 IGHG3*11, *12 <sup>c</sup>	G3m5*	G3m5,10,11,13,14,26,27
R . WQEGNVFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	30	CH3	95-120	<b>E98</b> (G3m6 <sup>i</sup> ), <b>V101</b> (G3m24 <sup>j</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5)	IGHG3*03	G3m*24	G3m5,6,11,24,26
R . WQEGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	31	CH3	95-120	<b>E98</b> (G3m6 <sup>i</sup> ), <b>I101</b> (G3m27, G3m10 <sup>f</sup> ), <b>R115</b> (G3m26) + <b>F116</b> (G3m5, G3m14 <sup>h</sup> )	IGHG3*13	G3m6*	G3m5,6,10,11,14,26,27
R . WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	32	CH3	95-120	<b>Q98</b> , <b>I101</b> (G3m27), <b>R115</b> (G3m26) + <b>Y116</b> (G3m28)	IGHG3*14 IGHG3*15 IGHG3*16	G3m21*	G3m21,26,27,28



<sup>a</sup> partial

<sup>b</sup> Unusual G3m allele [8,12].

<sup>c</sup> The IGHG3\*11 and IGHG3\*12 alleles differ by the number of hinge exons, 4 and 3, respectively (IMGT Repertoire, Gene table <http://www.imgt.org>) [8,18].

<sup>d</sup> Expression of the allotype G3m15 is dependent, in addition to CH3 Met M39, on the presence of CH3 His H115 and Tyr Y116 [8].

<sup>e</sup> Expression of the allotype G3m13 is dependent, in addition to CH3 Gln Q98, on the presence of CH3 Ser 44 [8].

<sup>f</sup> Expression of the allotype G3m10 is dependent, in addition to CH3 Ile I101, on the presence of CH3 Ser 44 [8].

<sup>g</sup> Expression of the allotype G3m15 is dependent, in addition to CH3 His H115 and Tyr Y116, on the presence of CH3 Met M39 [8].

<sup>h</sup> Expression of the allotype G3m14 is dependent, in addition to CH3 Arg R115 and Phe F116, on the presence of CH3 Met M84 [8].

<sup>i</sup> Expression of the allotype G3m6 is dependent, in addition to CH3 Glu E98, on the presence of CH3 Ser S44 [8].

<sup>j</sup> Expression of the allotype G3m24 is dependent, in addition to CH3 Val V101, on the presence of CH3 Ser S44 [8].

Amino acids in bold are implicated in the discrimination between IGHG3 alleles. “.” : site of enzymatic cut; C<sup>c</sup> : carbamidomethylated cysteine.

Amino acids characteristic of the G3m allotypes and IGHG3 alleles are from [8]. Amino acid sequences are available in the IMGT Repertoire (<http://www.imgt.org>) , IMGT/DomainDisplay and IMGT/GENE-DB [18]. Positions in the CH domains are according to the IMGT unique numbering for C domain [21].

**Table 2 : Mass to charge ratios of thirty two of G3m alleles peptides observable after enzymatic digestion**

Theoretical proteotypic peptides	CH domain	Enzyme Mismatch	MALDI m/z	ORBI-TRAP		
				m/z +2	m/z +3	m/z +4
K . TKPWEEQYNSTFR . V	2	0	1686	843,4	562,6	
K . TKPREEQYNSTFR . V	2	1	1656	828,4	547,8	414,7
K . LREEQYNSTFR . V	2	1	1443	721,9	481,6	
V . DGVEVHNAKTKPWEEQYNSTFR . V	2	1	2635	1318,1	879,1	659,6
R . EEQYNSTFRVVSVLTVLHQ . D	2	1	2249	1125,1	750,4	563
R . EEQYNSTFRVVSVLTVVHQ . D	2	1	2235	1118,1	745,7	559,5
K . TKPWEEQYNSTFRVVSVLTVLHQ . D	2	1	2761	1381,2	921,1	691,1
K . GFYPSDIAVEWESSGQPENNYK . T	3	1	2517	1259,1	839,7	630
K . GFYPSDIAMEWESSGQPENNYK . T	3	1	2549	1275	850,4	638
K . GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPML . D	3	1	3143	1572,2	1048,5	786,6
K . GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPV . D	3	1	3111	1556,2	1037,8	778,6
K . GFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPML . D	3	1	3170	1585,7	1057,5	793,4
S . DIAVEWESSGQPENNYK . T	3	0	1966	983,4	656	492,2
S . DIAMEWESSGQPENNYK . T	3	0	1998	999,4	666,6	500,2
S . DIAVEWESSGQPENNYNTTPPML . D	3	0	2592	1296,6	864,7	648,8
S . DIAVEWESSGQPENNYNTTPPV . D	3	0	2560	1280,6	854,1	640,8
S . DIAVEWESNGQPENNYNTTPPML . D	3	0	2619	1310,1	873,7	655,5
K . SRWQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNYHTQK . S	3	1	3058	1529,7	1020,1	765,4
K . SRWQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . F	3	1	2557	1279,1	853,1	640
K . SRWQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . Y	3	1	2557	1279,1	853,1	640
K . SRWQEGNVFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . F	3	1	2544	1272,6	848,7	636,8
K . SRWQEGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . F	3	1	2558	1279,6	853,4	640,3
R . WQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNYHTQK . S	3	0	2815	1408,1	939,1	704,6
R . WQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . F	3	0	2314	1157,5	772	579,3
R . WQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . Y	3	0	2314	1157,5	772	579,3
R . WQEGNVFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . F	3	0	2301	1151	767,7	576
R . WQEGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNR . F	3	0	2315	1158	772,3	579,5
R . WQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNYHTQKSLSPGK	3	1	3585	1792,9	1195,6	896,9
R . WQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	3	1	2818	1409,7	940,1	705,3
R . WQEGNVFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	3	1	2805	1403,1	935,8	702,1
R . WQEGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	3	1	2819	1410,2	940,4	705,6
R . WQQGNIFSC <sup>C</sup> SVMHEALHNRFTQK . S	3	1	2834	1417,7	945,4	709,3

Masses are determined for detection on the MALDI and the ORBITRAP mass spectrometers. The

Methionine (M) could be oxidized. In this case, the mass to charge ratio would increase of 16.

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation ; ORBITRAP : ElectroSpray Ionisation-TRAP ;

m/z : mass-to-charge ratio ; +2 , +3, +4 represent the peptide number of charges ; amino acids in bold

are implicated in the discrimination between G3m and IGHG3 alleles; « . » : site of enzymatic cut ; C<sup>C</sup> :

carbamidomethylated cysteine.

**Table 3: Gm immunoglobulin characteristics of the 5 experimental plasma samples**

Individual	G3m allele <sup>a</sup>	Expected proteotypic peptides	References
European homozygous	G3m5,10,11,13,14,26,27	DIAVEWESSGQPENNYNTTPML <sup>b</sup>	WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR <sup>b</sup>
Beninese homozygous child 1	G3m5,10,11,13,14,26,27	DIAVEWESSGQPENNYNTTPML <sup>b</sup>	WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR <sup>b</sup> [22]
Beninese homozygous child 2	G3m5,6,11,24,26	DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL	WQEGNVFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR <sup>b</sup> [22]
Beninese heterozygous mother	G3m5,10,11,13,14,26,27	DIAVEWESSGQPENNYNTTPML <sup>b</sup>	WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR <sup>b</sup> [23]
	G3m5,6,11,24,26,28	DIAVEWESSGQPENNYNTTPVL	WQEGNVFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR
Beninese homozygous child	G3m5,10,11,13,14,26,27	DIAVEWESSGQPENNYNTTPML <sup>b</sup>	WQQGNIFSC <sup>c</sup> SVMHEALHNR <sup>b</sup> [23]

<sup>a</sup> G3m alleles are deduced from the phenotype [8]

<sup>b</sup> Peptides observed either in MALDI or in ORBITRAP; simple or multiple charged; in oxidized form or not

« . » : site of enzymatic cut ; C<sup>c</sup> : carbamidomethylated cysteine.

**Table 4 : List of the transitions used for the SRM experiments**

Sequence	Precursor(MH <sub>3</sub> <sup>3+</sup> )	Fragment	Fragment type
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	289.1	y2
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	315.1	b2
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	426.1	y3
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	610.3	y5
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	876.4	y7
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	1007.4	y8
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	1106.5	y9
WQQGNIFSCSVMHEALHNR	753.0	1296.5	y11
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	426.1	y3
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	443.2	b2
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	539.3	y4
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	610.3	y5
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	614.3	b5
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	876.4	y7
WQQGNIFSC(cam)SVMHEALHNR	772.0	426.1	y3
WQQGNIFSCSVM(ox)HEALHNR	758.4	315.1	b2
WQQGNIFSCSVM(ox)HEALHNR	758.4	610.3	y5
WQQGNIFSCSVM(ox)HEALHNR	758.4	739.3	y6
WQQGNIFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	758.4	876.4	y7
WQQGNIFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	777.4	426.1	y3
WQQGNIFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	777.4	443.2	b2
WQQGNIFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	777.4	539.3	y4
WQQGNIFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	777.4	876.4	y7
WQEGNVFSCSVMHEALHNR	748.6	289.1	y2
WQEGNVFSCSVMHEALHNR	748.6	426.1	y3
WQEGNVFSCSVMHEALHNR	748.6	539.3	y4
WQEGNVFSCSVMHEALHNR	748.6	610.3	y5
WQEGNVFSCSVMHEALHNR	748.6	739.3	y6
WQEGNVFSCSVMHEALHNR	748.6	876.4	y7
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	289.1	y2
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	426.1	y3
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	501.2	b4
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	615.2	b5
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	876.4	y7
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	1108.4	b9
WQEGNVFSC(cam)SVMHEALHNR	767.7	1193.5	y10
WQEGNVFSCSVM(ox)HEALHNR	754.0	289.1	y2
WQEGNVFSCSVM(ox)HEALHNR	754.0	426.1	y3
WQEGNVFSCSVM(ox)HEALHNR	754.0	501.2	b4
WQEGNVFSCSVM(ox)HEALHNR	754.0	615.2	b5
WQEGNVFSCSVM(ox)HEALHNR	754.0	739.3	y6
WQEGNVFSCSVM(ox)HEALHNR	754.0	876.4	y7
WQEGNVFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	773.0	289.1	y2

---

WQEGNVFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	773.0	315.1	b2
WQEGNVFSC(cam)SVM(ox)HEALHNR	773.0	426.1	y3

---

The precursor ions were in triply-charged ( $MH_3^{3+}$ ) form; cam: carbamidomethylated cysteine; ox: oxidized Methionine (M), accepted nomenclature for fragment ions as proposed by Roepstorff and Fohlman [25].

Table 5: Discriminating power of the Gm system in different areas representing the feasibility of the method

Ethnies and countries <sup>a</sup>	n	Number of different		Average by area (%)
		Gm haplotypes	Discriminating power (%)	
France	2716	6	75.35	75.35
Wayapis from French Guiana	294	3	47.24	49.87
Wayanas from French Guiana	165	3	52.50	
Bwas from Mali	600	8	82.56	83.00
Dogons from Mali	221	7	76.20	
Bobos from Mali	175	9	87.63	
Baoule from Ivory Coast	198	7	85.68	
Abrons from Ivory Coast	135	8	85.65	
Amhara from Ethiopia	78	8	85.60	
Berbers from Kabily (Algeria)	103	7	85.12	
Pygmies (Aka)from Central African Republic	900	5	70.17	
Malagasy	165	7	88.38	

<sup>a</sup> data issued from [13] ; n is the number of subjects for each ethnic group or country ; the discriminating power is estimated by  $1 - \Pi$ .  $\Pi$  is defined as the sum of the square of frequencies of all Gm genotypes.

## II/Informations complémentaires

### I/LES ACTEURS

Cette aventure a démarré en septembre 2009. Jean-Michel Dugoujon (l'UMR 5288, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) / Université Paul Sabatier Toulouse III), avec qui notre équipe collabore depuis 2007 sur des problématiques en lien avec les allotypes d'Ig, nous a orientées, Florence Migot-Nabias et moi, vers Marie-Paule Lefranc (Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire (LIGM) de Montpellier), spécialiste des immunoglobulines, tandis que nous prenions contact avec la Plate-forme Protéomique Paris 5 (3P5/UPD) et en particulier avec Patrick Mayeux et François Guilloné afin d'avoir leur avis sur la faisabilité du projet. La caractérisation des allotypes d'IgG des échantillons par la technique d'inhibition d'hémagglutination a été effectuée par Evelyne Guitard (l'UMR 5288, CNRS / Université Paul Sabatier Toulouse III) et Florence Migot-Nabias. J'ai réalisé la liste de peptides discriminants avec l'aide de Marie-Paule Lefranc, la majorité des purifications (Prisca Lévy (UMR 216), Emmanuelle Renard (UMR 216) et Florence Migot-Nabias ont également participé à cette étape) et la digestion enzymatique des IgG3 (avec les conseils avisés de François Guilloné). La nanochromatographie et l'analyse par spectrométrie de masse ont été réalisées par l'équipe de 3P5. La base de données IMGT® a été alimentée par François Ehrenmann (LIGM) et Marie Paule Lefranc. François Guilloné et Marie-Paule ont conçu la base Parasito-swissprot à partir de laquelle les interrogations sur Mascot ont été effectuées. Les interrogations ont été réalisées par Virginie Salnot (équipe de 3P5) et moi-même. L'analyse semi-quantitative a été réalisée par Laïla Sago (étudiante en Master 2 Ingénierie de plate-forme, équipe de 3P5). Suite aux résultats incomplets obtenus sur le couple mère/enfant, une seconde plate-forme a été contactée : l'unité de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), située à l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de Paris. Joelle Vinh (SMBP) et Giovanni Chiappetta (SMBP) nous ont rejoints dans cette aventure pour la réalisation des analyses en SRM. Ce travail a fait l'objet d'une demande de brevet français auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI) en août 2011.

### II/RESULTATS ASSOCIES A L'ARTICLE

L'article est actuellement en révision avec une date de re-soumission proche. Les résultats présentés dans ce paragraphe seront potentiellement ajoutés à la prochaine version de l'article (celle qui sera jointe au mémoire final).

La validité de la purification des IgG3 a été vérifiée par ELISA. Dans la Figure 29, sont représentées les différentes étapes de purification. En bleu, le pourcentage d'IgG3 est calculé pour chacune des étapes en fonction de la quantité initiale dans le plasma. Selon ces rendements, il semble que l'étape de purification par la protéine A n'est pas aussi efficace qu'attendu. En effet, il semblerait que la protéine A retienne une quantité non négligeable d'IgG3 dans la colonne. En revanche, le rendement de la purification par protéine G est nettement meilleur : 28% d'IgG3 sont déposées, 22% d'IgG3 sont récupérées purifiées, ce qui donne un rendement de 80%. La somme des pourcentages représentés dans ce schéma n'atteint pas 100%. En effet, seules les fractions essentielles ont été testées afin d'avoir une notion globale de l'efficacité de la purification. Afin d'améliorer cette étape de purification, il serait peut être judicieux de supprimer la purification par protéine A et ne réaliser qu'une purification par protéine G. Etant donné que les 32 peptides (Table 2 de l'article) sont discriminants pour les IgG3 (même en comparaison des autres sous-classes), cette alternative semble adaptée.

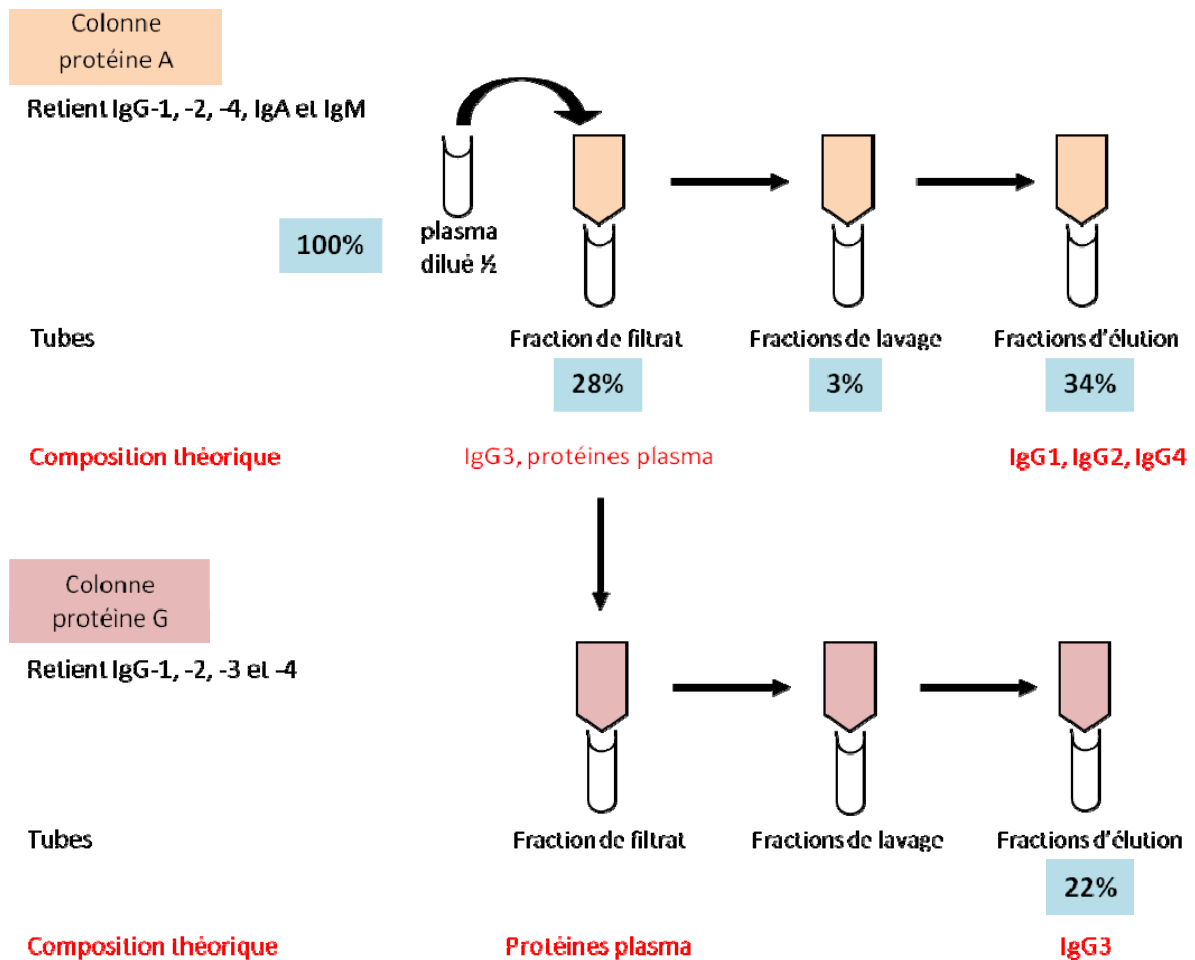


Figure 29 : Schéma des étapes de purification de l'IgG3 à partir d'un échantillon de plasma et leurs rendements



La sensibilité de la méthode a été testée en mixant artificiellement les IgG3 purifiées provenant de 2 plasmas d'individus homozygotes pour des allèles G3m distincts. L'individu porteur de l'allèle G3m5,10,11,13,14,26,27 exprime le peptide WQQGNIFSCVMHEALHNR et le second individu porteur de l'allèle G3m5,6,11,24,26 exprime le peptide WQEGNVFSCVMHEALHNR. Les ratios volumiques 1:0, 16:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 0:1 ont été réalisés avant la réduction, l'alkylation et la digestion enzymatique. Dans la Figure 30, on constate que les 2 peptides ont des abondances qui varient du simple au double (dans les ratios 1 : 0 et 0 : 1) et sont en abondance similaire au ratio 1 : 2 (et non 1 : 1). Ces observations peuvent être probablement expliquées par le fait qu'il s'agit de ratios volumiques et non de concentration. Elles suggèrent que le peptide WQQGNIFSCVMHEALHNR est exprimé de manière plus abondante chez l'individu homozygote pour G3m5,10,11,13,14,26,27 que son analogue chez l'autre individu ou révèlent un problème technique, notamment au niveau de la purification qui pourrait sélectionner des IgG3 porteuses de certaines combinaisons allotypes.

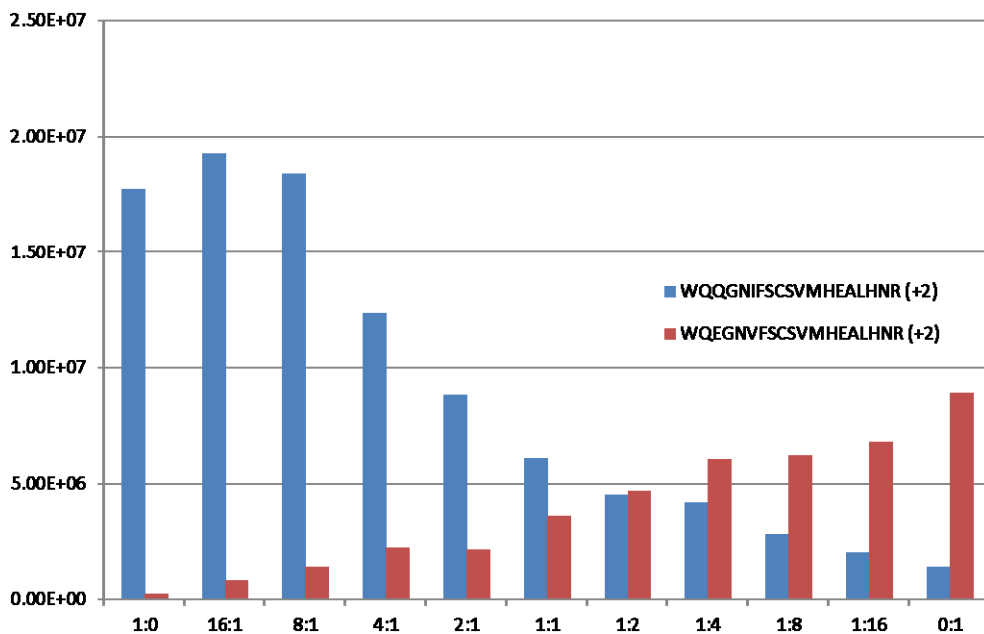


Figure 30 : Abondances relatives des peptides discriminants, obtenues à partir des ratios volumiques de 2 plasmas provenant d'individus homozygotes pour les allèles G3m5,10,11,13,14,26,27 ou G3m5,6,11,24,26

On constate également que les ratios 1 : 0 et 0 : 1 ne sont pas « purs ». Les données de ce graphique sont brutes sans retrait de bruit de fond. Il est probable que pour le ratio 1 : 0, le léger signal du peptide non attendu WQEGNVFSCVMHEALHNR correspondent à du bruit de fond. En revanche, pour le ratio 0 : 1, le signal, plus fort, révèle peut être une contamination entre les échantillons. Cependant, l'abondance de ce même peptide observée au ratio 1 : 16 reste plus élevée que dans le ratio 0 : 1 (et il en est de même pour les ratios 16 : 1 et 1 : 0), ce qui suggère que la méthode est assez sensible pour pouvoir détecter et quantifier un signal dilué au moins au 1 : 16.

### III/RESULTATS COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE

Deux individus hétérozygotes pour les allèles G3m5,10,11,13,14,26,27 / G3m5,6,11,24,26 ont été sélectionnés pour valider la méthodologie et tester la quantification absolue. Ces échantillons ont été purifiés, digérés et analysés selon le même protocole que décrit dans l'article à l'exception de l'utilisation de la trypsine seule pour digérer la protéine (sans AspN) et l'alkylation qui avait été suspectée comme étant responsable de la non-détection du peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR dans l'échantillon de la mère. En effet, l'alkylation (réalisée après réduction de la protéine) est une étape d'attachement d'un groupement alkyle sur les cystéines afin qu'elles ne puissent pas reformer de ponts disulfures. Or, une alkylation partielle, génère des peptides sous plusieurs formes, avec ou sans groupement alkyle, ce qui dilue le signal.

En plus du protocole précédent, les échantillons ont été analysés en SRM MS-MS conjointement à des peptides AQUA®. Il s'agit de peptides synthétiques marqués qui miment les peptides natifs formés lors de la protéolyse de l'IgG3 et qui agissent comme un standard interne, permettant ainsi la quantification absolue.

L'analyse des peptides obtenus est réalisée selon 2 approches complémentaires : l'Orbitrap et la SRM. Ces 2 appareils n'ont pas le même fonctionnement de détection des peptides et une approche combinée assure la détection des peptides d'intérêt.

Les résultats obtenus à l'Orbitrap ont permis de détecter le peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR pour l'un des 2 échantillons et les 2 peptides d'intérêt pour le second échantillon. Les résultats obtenus en SRM avec les peptides AQUA® montrent la détection des 2 peptides d'intérêt pour les 2 échantillons. Dans la Figure 31, l'abondance relative du peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR, précédemment non détecté en SRM MS-MS (cf article), est mise en relation avec le temps de rétention (nanochromatographie). Le peptide synthétique AQUA® WQEGNVFSCSVMHEALHNR permet d'assurer que le peptide représenté par un pic similaire dans les échantillons est bien le peptide attendu. Ce résultat signe la faisabilité de la méthode proposée. L'analyse de nouveaux couples mère/enfant permettra de conclure sur la possibilité de distinction des anticorps maternels et néo-synthétisés. Ces résultats sont attendus très prochainement.

WQEGNVFSCSVMHEALHNR

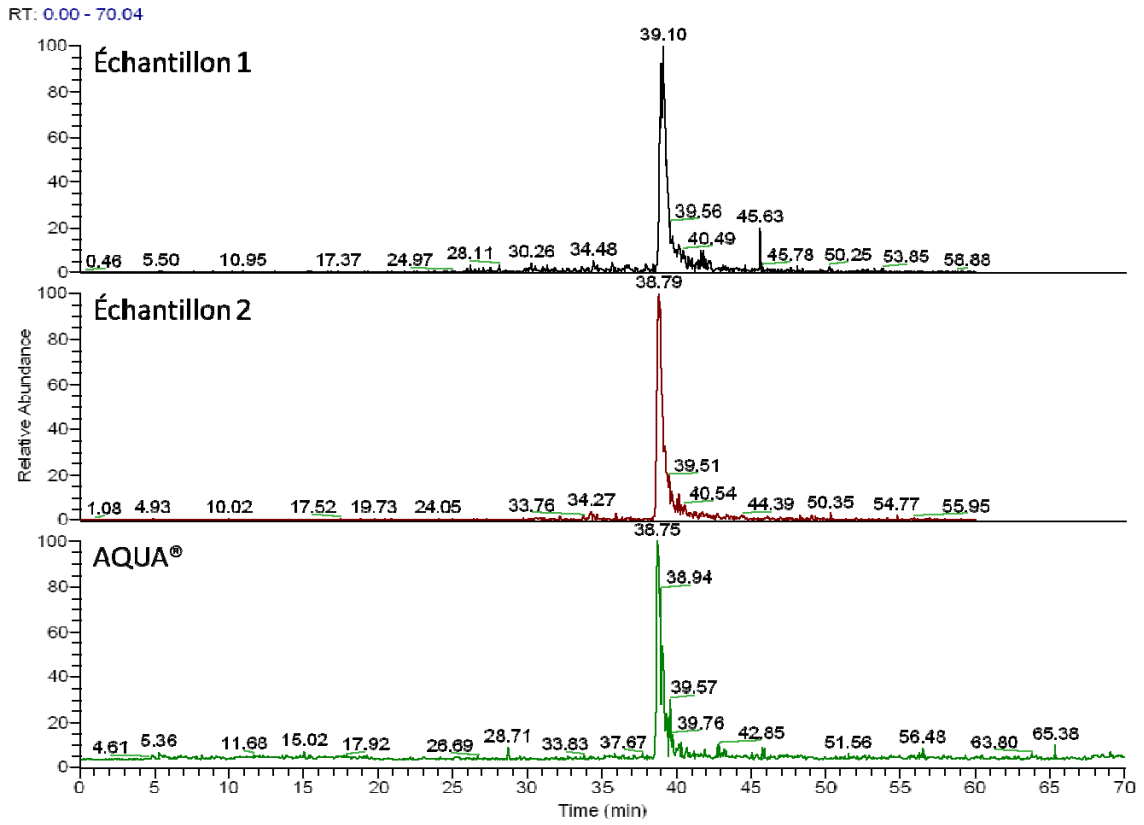


Figure 31 : Abondance relative du peptide WQEGNVFSCSVMHEALHNR mesurée en SRM MS-MS

## PARTIE III

Antigènes solubles et  
tolérance immunitaire :  
importance des  
polymorphismes génétiques  
des parasites infectants

## Introduction

L'hypothèse de la tolérance immunitaire a été avancée suite à des études épidémiologiques pour expliquer que les enfants nés d'une mère ayant une infection palustre placentaire à l'accouchement font des infections palustres plus précocement que les autres. Cette hypothèse a été étayée par des approches immunologiques annonçant, entre autres, que certains antigènes parasitaires passeraient la barrière placentaire, sensibiliseraient le fœtus et seraient responsables de ce phénomène observé chez l'enfant. L'hypothèse développée dans ce travail propose que la tolérance immunitaire est un phénomène qui ne pourrait être induit que par les antigènes porteurs des mêmes polymorphismes que ceux rencontrés *in utero*, ceux-ci étant les seuls à pouvoir être en contact avec le fœtus. En caractérisant les polymorphismes des antigènes des parasites infectant la mère à l'accouchement et ceux dont l'enfant a fait l'expérience lors de ses premières infections, et en mettant en parallèle les données cliniques de l'enfant, il serait possible d'avancer que la rencontre avec des antigènes parasitaires solubles est responsable du phénomène de tolérance immunitaire. Une autre approche serait de vérifier si les enfants sont plus permissifs aux infections caractérisées par le polymorphisme retrouvé *in utero* et ainsi valider (ou non) l'hypothèse de travail.

## Matériel et méthode

Au sein de l'étude, 46 enfants nés de mère impaludée à l'accouchement ont été infectés au moins une fois pendant leurs 18 premiers mois de vie. Les polymorphismes des antigènes retrouvés *in utero* et au cours du suivi de l'enfant ont été caractérisés par analyse de fragments (électrophorèse par capillaire) puis associés aux données cliniques et biologiques recueillies pendant leur suivi.

La seconde approche (savoir si les enfants sont plus tolérants aux infections caractérisées par le polymorphisme retrouvé *in utero*) a été abordée par 2 stratégies complémentaires de géographie de la santé (cartographie et indice de concentration des allèles) et de statistiques.

## Résultats

La comparaison des données cliniques et des polymorphismes génétiques parasitaires ne permet pas de répondre à l'hypothèse de travail. En revanche, les approches géographique et statistique suggèrent que les enfants nés de mères ayant une infection placentaire sont plus sensibles à l'infection caractérisée par les mêmes polymorphismes du gène *glurp* que ceux caractérisés à partir de l'apposition placentaire et donc potentiellement rencontrés par le fœtus *in utero*.

## Conclusion

Ce travail a permis de confirmer le rôle des polymorphismes génétiques parasitaires dans la sensibilité aux infections des enfants nés de mères infectées à l'accouchement. Le phénomène de tolérance immunitaire causée par des antigènes parasitaires solubles semble être validé par ce travail.

# I/ Approche biologique

## I /MATERIEL ET METHODES : OUTILS BIOLOGIQUES ET ANALYSE STATISTIQUE

### ***I-1/ Groupes de sujets, choix de la méthode et matériel***

Au regard des observations faites par les études épidémiologiques, la tolérance immunitaire peut se traduire par une infection précoce. En d'autres termes, ce sont les parasitémies et le délai de survenue des infections qu'il faut comparer entre les infections caractérisées par le même polymorphisme qu'*in utero* (MPIU) ou par un polymorphisme différent (PDIU). L'hypothèse de travail se base sur la tolérance immunitaire et seuls les enfants nés d'une mère porteuse de parasites placentaires sont concernés par ce phénomène. Dans ce contexte, l'enfant est donc son propre témoin, puisque ce sont les infections d'un enfant né de mère infectée qui doivent être comparées entre elles. De plus, certaines études épidémiologiques ont observé une précocité de l'infection sans prendre en compte la symptomatologie [160–162] alors que d'autres ont considéré les accès palustres précoces [163]. Il serait donc également intéressant d'associer la symptomatologie à notre analyse. Quarante six couples mère/enfant de la cohorte de Tori-Bossito sont concernés par notre approche.

Les polymorphismes génétiques parasitaires ont été caractérisés par une approche de biologie moléculaire à partir des confettis collectés à l'accouchement et pendant le suivi de l'enfant (visites mensuelles systématiques et consultations). Les antigènes MSP2 et GLURP ont été sélectionnés pour leur important polymorphisme et la présence d'une seule copie de leurs gènes dans le génome du parasite. Les allèles des 2 gènes étudiés ont été amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) et caractérisés par analyse de fragments. Cette technique n'est pas extrêmement rigoureuse. En effet, 2 allèles qui possèdent des différences de séquences mais qui ont la même taille sont, par cette méthode, considérés comme identique. Le nombre de polymorphismes génétiques est donc sous-estimé. Cependant, au vu du nombre d'échantillons, cette approche a été préférée à du séquençage.

### ***I-2/ Stratégie, extraction et amplification***

#### ***I-2-1/ Stratégie d'analyse biologique***

En se basant sur la lecture microscopique des appositions placentaires, 60 échantillons de mères ont été sélectionnés. Une première PCR de détection de *P. falciparum* a été réalisée sur les échantillons maternels (confettis de sang placentaire) pour confirmer l'infection. Les confettis du suivi des enfants dont les échantillons maternels étaient positifs en PCR ont été testés en PCR de détection de *P. falciparum* (Figure 32). Seuls les échantillons positifs à cette première PCR ont été sélectionnés

pour caractériser le polymorphisme des gènes codant pour les antigènes parasitaires (par une seconde PCR). Cette stratégie a ainsi pu limiter le nombre d'échantillons à exploiter par électrophorèse capillaire en passant de 1600 confettis testés en PCR de détection à 270 échantillons pour la PCR d'identification allélique.

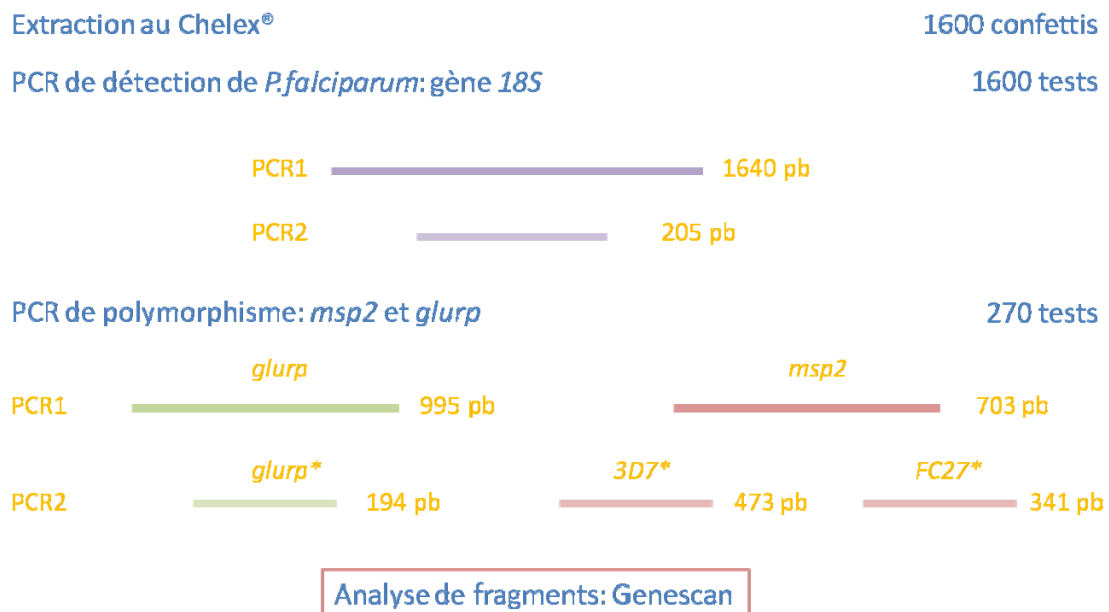


Figure 32 : Stratégie des PCR réalisées pour caractériser les polymorphismes des gènes codant pour des antigènes des parasites infectant la mère et son enfant au cours du suivi  
PCR : polymérase chain reaction ; pb : paire de bases ; \* : amorces anti-sens marquées avec un fluorochrome.

#### I-2-2/ Extraction

Le protocole suivi correspond à celui publié par Plowe *et al.*, en 1995 [196]. Brièvement, des confettis de tailles similaires sont découpés précautionneusement à l'aide de ciseaux et de pince préalablement désinfectés à l'eau de javel. Les confettis sont incubés toute la nuit à 4°C dans une solution de saponine à 0.5%. Le surnageant est délicatement éliminé. Les confettis sont ensuite rincés 30 minutes dans la glace avec du PBS (phosphate buffered saline) avant d'ajouter une solution de Chelex® à 7%. Les échantillons sont chauffés 10 min à 100°C. Le surnageant est ensuite collecté en prenant garde à ne pas prélever de billes de Chelex® qui inhiberaient les PCR. Les ADN extraits sont conservés à -20°C.

#### I-2-3/ PCR de détection de *P. falciparum*

Une PCR nichée est réalisée en amplifiant le gène 18S pour déterminer la présence de *P. falciparum* [197]. Le protocole est résumé dans le Tableau 9. Les premières amplifications sont réalisées avec un volume total de 50µL. L'enzyme utilisée est la GoTaq polymérase de Promega à 1.25 unité. Le mélange réactionnel est composé de 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs et 250 nM de chacune des

amorces. Les deuxièmes amplifications sont réalisées avec un volume total de 20µL composé des mêmes concentrations de chacun des réactifs et de la même enzyme.

Amorces		Première PCR		Deuxième PCR	
Sens		rPLU1 5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTG-3'		FAL1 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'	
Anti-sens		rPLU5 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC-3'		FAL2 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	
Taille attendue de l'amplicon		1640 pb		205 pb	
Cycles	Etapes	Température (en °C)	Durée	Température (en °C)	Durée
1	Dénaturation initiale	94	4 min	94	4 min
	Dénaturation	94	30 sec	94	30 sec
2	Hybridation	63	1 min	63	1 min
	Elongation	72	1 min	72	1 min
		→effectuer 5 fois le cycle 2		→effectuer 5 fois le cycle 2	
3	Dénaturation	94	30 sec	94	30 sec
	Hybridation	55	1 min	58,2	1 min
	Elongation	72	1 min	72	1 min
		→effectuer 30 fois le cycle 3		→effectuer 35 fois le cycle 3	
4	Elongation finale	72	4 min	72	4 min

**Tableau 9 : Amorces utilisées et paramètres de la PCR de détection de *P. falciparum***

#### I-2-4/ PCR de polymorphisme de *msp2* et *glurp*

Une PCR nichée est réalisée pour caractériser les polymorphismes des gènes *msp2* et *glurp* de *P. falciparum*. Les amorces sélectionnées sont celles publiées dans le document « Methods in Malaria Research » [198], excepté l'amorce anti-sens utilisée pour la deuxième amplification de *glurp* (voir le paragraphe consacré à *glurp* ci-dessous). Le programme est détaillé dans les Tableau 10 et Tableau 11. Toutes les amplifications sont réalisées dans un volume total de 50µL. La Taq polymérase d'Applied Biosystem est utilisée à 0.25 unité. Le mélange réactionnel est composé de 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs et 250 nM de chacune des amorces, excepté pour l'amplification de *msp2-FC27* où il a été utilisé 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Pour les deuxièmes PCR, les 3 amorces anti-sens sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome spécifique, à savoir le 6-FAM (6-CarboxyFluorescein Aminohexyl Amidite) pour *msp2-3D7*, HEX (6-(4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-3',6'-dipivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)-hexyl-1-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite) pour *msp2-FC27* et NED pour *glurp*. Le fluorochrome 6-FAM émet à 517 nm dans le bleu, le HEX émet à 556 nm dans le vert et le NED émet à 575 nm dans le jaune. Ainsi, les PCR ont été réalisées séparément et ont été mixées pour la lecture par électrophorèse capillaire.



*m*sp2

		Amorces		Première PCR		Deuxième PCR		
		Sens	Anti-sens	Température (en °C)	Durée	Température (en °C)	Durée	
<i>m</i> sp2		5'-ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA-3'	5'-CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT-3'	95	7 min	95	7 min	
		Taille attendue de l'amplicon		703 pb		473 pb		
<i>m</i> sp2-3D7	1	Dénaturation initiale		95	7 min	95	7 min	
	2	Dénaturation		95	1 min	95	1 min	
		Hybridation		62	1 min	67	1 min 30 sec	
		Elongation		72	1 min	72	1 min	
				→effectuer 40 fois le cycle 2		→effectuer 40 fois le cycle 2		
	3	Elongation finale		72	10 min	72	10 min	
	<i>m</i> sp2-FC27							

**Tableau 10 : Amorces utilisées et paramètres de la PCR de caractérisation du polymorphisme de *m*sp2**

K=G+T, R=A+G, Y=C+T

*glurp*

L'amorce anti-sens de *glurp* a été modifiée par rapport au protocole décrit dans « Methods in Malaria Research » car la taille attendue de l'amplicon est de 983 pb. Le marqueur de taille utilisé au Genescan est le LIZ 1200 (AppliedBiosystems, Forster City, USA) et des tailles allant jusqu'à 1200 pb peuvent lui être assignées. Cependant, une certaine variation de taille est attendue et aurait pu mener à des pics en dehors de cette échelle de détection. De plus, les mesures correspondant à des tailles élevées ne sont pas très résolutive. Il a donc été choisi de dessiner une autre amorce permettant d'obtenir un amplicon de taille plus raisonnable.

**A** Séquence nucléotidique de l'amplicon de *glurp*:

GT<sup>-</sup>CACACTCAACAATTAGATTGATCATAAAACAGTTGATCCAGAAATAGTAGAAGT<sup>-</sup>GAAGAAATTCCTTCAG  
 AACTACATGAAAATGAAGTGCTCATCCAGAAATTGTTGAAATTGAGGAAGTTTTCTGAACCAATCAAAA<sup>-</sup>AA  
 CGAATTTCAAGAAATAATGAAGATGATAAAAGTGACATA

Séquence protéique obtenue à partir de la séquence nucléotidique précédente (en supprimant le 1<sup>er</sup>  
 nucléotide pour être dans le bon cadre de lecture):

VHTEQLDLDHKTVDP EIVEVEEIEPSELHENEVAHPEIVEIEEVFPEPNQNN EFQEI NEDDKSAH

**B**

```

1 MRNLFHITIC LVTLNLFIL EISA KTNTSEN RNKRI GGPKL RGNVTSNIKF PSDNKGKIIR
61 GSNDKLNKNS EDVLEQSEKS LVSENVPSGL DIDDPKESI FIQEQEQGT HSELNPETSE
121 HSKDLNNGS KNESSDIISE NNKSNKVNQH FESLSOLELL ENSSQDNL DKDTISTEPFPN
181 QKHKDLQDL NDEPLEPFP QIHKDYKRN LIN EEDSEPP PROKHKKVDN HNEEKNVFHE
241 NGSANGNQGS LKLSFDEHL KDEKIENEPL VHENLSIPND PIEQLNQPE QETNIQEQLY
301 NEKQNVEEKQ NSQIPSLDLK EPTNEDILPN HNPLENIKQS ESEINHVQDH ALPKENIDK
361 LDNQKEHI DQ SQHNI NVLQE NNI NNHQL EP QEKPNIESPE PKNIDSEIIL PENVETEEI
421 DDVPSPKHSN HBT FEEETS E SBHEEAVSEK NAHETVEHEE TVSQESNPEK ADNDGNVSQN
481 SNNELNEN
489 EFVSEKSEHEBAE NEESSLE EGHHEEIVPEQN NEESGESKLVDNDEGGFEEAH HENFSSEVSNSELNEN
558 EFVESDKSVTEPAEH
573 EEVVS ESNPEPAE NEESSI EEAHQEEIVPEQND EESGESGLVDNDEGGFEEPNHEEFEPDQND SELSEN
643 ELVSEKSVSEPAEHV
659 EIVSEKSVSEPAEHV
674 EIVSEKSVSEPAEHV
689 ESVSEQS NNEPSEKKDGPVPSKPFEEIEKVYDQPKIVDLQIIEPNFVDSQPNPQHPVEPS
749 FVKIEKVPSEENKHASVDP EYKKEKNVSEVVEEKQNSQESVEEIPVNEDEFED VHTEQLD
809 LDHKTVDPEI VEVEEIPSEL
829 HENEVAHPEIVEIEEVFPEPNQNN EFQEI NED
861 DKSAHQHEI VEVEEILPE
881 DKNEKVEHEI VEVEEILPE
900 DKNEKGQHEI VEVEEILPE
920 DKNEKVEHEI VEVEEILPE
939 DKNEKGQHEI VEVEEILPE
958 DKNEKVEHEI VEVEEILPE
977 DKNEKGQHEI VEVEEILPE
996 DKNEKVEHEI VEVEEILPE
1015 DKNEKGQHEI VEVEEILPE
1035 DKNEKGQHEI VEVEEILPE
1054 DKNEKVEHEI VEVEEILPE
1073 DKNEKVEHEI VEVEEILPE
1092 IVEIEEVP SQ TNNNENIETI KPREEKNFE SVEEKAIPQSP VVPTLNENEN VTPKPSEGRS
1152 TKPDI VQIKI VQENKPNKKE TPVVDGPKHV EQNIQEDDND EEDDDDI DFE GLSRKDDDEKD
1212 SSNKNNKSS FITYISTKKF KKVSTIVSV MINAYDGVIQ VVSTIKGEAK DJVIEFFQNI
    
```

**C**

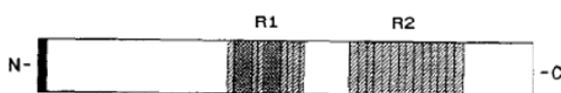


Figure 33 : Localisation de l'amplicon traduit par rapport aux régions répétées de GLURP (réalisé d'après [114])

Dans la Figure 33 – A, sont représentées les séquences nucléotidiques de l'amplicon et leur traduction en séquence protéique (surligné en rose). Borre *et al.*, ont décrit les zones de répétitions R1 et R2 de la protéine GLURP, schématisées dans la Figure 33 en B et C [114]. Le second bloc encadrant les séquences répétées de la région R2 héberge également l'amplicon (surligné en rose) généré avec la nouvelle amorce. La nouvelle amorce permettra donc l'amplification d'un fragment d'ADN polymorphe, dont les variations de séquences seront utiles pour la caractérisation des gènes codant pour les antigènes des parasites infectants.

		Amorces	Première PCR		Deuxième PCR	
		Sens	5'-TGAATTTGAAGATGTTTCACTGAAC-3'		5'-TGTTCACTGAACAATTAGATTTAGATCA-3'	
		Anti-sens	5'-GTGGAATTGCTTTTCTTCAACTAA-3'		[NED]5'-TATGTGCACCTTTATCATCTTCATT-3'	
		Taille attendue de l'amplicon	995 pb		194 pb	
<i>glurp</i>	Cycles	Etapes	Température (en °C)	Durée	Température (en °C)	Durée
	1	Dénaturation initiale	95	7 min	95	7 min
		Dénaturation	95	1 min	95	1 min
	2	Hybridation	54	1 min	54	1 min 30 sec
		Elongation	72	1 min	72	1 min
			→effectuer 40 fois le cycle 2		→effectuer 40 fois le cycle 2	
3	Elongation finale	72	10 min	72	10 min	

Tableau 11 : Amorces utilisées et paramètres de la PCR de caractérisation du polymorphisme de *glurp*

### I-3/ Analyse de fragments et nettoyage des données

#### I-3-1/ Protocole

Pour chaque échantillon, les produits de PCR issus des 3 PCR nichées ont été mixés selon un ratio de un tiers pour l'analyse de fragments. Les concentrations en sels dans les échantillons pouvant ralentir la migration et gêner l'analyse, il a été effectué une purification sur colonnes de Sephadex G50. Les échantillons ont ensuite été dilués au 1/10° puis mixés avec 8 µL de Hi-Di formamide et 0,5 µL de marqueur de taille LIZ 1200 (AppliedBiosystems, Forster City, USA). Les échantillons ont été dénaturés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être injectés dans l'analyseur ABI 3130XL. Chaque amplification a donné lieu à des pics de fluorescence correspondant aux différents allèles des gènes *msp2* et *glurp*. L'analyse des résultats bruts a été faite par le logiciel GeneMapper v4.0 (AppliedBiosystems, Forster City, USA).

#### I-3-2/ Analyse informatique

La Figure 34 représente l'analyse d'un échantillon par le logiciel Genemapper v4.0. Dans l'électrophorégramme sont représentés en noir les pics correspondant aux amplifications de *glurp* et en orange le marqueur de taille LIZ 1200. Ainsi, dans cet échantillon, 4 allèles aux alentours de 200 pb ont été amplifiés. En dessous de l'électrophorégramme se trouve la table recensant la liste des pics observés, avec pour chacun, la taille du pic (« size »), son intensité de fluorescence (« height », en rfu (relative fluorescence unit)) et l'aire sous le pic (« area »).

La considération des pics repose sur leurs intensités de fluorescence en fonction du seuil de positivité. Genemapper v4.0 définit par défaut que le seuil pour prendre en considération les pics est de 50 rfu ; dans la littérature, les valeurs varient entre 80 [45] et 300 rfu [199,200]. Au regard des différents profils de réponse, nous avons placé le seuil d'intensité de fluorescence minimum à 100 rfu.

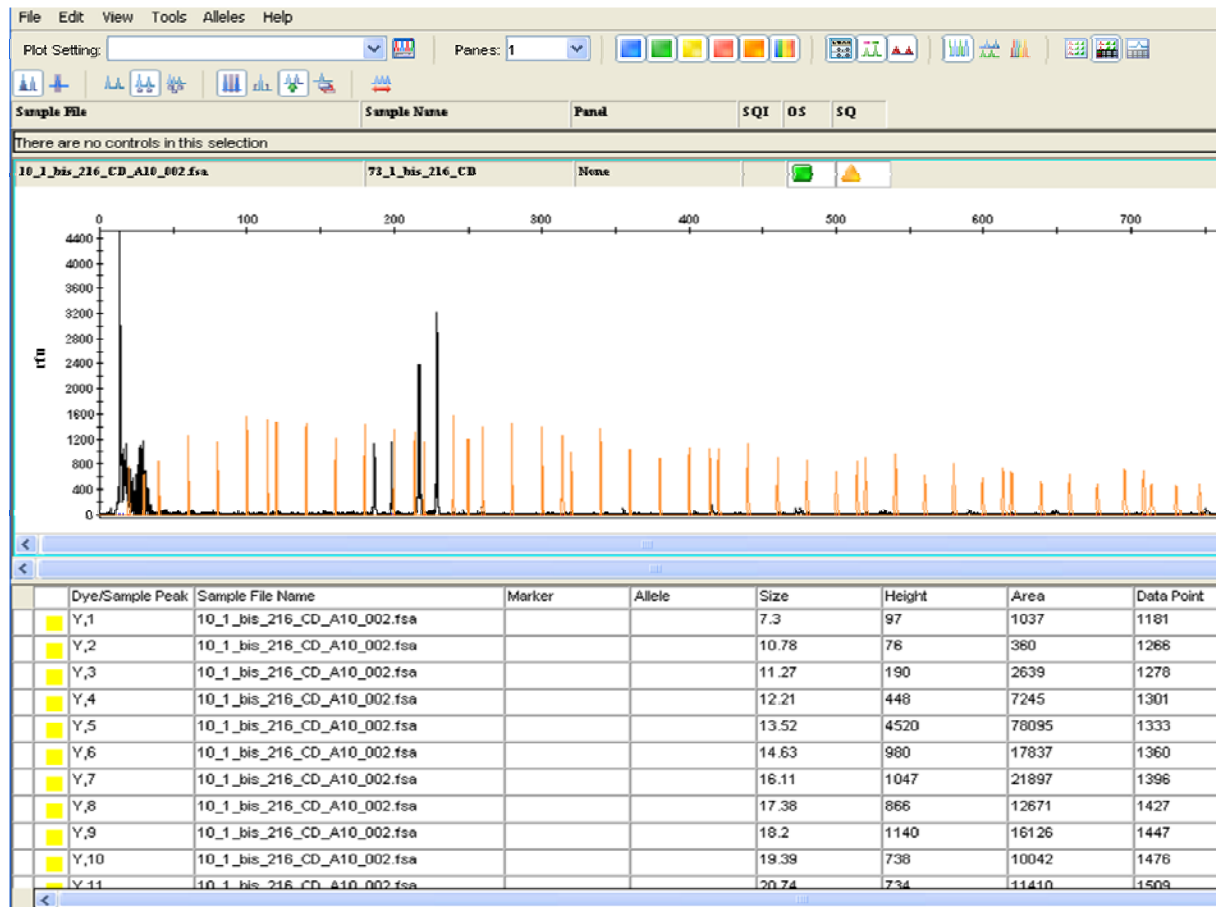


Figure 34 : Electrophorégramme et table de valeur des pics des produits de PCR fluorescents

De même, la limite en nombre de bases permettant de distinguer 2 pics très proches au sein d'un même échantillon est variable. Dans certaines études, la limite est placée à 1 nucléotide [200]. D'autres études placent la limite à 3 nucléotides, ce qui correspond à un codon [199]. Nous avons préféré cette seconde option. Quelques échantillons ont été testés en double afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus. Les différences de tailles pour un même pic varient de l'ordre de 2 nucléotides, ce qui renforce le choix de placer la limite à 3 nucléotides pour distinguer 2 pics différents.

La limite en nombre de bases permettant de déterminer si 2 pics inter-échantillon sont identiques varie également de 1 à 3 nucléotides, selon les références [45,199,200]. Nous avons opté pour 3 nucléotides.

Enfin, Liljander *et al.*, ont publié un article en 2009 qui portait sur l'analyse de fragments de *msp1* et *msp2* par électrophorèse capillaire [199]. Les auteurs ont montré que l'analyse par cette technique faisait apparaître certains artéfacts qui n'étaient pas visibles avec l'analyse sur gel d'agarose. Ils ont classé ces artéfacts en 2 catégories : les « pics compagnons » (companion peak) et le « bégaiement

de pics » (stutter peaks). Les pics compagnons ne peuvent être détectés que si les échantillons sont testés en réplicat (Figure 35 – A). Dans cette étude, une dizaine d'échantillons ont été analysés en double, pour lesquels aucun pic compagnon n'a été détecté. En revanche, des bégaiements de pics ont été retrouvés. Tout comme les auteurs le décrivent, des bégaiements d'un multiple de 6 pb ont été observés pour l'allèle *msp2-3D7* et d'un multiple de 12 pb pour l'allèle *msp2-FC27* (Figure 35 – B). Pour l'allèle *msp2-FC27*, il a également été retrouvé le bégaiement de 96-97 pb signalé par les auteurs. Pour chaque groupe de bégaiement de pics, seul le pic possédant l'intensité la plus forte (et l'aire sous pic la plus grande dans le cas où deux pics possédaient la même intensité), a été conservé. Il n'a été retrouvé aucun bégaiement pour *glurp*.

Un programme informatique conçu à partir du logiciel Stata XI® a permis de nettoyer les données de manière automatique et standardisée.

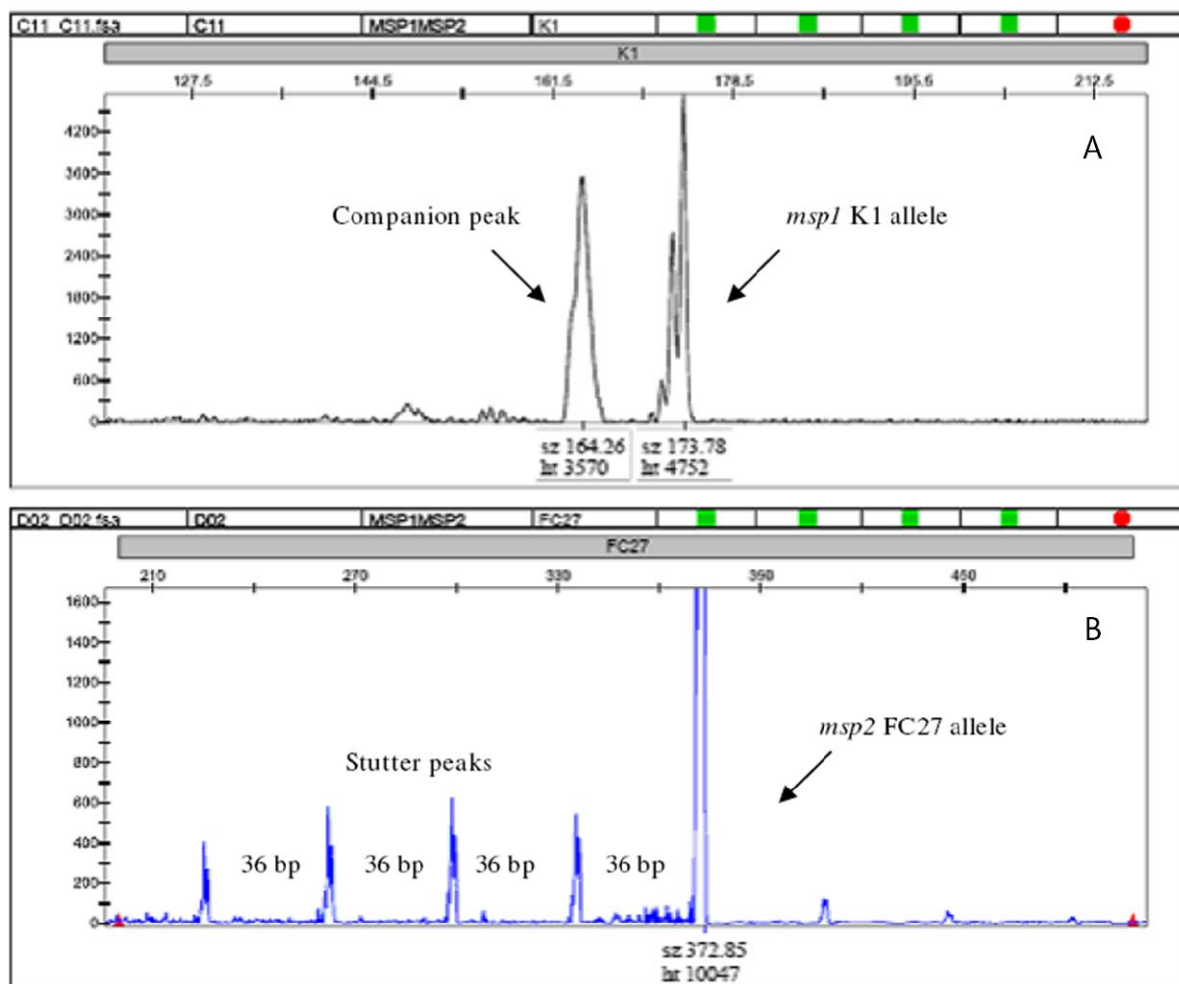


Figure 35 : Profils d'artéfacts obtenus lors d'une analyse par électrophorèse capillaire. A) pic compagnon ; B) bégaiement de pics [199]

## ***1-4/ Analyse statistique***

### I-4-1/ Stratégie d'analyse et tests

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata XI® selon 2 stratégies :

- les données cliniques des enfants ayant été infectés au moins une fois par le MPIU ont été comparées à celles des enfants ayant été infectés par un PDIU ;

Toutes les infections d'un même enfant sont moyennées afin de prendre en considération l'effet « enfant », puis les moyennes de chaque groupe sont comparées par un test *U* Mann-Whitney. Cette approche ne semble pas très satisfaisante mais elle a néanmoins l'avantage d'augmenter la puissance des tests statistiques en prenant en considération les 46 couples mère/enfant.

- par enfant, les données cliniques des infections caractérisées par le MPIU ont été comparées à celles des infections caractérisées par des PDIU.

Pour chaque enfant, il y a les infections avec le même allèle ou avec un allèle différent. Pour prendre en considération l'effet « enfant », les moyennes des données cliniques mesurées par enfant et par groupe ont été calculées. Puis les moyennes de chacun des groupes sont comparées avec le test de Wilcoxon qui prend en compte l'appariement des évènements de chaque enfant.

### I-4-2/ Les variables

La parasitémie est définie selon la formule suivante : (le nombre de trophozoïtes x 100) / le nombre de leucocytes.

Le délai de survenue de la première infection est le nombre de jours entre la date de naissance et la première infection détectée par PCR.

Le délai entre les infections est calculé pour chaque enfant et est défini comme étant le nombre de jours entre 2 infections détectées par PCR.

La symptomatologie est définie par une infection (PCR positive) avec déclaration de symptômes : température supérieure à 37,5°C au moment de la visite ou déclaration de fièvre dans les dernières 48 heures.

## ***1-5/ Le rôle de chacun dans ce projet***

Les confettis collectés sur le terrain ont été triés par Rodolphe Ladékpo (Centre d'Étude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et l'Enfance/IRD) puis je les ai rapatriés en France. Avec l'aide d'Emmanuelle Renard (UMR 216) nous avons réalisé les extractions et les PCR. J'ai contacté Bruno Coste et Natacha Martin qui travaillent sur la plateforme de génotypage et de séquençage du Centre Hospitalier Universitaire d'Henri Mondor pour la lecture des échantillons sur l'analyseur ABI 3130XL. Natacha a également réalisé les purifications et la dilution des produits de

PCR. Bruno m'a formée sur le logiciel Genemapper v4.0 pour que je puisse réaliser les analyses. J'ai conçu le programme informatique sur Stata XI avec les conseils avisés de Bich Tran Huynh, alors étudiante en thèse d'épidémiologie au sein de l'UMR 216. Les analyses descriptives et statistiques ont été réalisées avec les conseils de Florence Migot-Nabias et d'André Garcia.

## II / RESULTATS

### II-1/ Suivi des échantillons

La Figure 36 représente le devenir des échantillons.

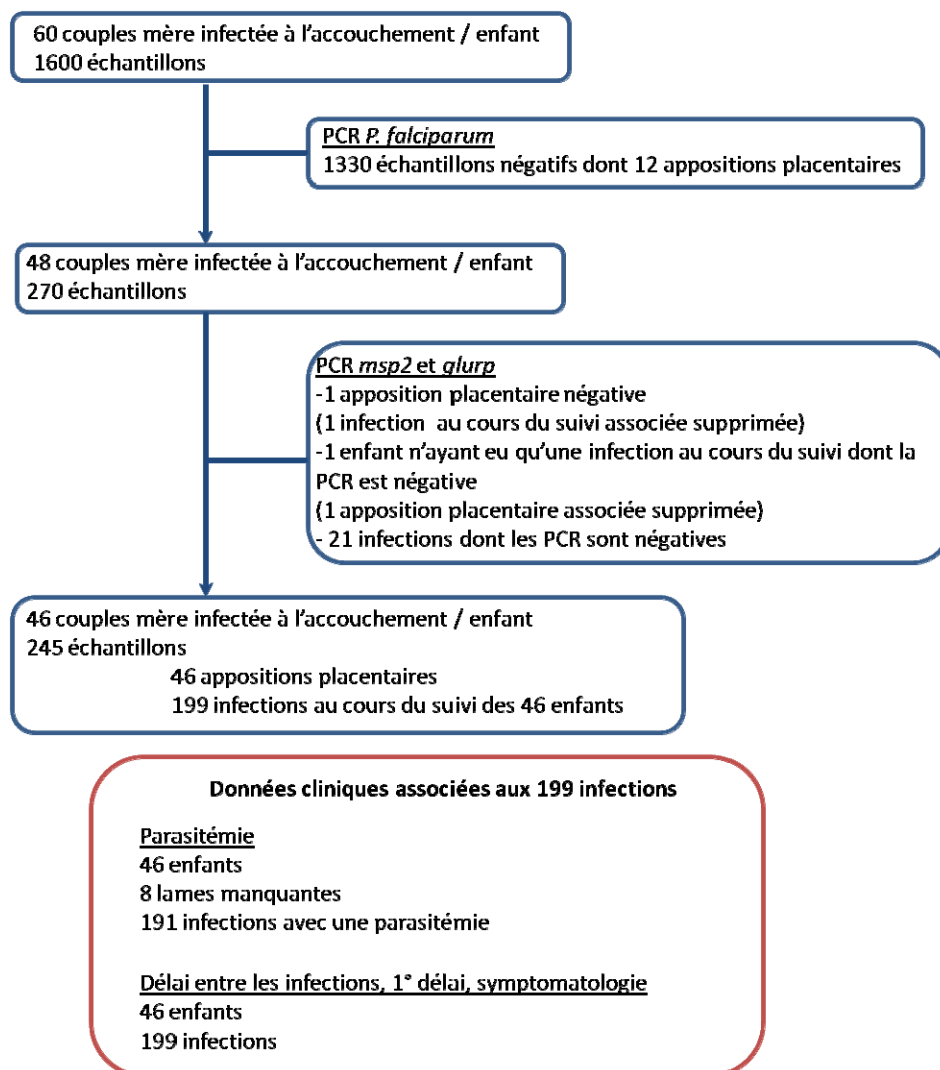


Figure 36 : Diagramme de flux des échantillons des 60 couples mère/enfant et variables associées

La PCR de détection de *P. falciparum* a permis d'éliminer environ 80% des confettis initialement sélectionnés. Cette PCR s'est révélée positive pour 23 échantillons pour lesquels la PCR de caractérisation des polymorphismes de *msp2* et *glurp* fut négative. La PCR de *msp2* et *glurp* est

positive pour 199 infections pendant le suivi des 46 enfants. La comparaison de ces résultats à ceux obtenus en lecture microscopique a permis de mettre en évidence 55 infections (29%) sub-microscopiques sur 191. Huit infections n'ont pas de parasitémie associée pour des raisons diverses : lames illisibles ou lames manquantes.

## **II-2/ Description des données brutes**

### II-2-1/ Diversité allélique

Les graphiques de la Figure 37 représentent la diversité allélique de chaque gène étudié dans la zone d'étude, c'est-à-dire le nombre de fois où chaque allèle a été retrouvé tout au long du suivi des 46 couples mère/enfant. Le gène *msp2-3D7* possède une grande diversité avec 108 allèles différents dont peu sont présents avec une fréquence élevée (18 occurrences au maximum). Le gène *msp2-FC27* est beaucoup moins polymorphe avec 35 allèles présents en plus grand nombre avec un maximum de 43 occurrences. Enfin, *glurp*, qui est plus diversifié que *msp2-FC27*, compte 86 allèles dont 2 sont particulièrement fréquents (les allèles de taille 161 pb et 308 pb), alors que les autres allèles ont une abondance similaire à celle retrouvée pour *msp2-3D7*. Ces observations semblent assez conformes à ce que l'on retrouve dans la littérature pour *msp2* [45,200,201] et *glurp* [114,201,202] (même si les amorces utilisées ne sont pas tout à fait les mêmes que dans cette étude).

En bleu sont représentés les allèles retrouvés chez les mères et en rouge ceux des nouveau-nés (Figure 37). Cette distinction aurait pu mettre en évidence des allèles retrouvés particulièrement chez l'une des deux populations. Il ne semble cependant pas y avoir de sélection des allèles due au groupe d'individus infectés.

Le Tableau 12 recense de manière chiffrée les informations de la Figure 37. On constate que les allèles retrouvés chez les mères représentent environ la moitié des allèles retrouvés chez les nouveau-nés et que ce ratio est respecté pour chaque gène. Concernant les tailles attendues/observées des produits de PCR, les fourchettes sont assez larges et commencent assez bas. Dans d'autres études, les tailles d'amplicons minimales sont de l'ordre de 175 pb pour *msp2* [201,202] alors que Kobbe *et al.*, ont également considéré les tailles avoisinant les 100 nucléotides [45]. Dans cette étude, un seuil de 100 nucléotides a été arrêté pour démarquer les amorces (notamment) des amplicons. Peut être que ce seuil devrait être remis en question. Cependant, en étudiant précisément les données, on constate qu'il n'existe pas de « saut » de tailles entre celles inférieures et celles supérieures à 100 pb. Concernant les hautes tailles observées pour *glurp* (>700 pb), elles ne semblent pas particulièrement étonnantes. Elles sont, pour certaines, observées



plusieurs fois parmi différents échantillons. Dans cette étude, la taille maximum des allèles de *glurp* correspond à environ 4 fois la taille attendue, alors que Borre *et al.*, Masega *et al.*, et Cattamanchi *et al.*, ont observé des tailles allant jusqu'à 3 fois la taille attendue [114,201,202]. Pour valider les échantillons et déterminer si les tailles extrêmes ne sont pas dues à une erreur technique, il faudrait séquençer les produits de PCR.

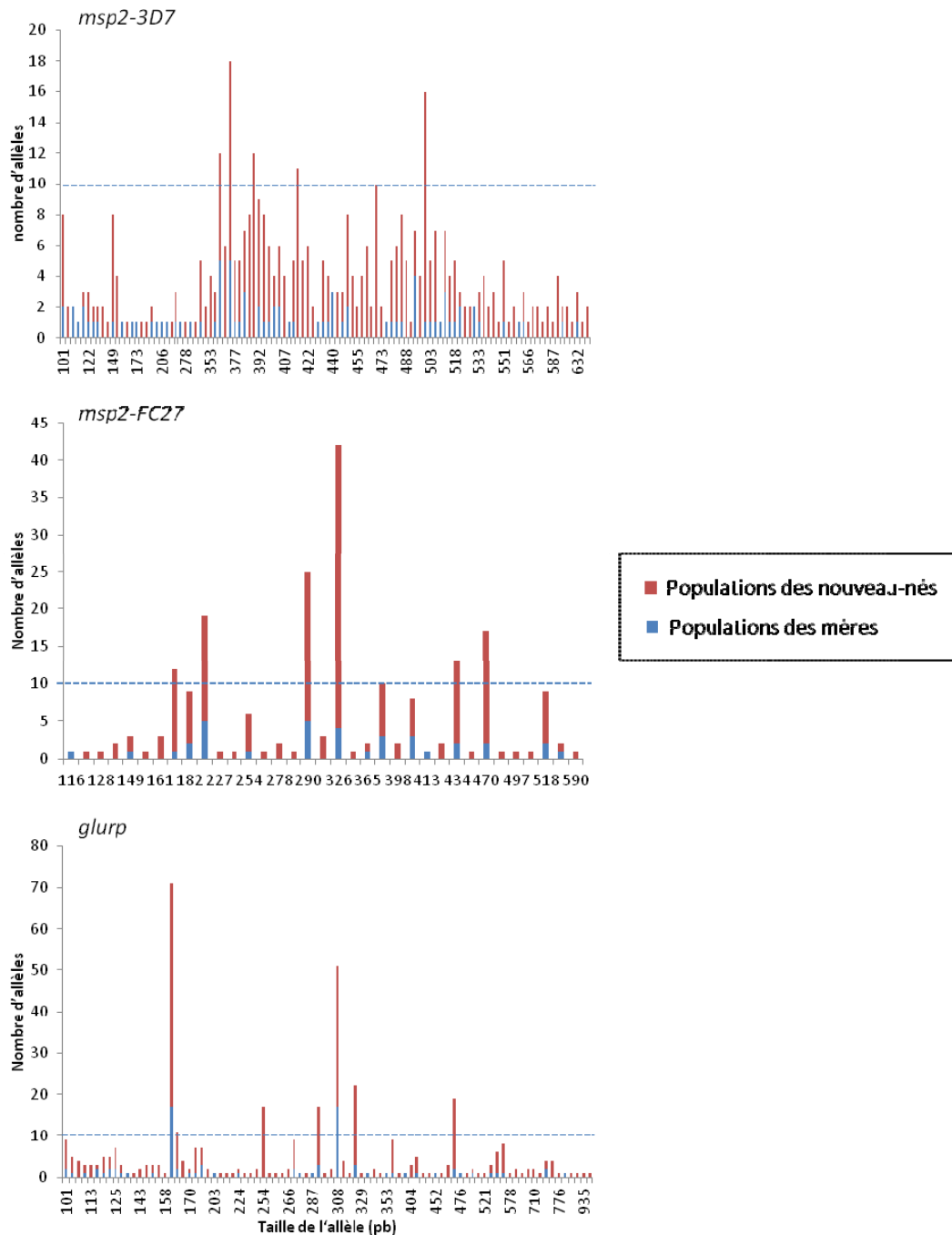


Figure 37 : Représentation graphique de la diversité allélique des gènes *glurp* et *msp2* (familles 3D7 et FC27)

	<i>msp2-3D7</i>	<i>msp2-FC27</i>	<i>glurp</i>
Nombre d'allèles sur toute l'étude	108	35	86
Taille des amplicons attendue (pb)	473	341	194
Taille des amplicons observée (pb ; min-max)	101 - 637	116 - 590	101 - 944
Nombre d'allèles dans la population des mères	58	16	37
Nombre d'allèles dans la population des nouveau-nés	91	33	76
Total allèles communs entre une mère et son enfant	5	6	7
Nombre d'allèles >10 occurrences	6	6	6
dont allèles communs entre une mère et son enfant	1	4	4

Tableau 12 : Valeurs chiffrées de la diversité allélique des gènes *glurp* et *msp2* (familles 3D7 et FC27)

Il est également intéressant de voir si la prévenue du même allèle chez la mère et l'enfant est liée à la fréquence de ces allèles (Tableau 12). Ces deux paramètres semblent nettement liés (*msp2-FC27* (66%) et *glurp* (57%)) avec cependant moins de force pour *msp2-3D7* (20%). Cette question sera abordée dans la deuxième partie de ce projet.

#### II-2-2/ Multiplicité d'infection

La multiplicité d'infection (MOI) est définie comme étant le nombre de clones parasitaires infectant simultanément un individu au cours d'une piqûre. Dans cette étude, puisque chacun des gènes *msp2* et *glurp* n'est retrouvé qu'en une seule copie dans le génome du parasite, la MOI a été calculée en prenant le plus grand nombre de génotypes obtenu pour l'un ou l'autre des gènes. Pour *msp2*, le nombre de génotypes est égal à la somme des génotypes de *msp2-3D7* et *msp2-FC27*.

Visites	moyenne MOI	min	max	effectif
Apposition placentaire	3,0	1	9	46
Mensuelles	2,9	1	8	97
Consultations	3,1	1	10	102
Total	2,9			245

Tableau 13 : Multiplicité d'infection par type de visites au cours du suivi

La multiplicité d'infection est décrite dans le Tableau 13 pour chaque type de visite effectuée au cours du suivi. Quel que soit le moment du prélèvement, à l'accouchement, lors des visites mensuelles (généralement asymptomatiques) ou lors des consultations (généralement symptomatiques), la MOI ne varie que très peu : environ 3 clones infectent en moyenne simultanément l'individu. Plusieurs études ont montré une association positive entre la MOI et la

densité parasitaire ou la MOI et le risque de développer un accès clinique, notamment pour les enfants de moins de 2 ans [45,203–206]. A partir de 2 ans, l'association ne semble plus perdurer [204,207]. Cependant, Mayengue *et al.*, ne montrent pas d'association entre la MOI et la sévérité des cas de paludisme ni même avec la parasitémie, alors que l'étude a suivi des enfants âgés d'au moins 6 mois [208].

### II-3/ Données cliniques et tolérance immunitaire

#### II-3-1/ Comparaisons entre enfants : tous les antigènes confondus

La première série d'analyse consiste à comparer les données cliniques des enfants appartenant à 2 groupes :

- ceux ayant été infectés par un PDIU (quelque soit l'antigène),
- ceux ayant été infectés au moins une fois par le MPIU au cours du suivi.

Les enfants ayant été infectés au moins une fois par le MPIU (125 infections) font globalement plus d'infections que ceux qui ont été infectés par un PDIU (74 infections ; test du Chi2 de répartition  $p=0.01$ ).

Les résultats des différents tests statistiques sont synthétisés dans le Tableau 14. Aucune de ces différences n'est significative.

	Enfant n'ayant <b>jamais</b> eu d'infection avec un clone parasitaire présentant le même polymorphisme qu' <i>in utero</i> (PDIU) N=23 enfts ou n=74 inf		Enfant ayant été infecté <b>au moins une fois</b> avec un clone parasitaire présentant le même polymorphisme qu' <i>in utero</i> (MPIU) N=23 enfts ou n=125 inf		p
	n		n		
parasitémie* (/100 leuco)	71	459,51	120	287,32	0,3619 <sup>a</sup>
délai 1 <sup>o</sup> infection (jrs)	23	279,35	23	239,65	0,5678 <sup>a</sup>
délai entre infections (jrs)	74	134,38	125	91,33	0,2768 <sup>a</sup>
symptomatologie (nb d'inf; asympto/sympto)	74	29/45	125	61/64	0,188 <sup>b</sup>

**Tableau 14 : Comparaison des données cliniques et biologiques des enfants ayant rencontrés ou non le même polymorphisme qu'*in utero***

*enfts* : enfants ; *inf* : infections ; *leuco* : leucocytes ; *jrs* : jours ; (*a*)*sympto* : (*a*)symptomatique ; \* 8 parasitémies manquantes (voir Figure 36) ; *a* : test U Mann-Whitney ; *b* : test du Chi2

### II-3-2/ Comparaisons entre infections par des clones parasitaires présentant le même polymorphisme qu'*in utero* : tous les antigènes confondus

Au sein des 23 enfants ayant été infectés au moins une fois le MPIU, 2 groupes sont formés et comparés:

- les infections avec le MPIU,
- les infections avec un PDIU.

Aucune des comparaisons présentées dans le Tableau 15 ne montrent de différence significative. On peut néanmoins observer une tendance pour les infections caractérisées par le MPIU à être plus souvent asymptomatiques que celles occasionnées par un PDIU.

	Infection avec un clone parasitaire présentant un <b>polymorphisme différent (PDIU)</b>		Infection avec un clone parasitaire présentant le <b>même polymorphisme (MPIU)</b>		p
	N=14 enfts ou n=67 inf		N=9 enfts ou n=58 inf		
	n		n		
parasitémie* (/100 leuco)	63	283	57	292	0,526 <sup>c</sup>
délai 1 <sup>o</sup> infection (jrs)	14	224,57	9	263,11	0,413 <sup>c</sup>
délai entre infections (jrs)	67	95,90	58	86,05	0,637 <sup>c</sup>
symptomatologie (nb d'inf; asympto/sympto)	67	28/39	58	33/25	0,092 <sup>b</sup>

**Tableau 15 : Comparaison des données cliniques des infections caractérisées par le même polymorphisme qu'*in utero* ou par un polymorphisme différent**

*enfts* : enfants ; *inf* : infections ; *leuco* : leucocytes ; *jrs* : jours ; *(a)sympto* : (a)symptomatique ; \* 5 parasitémies manquantes (voir Figure 36) ; *c* : test Wilcoxon ; *b* : test du Chi2

### II-3-3/ Comparaisons entre enfants : *glurp*

Les comparaisons peuvent également être faites par antigène. Au vu des effectifs, seules les données de *glurp* peuvent être analysées selon la même stratégie d'analyse (comparaison entre enfants ou comparaison entre infections). Sur les 46 enfants, 5 ont une PCR positive pour *mip2* et négative pour *glurp*. Ces 5 enfants qui comptabilisent au total 10 infections ont été supprimés de l'analyse. Sur 41 enfants, 17 ont rencontré au moins une fois le MPIU (soit 87 infections) contre 24 qui ont été infectés par un PDIU (102 infections).

Dans le Tableau 16, sont synthétisés les différents tests statistiques qui comparent les données cliniques aux infections caractérisées par le MPIU ou par un PDIU. Ces tests ne mettent pas en évidence de différence significative entre les variables observées.

	Enfant n'ayant <b>jamais</b> eu d'infection avec un clone parasitaire présentant le même polymorphisme de <b>glurp</b> qu' <i>in utero</i> (PDIU) N= 24 enfnts ou n= 102 inf		Enfant ayant été infecté <b>au moins une fois</b> avec un clone parasitaire présentant le même polymorphisme de <b>glurp</b> qu' <i>in utero</i> (MPIU) N= 17 enfnts ou n= 87 inf		p
	n		n		
parasitémie* (/100 leuco)	98	370,82	84	282,09	0,427 <sup>a</sup>
délai 1° infection (jrs)	24	260,17	17	239,82	0,771 <sup>a</sup>
délai entre infections (jrs)	102	105,92	87	99,37	0,874 <sup>a</sup>
symptomatologie (nb d'inf; asympto/sympto)	102	46/56	87	40/57	0,904 <sup>b</sup>

**Tableau 16 : Comparaison des données cliniques et biologiques des enfants ayant rencontrés ou non le même polymorphisme de *glurp* qu'*in utero***

*enfnts* : enfants ; *inf* : infections ; *leuco* : leucocytes ; *jrs* : jours ; *(a)sympto* : (a)symptomatique ; \* 7 parasitémies manquantes ; a : test U Mann-Whitney ; b : test du Chi2

II-3-4/ Comparaisons entre infections par des clones parasitaires présentant le même polymorphisme de *glurp* qu'*in utero*:

Par contre, parmi les 87 infections (d'enfants ayant été infectés au moins une fois par le MPIU), 40 sont caractérisées par un PDIU et 47 par le MPIU. Il ressort de ces tests que les infections avec le MPIU sont davantage asymptomatiques et que la parasitémie a tendance à être moins élevée (Tableau 17).

	Infection avec un clone parasitaire présentant un <b>polymorphisme de <i>glurp</i> différent</b> (PDIU) N= 11 enfnts ou n= 40 inf		Infection avec un clone parasitaire présentant le <b>même polymorphisme de <i>glurp</i></b> (MPIU) N= 6 enfnts ou n= 47 inf		p
	n		n		
parasitémie* (/100 leuco)	38	291,47	46	274,34	0,088 <sup>c</sup>
délai 1° infection (jrs)	11	240	6	239,5	0,919 <sup>c</sup>
délai entre infections (jrs)	40	120,33	47	81,53	0,363 <sup>c</sup>
symptomatologie (nb d'inf; asympto/sympto)	40	13/27	47	27/20	0,03 <sup>d</sup>

**Tableau 17 : Comparaison des données cliniques des infections caractérisées par le même polymorphisme de *glurp* qu'*in utero* ou par un polymorphisme différent**

*enfnts* : enfants ; *inf* : infections ; *leuco* : leucocytes ; *jrs* : jours ; *(a)sympto* : (a)symptomatique ; \* 3 parasitémies manquantes ; c : test Wilcoxon ; d : test exact de Fischer

### III / CONCLUSION

Le choix des antigènes semble correct : le polymorphisme génétique retrouvé est assez étendu pour travailler sur l'hypothèse et caractériser convenablement les polymorphismes des antigènes. Une assez grande variabilité a été retrouvée, notamment pour *msp2-3D7* et *glurp*, conformément à ce qui a été publié dans la littérature.

Il semblerait que les infections caractérisées par le même allèle de *glurp* entraînent plus d'infections asymptomatiques (tendance également observée avec l'analyse avec tous les antigènes confondus (Tableau 15). Cependant, l'interprétation de ces résultats doit être faite avec prudence.

La critique essentielle est que toutes les infections ont été comptées indépendamment. L'étude plus précise des recrudescences/réinfections en fonction de la réponse clinique (notamment la symptomatologie) serait sans doute une meilleure approche. En effet, une seule et même infection est souvent caractérisée dans notre programme par une succession de mesures faites lors des passages mensuels systématiques (portage asymptomatique) puis de mesures à l'occasion des consultations (infections symptomatiques). Une ré-analyse des génotypes parasitaires permettrait d'assigner l'ensemble de telles mesures à une seule infection.

En conclusion, ces résultats ne semblent pas permettre de valider ou de réfuter l'hypothèse selon laquelle l'antigène porteur du même polymorphisme qu'*in utero* est associé à un phénomène de tolérance immunitaire. Cependant, une autre démarche peut être envisagée pour se rapprocher de l'hypothèse de travail. En effet, les données recueillies peuvent permettre de comparer la tolérance des enfants aux infections en fonction du polymorphisme génétique des parasites infectant. La question serait donc de savoir si l'infection d'un enfant par le MPIU est liée au hasard ou si le fait d'avoir été infecté *in utero* par un polymorphisme défini rend l'enfant permissif (ou tolérant) aux infections par ce même polymorphisme.

Dans cette hypothèse, une seconde hypothèse est sous jacente et doit être vérifiée au préalable. En effet, la probabilité d'être infecté par le MPIU dépend avant tout de la probabilité d'être infecté par n'importe quel allèle de l'antigène considéré qui n'est pas nécessairement liée au hasard. En effet, la circulation des parasites dans la zone d'étude et des polymorphismes génétique qu'ils portent n'est pas nécessairement homogène dans la zone. Si le polymorphisme rencontré *in utero* est concentré dans une région géographique précise, la probabilité qu'un enfant vivant dans cette zone rencontre ce polymorphisme augmente et la distinction entre le fait d'être plus exposé à ce polymorphisme ou d'être plus sensible à une infection avec ce polymorphisme ne pourra pas être établie. Par

conséquent, seuls les antigènes pour lesquels la distribution est totalement aléatoire dans la zone pourront être pris en considération afin de conclure sur notre hypothèse de travail.

## II/ Approche géographique

L'analyse spatiale des échantillons est le fruit d'une collaboration entre Charlotte Pierrat (géographe de la santé) et moi-même.

### **I/MATERIEL ET METHODES : OUTILS GEOGRAPHIQUES**

Trois types d'analyses ont été réalisés :

- Cartographie avec ArcGIS,
- Tests d'auto corrélation spatiale avec ArcGIS ,
- Indice de diversité.

ArcGIS est l'interface permettant l'analyse spatiale des informations géographiques.

#### ***I-1/ La cartographie***

Chaque allèle des loci *msp2* ou *glurp* est caractérisé par sa taille en paires de bases. Pour chaque locus et famille allélique, les allèles les plus fréquents (avec un nombre d'occurrences supérieur à 10 sur tout le suivi) ont été cartographiés avec ArcGIS (logiciel ESRI). Ainsi, pour chaque carte, il est possible de suivre la répartition des allèles dans la zone d'étude et ce, entre juin 2007 et janvier 2010. Cette représentation est uniquement spatiale (et pas spatio-temporelle) car la prise en compte du facteur temps, dans cette approche, n'est pas nécessaire.

#### ***I-2/ Test d'auto-corrélation spatiale***

L'outil d'auto-corrélation spatiale évalue si la distribution spatiale est concentrée, dispersée, ou aléatoire. L'outil « Global Moran's Index » calcule un score z et une valeur de p pour indiquer si on peut ou non rejeter l'hypothèse nulle (distribution aléatoire dans la zone d'étude). Quand le score z et la valeur de p indiquent une significativité statistique, un indice de Moran positif indique la tendance vers une concentration alors qu'un indice négatif indique une tendance vers la dispersion. L'indice de Moran varie de -1 à +1 avec une valeur nulle pour une distribution aléatoire (Figure 38).



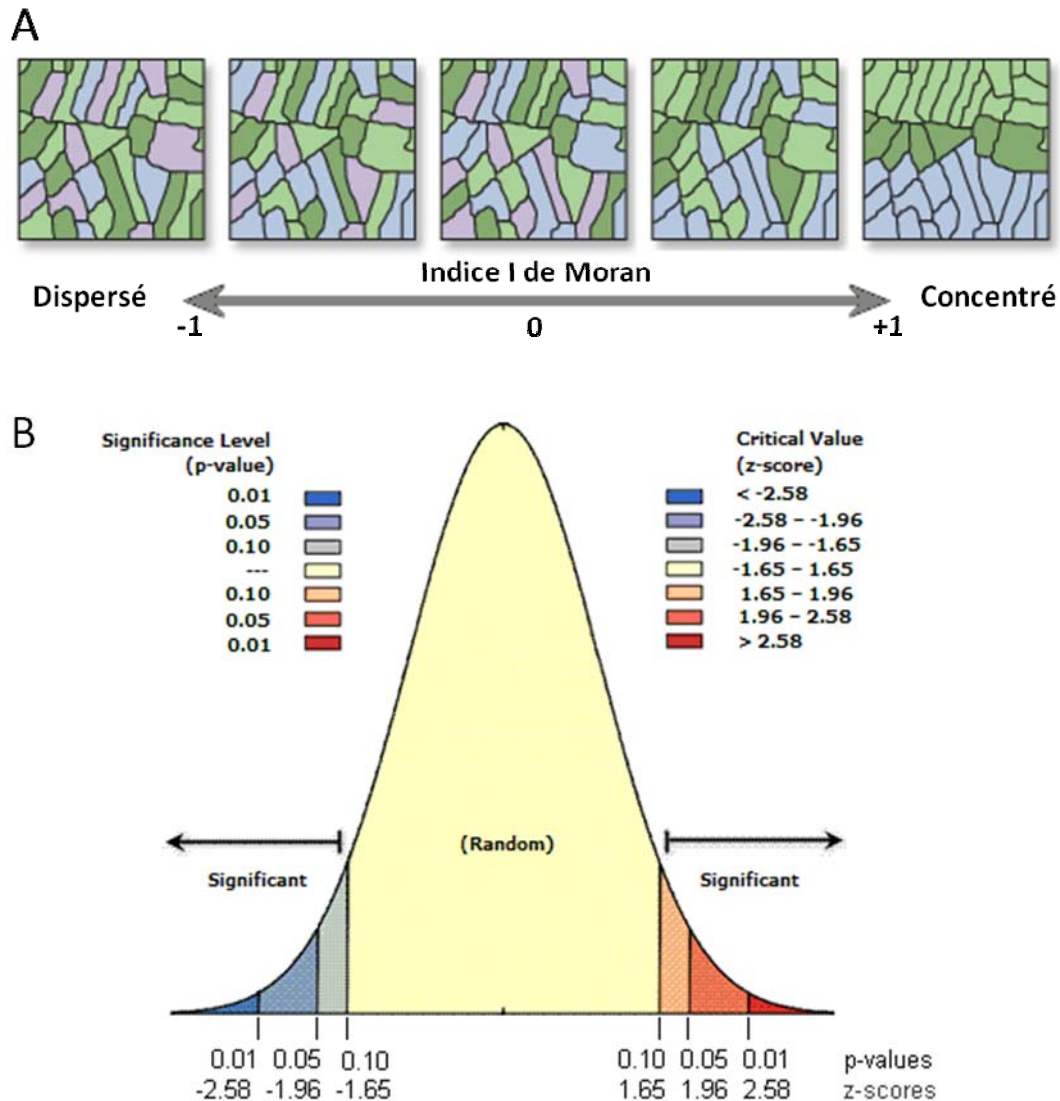


Figure 38 : Schéma expliquant le test géographique d'auto-corrélation

Source : ArcGIS desktop Help [209]

### ***1-3/ Indice de diversité***

Le calcul de l'indice de diversité à été réalisé avec le package ade4 de R (fonction *divc*) développé par le laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (UMR 5558) de l'Université Lyon 1 [210,211].

Il s'agit de l'indice de Rao qui prend en compte l'abondance et la distance biologique (ou conceptuelle) des loci étudiés. La distance biologique est déterminée par un poids attribué de manière à illustrer les différences entre diversité allélique, famille allélique et gène. Ici, nous avons attribué :

- un poids de 1 : entre les tailles des différents allèles,
- un poids de 2 : entre les familles alléliques de *msp2* : 3D7 et FC27,
- un poids de 3 : entre les gènes *msp2* et *glurp*.

L'indice de diversité a été calculé pour chacune des zones de concentration de cas fébriles déterminées par Charlotte (Figure 22), soit :

- zone 1 : zone principale de « hot spot » en rouge sur la carte (forte concentration de nombre de cas cliniques),
- zone 2 : zone secondaire de « hot spot » en rouge sur la carte (forte concentration de cas cliniques de paludisme, zone plus petite),
- zone 3 : « cold spot » en vert sur la carte (faible concentration du nombre de cas cliniques de paludisme),
- zone 4 : zone intermédiaire, neutre, en gris sur la carte (pas de concentration particulière du nombre de cas cliniques de paludisme).

## **II / RESULTATS : APPROCHE GEOGRAPHIQUE**

### ***II-1/ Cartographie des polymorphismes les plus fréquents***

Seuls les allèles dont le nombre d'occurrences est supérieur à 10 ont été considérés pour une meilleure visibilité (soit ceux qui sont au dessus du seuil dans la Figure 37). L'indice de Moran a, en revanche, été calculé sur la base de tous les allèles et de toutes les occurrences. La répartition géographique des allèles de chaque locus a été représentée pour chacune des zones 1 à 4 décrites ci-dessus.

Les cartes des Figure 39 Figure 40 Figure 41 représentent donc la répartition géographique des allèles les plus fréquents en utilisant la symbologie suivante : un point de couleur différente pour chaque allèle et une taille de point correspondant au nombre d'occurrences. Ainsi, si on prend l'exemple de la carte de *msp2-3D7* (Figure 39), on voit que l'allèle 368 désigné en jaune clair n'est présent que dans la zone 1 (grande zone de « hot spot » en rouge) et ce avec un nombre d'occurrences important. En revanche, on voit que l'allèle 500 représenté en rose fushia est majoritairement présent dans les zones de « hot spot » (zones 1 et 2) et faiblement présent dans les zones de « cold spot » et neutre.

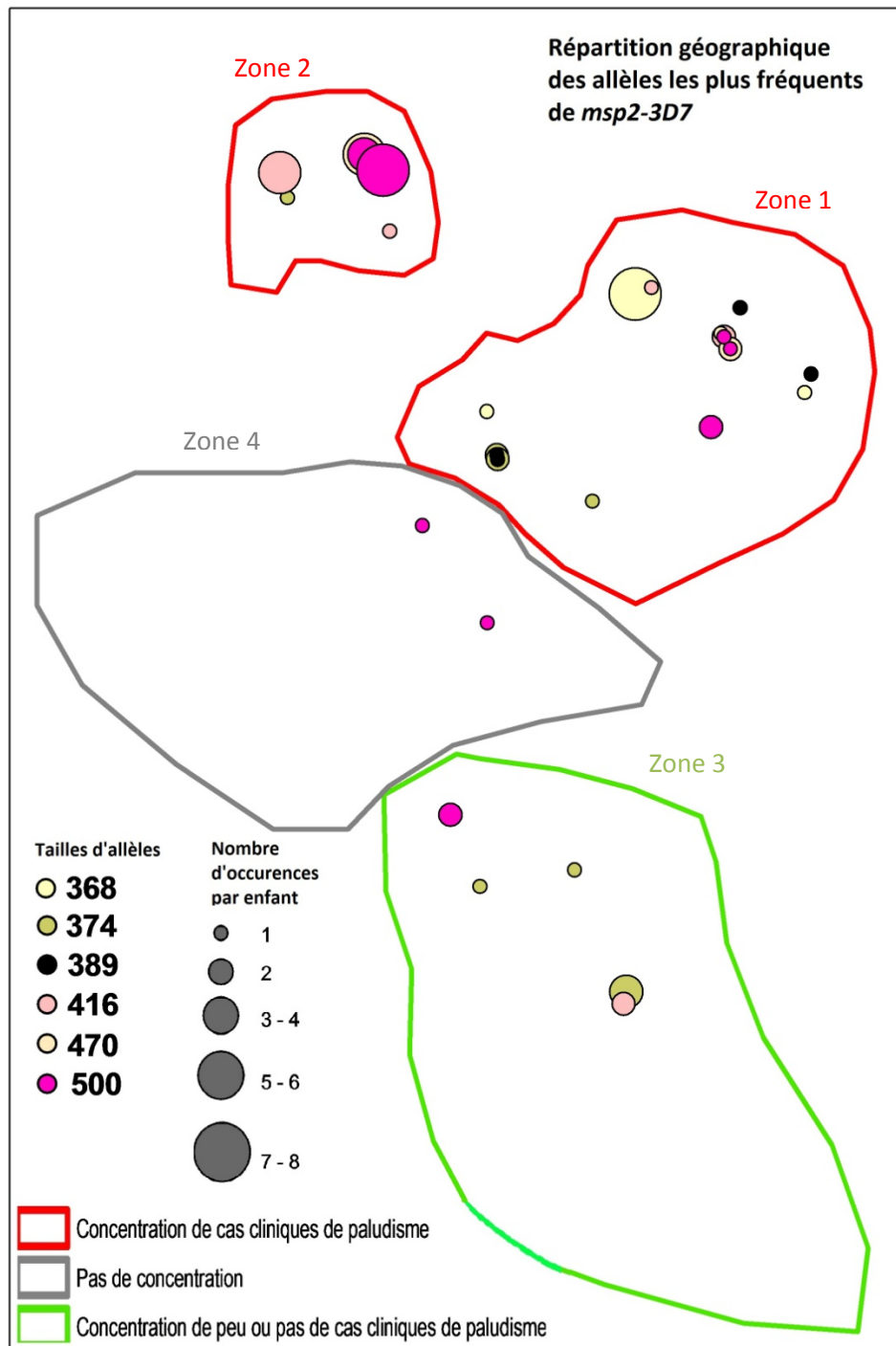


Figure 39: Carte des allèles de *msp2-3D7* les plus fréquents

Réalisée par C. Pierrat

Pour *msp2-3D7* (Figure 39), l'indice de Moran est égal à 0,2 avec un score z à 7,96 ( $p < 0.01$ ), ce qui permet de conclure à une concentration d'allèles de *msp2-3D7* dans la zone d'étude. La carte associée à l'analyse statistique suggère une concentration d'allèles importante dans la zone de « hot spot ». Une diversité plus importante est retrouvée dans la zone 1, ce qui suggère qu'une plus grande diversité d'allèles est associée à un plus grand nombre de cas fébriles de paludisme.

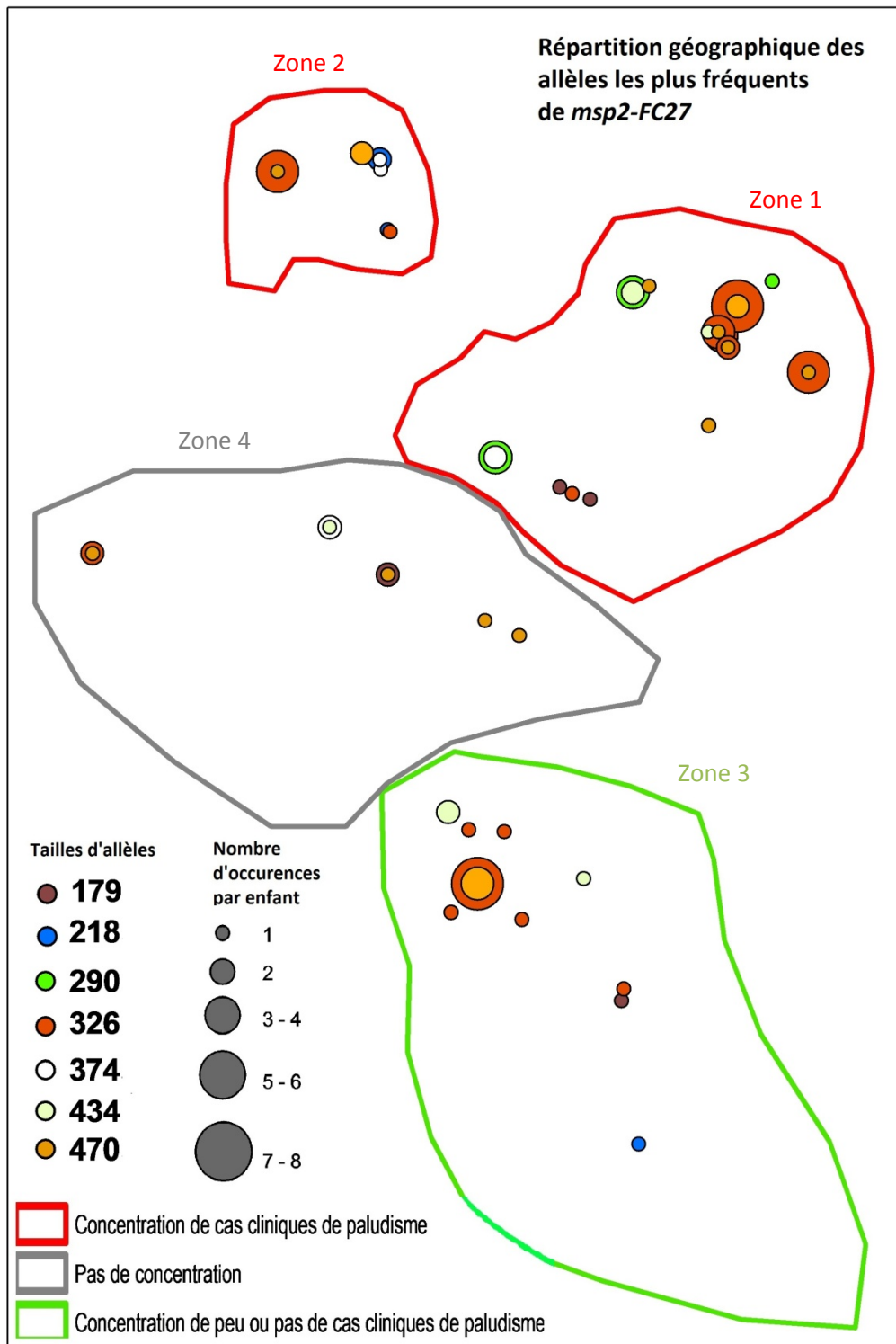


Figure 40: Carte des allèles de *msp2-FC27* les plus fréquents

Réalisée par C. Pierrat

Pour *msp2-FC27* (Figure 40), l'indice de Moran est égal à -0.09 avec un score z à -1.54, ce qui ne permet pas de conclure sur une éventuelle concentration ou dispersion d'allèles.

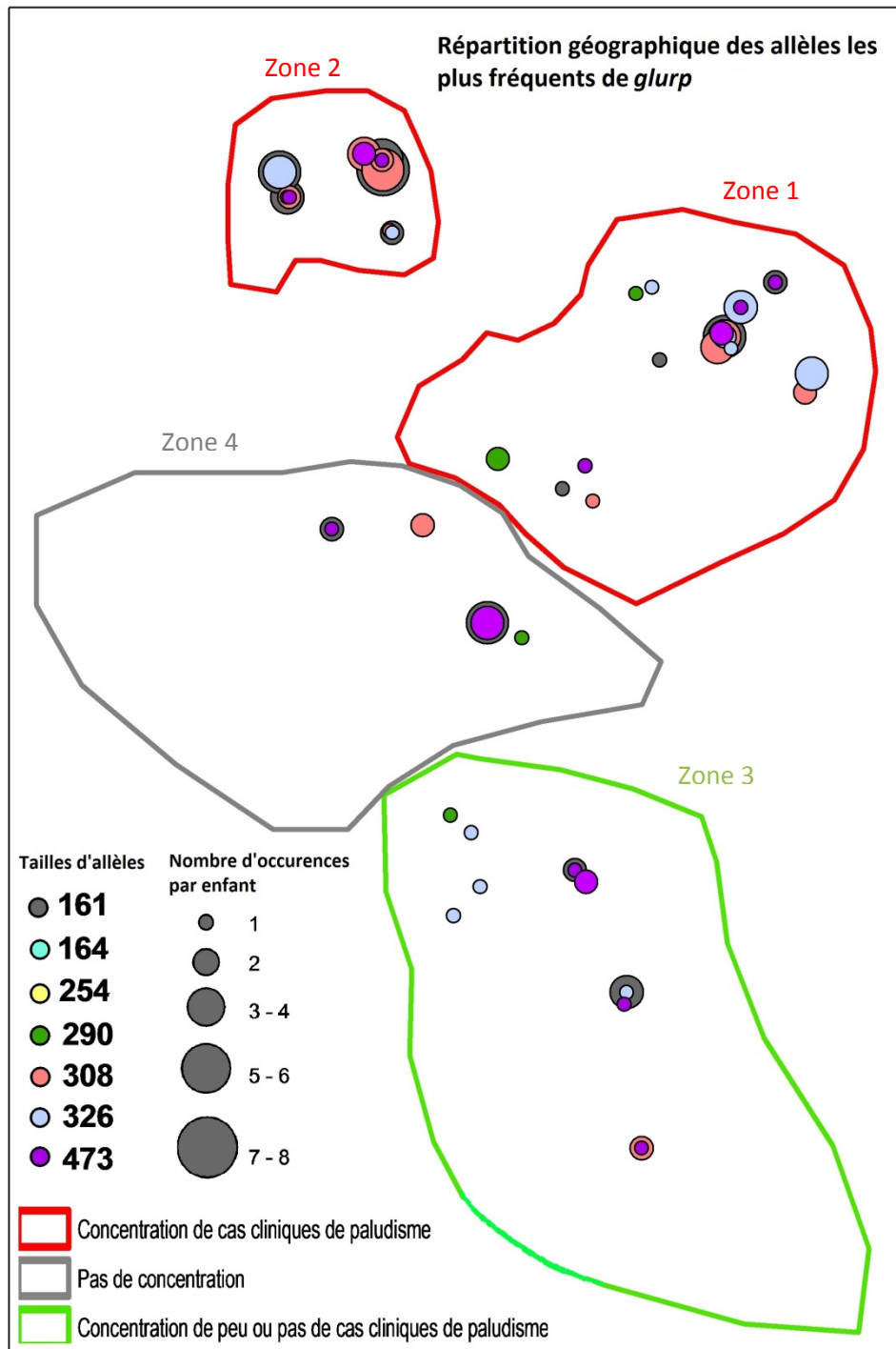


Figure 41: Carte des allèles de *glurp* les plus fréquents

Réalisée par C. Pierrat

Enfin, pour *glurp* (Figure 41) l'indice de Moran est nul avec une valeur de  $p=0.05$  indicative d'une distribution géographique aléatoire dans la zone d'étude.

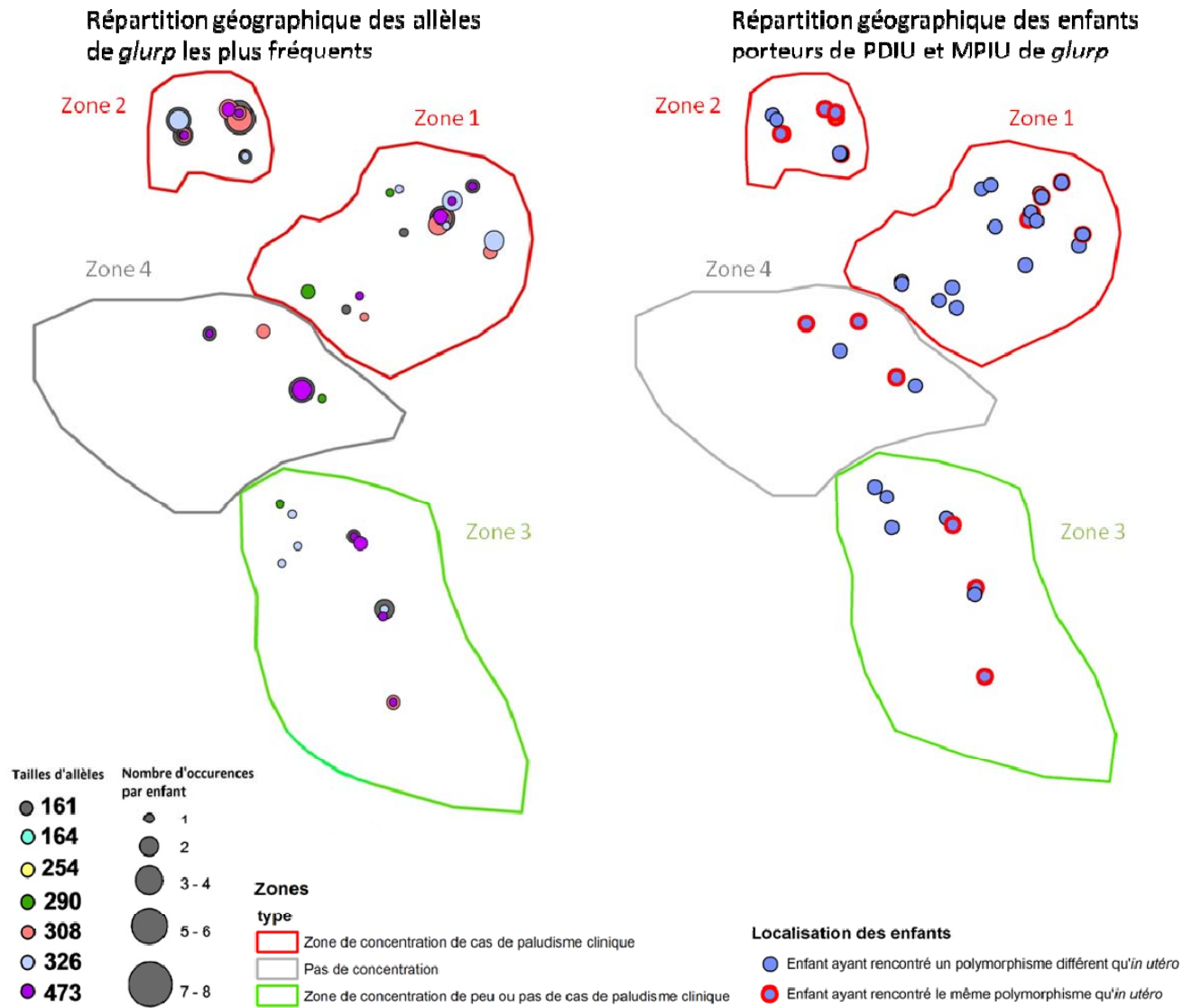
Ces résultats ont permis de définir la répartition géographique de chacun des antigènes dans la zone d'étude. La répartition des allèles de *msp2-3D7* n'est due au hasard ; celle de *msp2-FC27* ne permet

pas de conclure et celle de *glurp* est liée au hasard. L'étude va donc se poursuivre uniquement sur ce dernier antigène.

### ***II-2/ Permissivité des enfants aux infections***

La Figure 42 permet de comparer le nombre d'infections (sans distinction de symptomatologie) en fonction des enfants ayant été infectés ou non par un clone parasitaire porteur d'un polymorphisme génétique déjà rencontré *in utero*. La comparaison des 2 cartes permet de mettre en évidence que les enfants étant infectés par un clone portant le même polymorphisme qu'*in utero* font plus d'infections, conformément aux résultats décrits page 143. Par exemple, au nord-est de la zone 1, le nombre d'occurrences est concentré (dans la carte de gauche) là où sont situés les enfants ayant été infectés par le clone porteur du même polymorphisme qu'*in utero* (points cerclés en rouge sur la carte de droite).

Ces résultats ont été complétés par l'analyse statistique du nombre moyen d'infections par allèle (même allèle qu'*in utero* versus allèles différents) parmi les enfants MPIU pour *glurp*. Le test de Wilcoxon (non paramétrique sur données appariées) effectué sur 17 enfants montre que les enfants font en moyenne 1,90 infection avec l'allèle retrouvé dans le placenta contre 1,18 infection avec les autres allèles. Cette différence est significative avec une valeur de p à 0.0041.



Réalisée par C. Pierrat

Figure 42 : Cartes mettant en parallèle le nombre d'occurrences allélique de *glurp* par enfant et la localisation des enfants infectés par le même polymorphisme de *glurp* qu'*in utero*

### III/ Conclusion

L'hypothèse développée dans ce travail proposait que la tolérance immunitaire est un phénomène qui ne pourrait être induit que par les antigènes porteurs des mêmes polymorphismes que ceux rencontrés *in utero*, ceux-ci étant les seuls à pouvoir être en contact avec le fœtus. En caractérisant les polymorphismes des antigènes des parasites infectant la mère à l'accouchement et ceux dont l'enfant a fait l'expérience lors de ses premières infections, et en mettant en parallèle les données cliniques de l'enfant, il aurait été possible d'avancer que la rencontre avec des antigènes parasitaires solubles est responsable du phénomène de tolérance immunitaire. Dans ce travail, les résultats obtenus par l'approche biologique ne permettent pas de valider ou de réfuter l'hypothèse de travail. Une autre approche était de vérifier si les enfants sont plus permissifs aux infections caractérisées par le polymorphisme retrouvé *in utero* et ainsi valider (ou non) l'hypothèse de travail. Au préalable, la répartition géographique aléatoire des allèles de chacun des gènes a été vérifiée afin de pouvoir, par la suite, distinguer le fait d'être plus exposé ou d'être plus sensible à une infection avec un clone porteur du MPIU. La cartographie des allèles de *mSP2-3D7* associées à l'analyse statistique montre une concentration importante d'allèle dans la zone de « hot spot ». Pour *glurp*, seul gène dont les allèles sont distribués aléatoirement dans la zone d'étude, il a été montré que les enfants font en moyenne plus d'infection avec l'allèle retrouvé dans le placenta.

L'étude porte sur des jeunes enfants n'ayant *a priori* pas d'immunité clinique. Par conséquent, le fait de retrouver davantage d'infections fébriles dans la zone où les allèles de *mSP2-3D7* sont les plus diversifiés s'explique logiquement. Cependant, ce résultat doit être traité avec prudence car les « hot spots » ont été obtenus à partir des données recueillies auprès de 620 nouveau-nés alors que la répartition géographique des allèles de *mSP2-3D7* n'a été calculée qu'à partir de 46 enfants. La comparabilité de ces 2 approches est donc critiquable. Il aurait fallu, pour être rigoureux, réaliser une carte de « hot spots » exclusivement pour ces 46 enfants, mais un tel effectif aurait été trop faible pour obtenir des résultats concluants.

L'approche géographique montre une répartition aléatoire des allèles de *glurp*. Il a également été montré que les enfants font davantage d'infections lorsque celles-ci sont caractérisées par le même allèle de *glurp* que celui rencontré *in utero*. En conclusion, ce travail suggère que les enfants sont plus tolérants aux infections caractérisées par le même polymorphisme qu'*in utero*, indépendamment de l'exposition aux différents allèles, et valide ainsi l'hypothèse initiale de travail. Cependant, ce dernier résultat a été obtenu à partir de l'analyse de 17 enfants. De plus, dans



l'approche biologique, les comparaisons entre réponses cliniques et polymorphisme infectant n'ont pas permis de conclure sur l'hypothèse de travail. Ces comparaisons ont également été menées sur un effectif assez faible. Il semblerait que cette étude nécessite d'être reconfirmée par une étude plus large, prenant en compte un plus grand nombre de couples mère/enfant. Pour rappel, le programme a recruté l'effectif déjà conséquent de 600 couples mère/enfant, dont 60 mères (10%) étaient infectées à l'accouchement. Une autre possibilité aurait été d'inclure un groupe témoin constitué de couples mère non infectée à l'accouchement/enfant. L'effectif s'en trouverait augmenté et la puissance des tests renforcée. Enfin une répartition géographique aléatoire ne protège sans doute pas contre l'introduction d'un biais dans l'étude qui serait que la majeure partie des polymorphismes génétiques des parasites infectants la mère puis l'enfant sont représentés par les 2 allèles les plus fréquents de *glurp*. Ainsi, une analyse qui prendrait en considération l'abondance et la diversité de chaque allèle serait sans doute plus adaptée à la problématique.

Deux critiques globales peuvent être émises. En effet, les mesures cliniques et biologiques sont réalisées à un instant précis du suivi. Or ces mesures peuvent sans doute varier dans le temps selon le déroulement de l'infection. De plus, une infection à *P. falciparum* est souvent multi-clonale. La comparaison de la réponse clinique due à plusieurs clones possédant chacun une multitude d'antigènes pour étudier l'effet d'un seul polymorphisme antigénique n'est pas évidente. Ces 2 remarques expliquent en partie pourquoi il est nécessaire d'être prudent quant à l'analyse des résultats obtenus et pourquoi la comparaison des polymorphismes caractérisant les infections avec les données cliniques n'est pas facilement réalisable. Des mesures cliniques et biologiques correspondant à la réponse propre de l'allèle auraient été idéales. Les mesures s'en rapprochant le plus sont les dosages anticorps réalisés contre les protéines recombinantes MSP2-3D7, MSP2-FC27 et GLURP R2. Cependant, ces mesures sont trimestrielles, alors que les infections ont été détectées à un rythme beaucoup plus précis. En conséquence, la comparaison des polymorphismes portés par les parasites et la réponse anticorps pour valider notre hypothèse n'est pas réalisable dans cette étude.

Cette étude a été conçue pour explorer de nouvelles pistes relatives à la tolérance immunitaire face au paludisme du jeune enfant né de mère porteuse de parasites placentaires à l'accouchement. Dans une étude future, la prise en considération des différentes difficultés face à l'étude précise de l'effet de l'infection placentaire par un polymorphisme antigénique parasitaire défini sur la réponse clinique de l'enfant est essentielle. Une suggestion pour pallier aux problèmes cités serait de focaliser cette étude sur le clone majoritaire, souvent responsable des signes cliniques de l'infection. Cette approche permettrait de mieux concilier polymorphisme des antigènes parasitaires et signes cliniques.

# DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour objectif principal d'étudier la construction de la réponse immunitaire humorale dirigée contre 7 antigènes de *P. falciparum* durant les 18 premiers mois de vie. Afin d'avoir une vision plus précise de la réponse anticorps élaborée par l'enfant, y compris lors des tout premiers mois de vie, ce travail a porté sur la mise au point d'une méthode permettant de distinguer et quantifier les anticorps maternels et néonataux. Enfin, pour mieux renseigner l'approche anticorps dans un contexte d'infection placentaire, il était essentiel de s'assurer si la plus grande sensibilité à l'infection palustre des nourrissons nés de mères infectées par *P. falciparum* n'était pas due à la rencontre avec des antigènes portés par les parasites infectant la mère à l'accouchement.

La démonstration de la distinction entre les anticorps maternels et néo-synthétisés n'est pas encore totalement aboutie. La méthode mise en place est capable de détecter les peptides d'intérêt et de les distinguer au sein d'un même échantillon. Cependant, les résultats obtenus pour le couple mère/enfant retenu dans cette démonstration ne sont pas encore concluants. Une notion qui n'avait pas été considérée au début de cette étude est que, même si les gènes codant pour les allotypes sont codominants, il n'en reste pas moins que leur expression ne se fait pas nécessairement en proportions équivalentes. Ceci est une nouvelle notion, car jusqu'alors, aucune technique habituellement utilisée pour caractériser les allotypes ne pouvait faire la distinction de la quantité de chacune des isoformes d'IgG3 exprimées chez un individu hétérozygote. Néanmoins, cette notion pourrait être à l'origine de difficultés quant à la faisabilité (tout au moins dans le cadre d'un diagnostic) de la méthode. Nous avons vu que la mère n'exprimait que très peu l'un des 2 peptides d'intérêt alors que les 2 individus hétérozygotes exprimaient ce même peptide en plus grande quantité. L'expression des isoformes semblerait donc varier en fonction de l'individu. L'analyse d'autres échantillons permettra de mieux comprendre ces différences d'expression et d'assurer la faisabilité de la méthode proposée ainsi que son applicabilité en tant qu'outil de diagnostic.

Cette méthode permet de distinguer les isoformes d'IgG3 en se basant sur les allotypes qui sont des déterminants antigéniques. Mais au regard des possibilités offertes par la spectrométrie de masse, l'allotypie n'est pas une solution exclusive et la caractérisation des isoformes d'IgG3 par l'ensemble de leur polymorphisme d'acides aminés (incluant les séquences ne faisant pas nécessairement intervenir l'immunogénicité) est envisageable. Cette approche augmenterait le potentiel de faisabilité de la méthode.

Un des objectifs de ce travail était de caractériser les polymorphismes des antigènes portés par des parasites ayant infecté le placenta des mères (détection à l'accouchement) ou l'enfant au cours de son suivi. Ce travail a été mis en place pour devancer une critique qui aurait pu être énoncée sur l'étude de l'effet de l'infection placentaire sur l'acquisition de la réponse anticorps. En effet, dans

cette étude, la réponse anticorps spécifique d'antigènes parasitaires est mesurée contre une protéine recombinante représentant un polymorphisme d'un antigène précis. Les réponses anticorps des enfants issus de mères infectées ou non à *P. falciparum* à l'accouchement sont comparées afin de mettre en évidence l'effet de l'infection palustre placentaire sur ces réponses et ainsi de mieux comprendre le phénomène de tolérance immunitaire. Or, il semblerait que les polymorphismes des antigènes étudiés soient tels que la réponse anticorps mesurée ne couvre pas l'ensemble des réponses naturelles contre cet antigène. La mise en relation de l'infection palustre placentaire et avec une diminution plausible de la réponse anticorps des enfants n'est donc pas évidente à établir avec des mesures non exhaustives. La comparaison des polymorphismes génétiques des parasites infectant les mères à l'accouchement et leurs enfants au cours du suivi, associée à l'étude de la susceptibilité des enfants aux infections, peut expliquer (en partie) le phénomène de tolérance observé chez les enfants en cas d'infection palustre placentaire et pallier à cette remarque. Dans ce travail de thèse, il a été montré que les polymorphismes portés par l'antigène parasitaire GLURP pouvaient être associés à un plus grand nombre d'infections chez l'enfant qui avait également rencontré ce polymorphisme *in utero*, alors qu'il n'a pas été retrouvé d'effet de l'infection placentaire sur la réponse anticorps spécifique. Néanmoins, comme il l'a été explicitement proposé dans la discussion de la partie III, un élargissement de cette étude à un groupe témoin constitué de mères non infectées à l'accouchement et de leurs enfants, serait un atout supplémentaire pour confirmer les observations faites à l'issue de cette première analyse.

L'apport de la géographie de la santé dans ce travail a représenté un plus pour la compréhension de la répartition des antigènes et de leur polymorphisme dans la zone d'étude. Ce travail mériterait d'être plus approfondi en ce qui concerne l'étude des zones de « hot spot » et la diversité allélique. En effet, dans la littérature, il est décrit qu'il est nécessaire d'être infecté de nombreuses fois et par des antigènes variés pour acquérir une immunité clinique. Selon ce postulat, dans une étude spatio-temporelle de la diversité allélique, on devrait retrouver une plus grande diversité de polymorphismes génétiques parasitaires dans une zone de « hot spot » où sont concentrés les enfants les plus jeunes. Au fur et à mesure que les enfants grandissent, la zone de « hot spot » devrait se dissiper et la diversité allélique se réduire. Il est également plausible que la zone de « hot spot » et la diversité allélique se déplacent vers une autre zone de prédominance d'enfants jeunes. Cette hypothèse devrait être vérifiée par une étude suivant des enfants pendant plusieurs années qui permettrait de modéliser les déplacements spatio-temporels des zones de concentration de cas de paludisme et de la diversité allélique. L'approfondissement des connaissances sur l'évolution spatio-temporelle des polymorphismes génétiques des parasites infectant permettrait de mieux caractériser les infections palustres. Ces informations sont essentielles pour comprendre les facteurs de

vulnérabilité des enfants au cours de leurs premières années de vie et les mécanismes d'acquisition d'une immunité clinique afin, à terme, de proposer des approches adaptées pour stimuler au mieux les défenses immunitaires des enfants.

L'étude de l'acquisition de la réponse anticorps spécifique d'antigènes parasitaires sur les 18 premiers mois de vie n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'infection placentaire. Il a été proposé de recentrer l'étude sur la première année de vie. En effet, cette proposition concorde avec l'étude de Bonner et *al.*, qui ont montré que l'infection palustre placentaire diminuait le taux d'anticorps spécifiques d'épitopes parasitaires des enfants pendant leur première année de vie et que cet effet s'accroissait après le premier mois [158].

Dans une autre étude, les auteurs ont suivi des enfants vivant dans un pays endémique pendant 2 ans. Ils ont constitué plusieurs groupes afin de tester l'effet d'une prise de prophylaxie pendant la première année de vie sur un retard éventuel de la mise en place de l'immunité acquise naturelle et n'ont trouvé aucune différence. Les auteurs n'ont pas fait de distinction concernant l'infection placentaire, mais prouvent néanmoins que la première année de vie n'est pas déterminante pour la protection des enfants durant leur deuxième année [212]. Si notre étude complémentaire confirme que seule la première année de vie est une phase de tolérance immunitaire pour les enfants nés de mères infectées à *P. falciparum* à l'accouchement, alors il a d'ores et déjà été montré que ce phénomène n'altérerait pas la réponse anticorps sur 18 mois. Néanmoins, l'analyse doit se poursuivre pour confirmer si le nombre d'infections palustres pendant la deuxième année de vie de ces enfants n'est pas augmenté.

Une autre définition du groupe d'enfants dits « tolérants » a été proposée par une autre équipe. Dent et *al.*, et Malhotra et *al.*, ont distingué ces enfants en 2 groupes : les enfants « exposés », dont un des échantillons récoltés à la naissance (sang périphérique maternel, sang de cordon ou dans le placenta) est retrouvé infecté et les enfants « sensibilisés » pour lesquels un des échantillons récoltés à la naissance est infecté et dont les lymphocytes T sécrètent de l'INF $\gamma$  après stimulation par un peptide de MSP1. Les auteurs montrent que les enfants exposés sont les plus susceptibles de développer une infection palustre [169,177]. Il aurait pu être intéressant de confirmer (ou non) ce phénotype avec les données de ce programme et ceci aurait pu conduire à une meilleure compréhension du phénomène de tolérance immunitaire.

Une dernière remarque concernant le programme mené à Tori Bossito, est qu'il aurait également été intéressant de voir l'effet du moment de l'infection pendant la grossesse sur le phénomène de tolérance immunitaire observé. En effet, il a été montré que le moment de l'infection pendant la

grossesse pouvait avoir une incidence sur le poids de naissance de l'enfant et que selon le trimestre au cours duquel l'infection a lieu, l'incidence varie [213,214]. Un autre programme est mené dans l'unité, dans lequel cette suggestion sera étudiée sur le plan de l'immunité cellulaire.

Dans ce travail, nous avons conclu que les enfants de moins de 18 mois commençaient à mettre en place les processus de maturation et de mémoire du système immunitaire. Néanmoins, une étude suivant des enfants plus longtemps aurait permis d'avoir le recul nécessaire pour s'assurer de ces conclusions. De plus, il a été observé (de manière descriptive) que les taux d'anticorps étaient produits en réponse à une infection, mais que ces anticorps ne semblaient pas protecteurs. On peut supposer qu'une étude plus longue aurait sans doute permis de voir la tendance s'inverser quant à la protection des enfants.

L'étude de l'acquisition de la réponse anticorps a permis de mettre en évidence que les antigènes les plus immunogènes et prometteurs sont AMA1 et MSP1. Ces antigènes ont des fonctions essentielles pour l'invasion du mérozoïte dans le globule rouge et ces protéines ont une structure rigide grâce aux nombreux ponts disulfures qui les constituent (décrit page 19 et page 26). Or, il s'avère qu'AMA1 est extrêmement polymorphe, notamment près du site de fixation impliqué dans le phénomène d'invasion. Concernant MSP1, Patiño *et al.*, ont identifié des « anticorps bloquants » qui peuvent interagir avec les anticorps inhibant la seconde maturation protéolytique, permettant ainsi le clivage de MSP1<sub>42</sub> et l'invasion dans le globule rouge [215]. Les anticorps bloquants, également identifiés dans les sera humain, se lient non seulement à MSP1<sub>19</sub> mais aussi à d'autres régions de MSP1 comme des domaines conservés de MSP1<sub>83</sub>. L'induction de ces anticorps bloquants pourrait représenter un nouveau mécanisme d'échappement immunitaire [216]. En outre, MSP2 est une protéine qualifiée de Protéine Intrinsèque Non-structurée. Un panel de différentes techniques a confirmé que MSP2 possède de nombreuses conformations en solution [217,218]. Ce type de protéines est abondant chez les parasites apicomplexes [219]. En effet, MSP1, GLURP et MSP3 possèdent également des régions potentiellement non-structurées [26].

Il ressort de ces informations que les protéines étudiées sont hypervariables et immunogènes mais ne sont pas génératrices d'une réponse protectrice rapidement. Il est donc essentiel de faire la distinction entre immunogénicité et efficacité des anticorps. In vivo, l'effet des anticorps bloquants dépend de la compétition avec les anticorps inhibiteurs [220]. Dans une étude où la réponse anticorps est mesurée contre des antigènes partiels ou entiers, la réponse englobe les anticorps bloquants et les anticorps inhibiteurs. Ces informations sont essentielles afin de savoir à partir de quel moment, dans la vie d'une personne vivant en zone d'endémie, la balance penche en faveur des anticorps inhibiteurs. Une étude sur la fonctionnalité des anticorps permettrait de mieux

comprendre la progression de l'acquisition d'une réponse anticorps efficace. Néanmoins, cette étude ne pourrait être conduite chez le jeune enfant qu'à partir de 15-18 mois, pour des raisons d'affinité et d'avidité des anticorps qui nécessitent plusieurs stimulations antigéniques pour se développer. Dans le cadre de la mise en place d'un vaccin, et pour « faire mieux que la nature », il serait donc recommandé de restreindre les antigènes d'intérêt à une version modifiée qui induirait exclusivement l'expression d'anticorps inhibiteurs.

# BIBLIOGRAPHIE



1. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, et al. (2010) Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature* 467: 420–5.
2. Miller RL, Ikram S, Armelagos GJ, Walker R, Harer WB, et al. (1994) Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 31–2.
3. Hippocrate, Jouanna J, Magdelaine CT (1999) *L'art de la médecine: serment, ancienne médecine, art, airs, eaux, lieux, maladie sacrée, nature de l'homme, pronostic, aphorismes*. Paris: Garnier-Flammarion. Disponible: <http://www.sudoc.fr/048065919>. Consulté 21 mars 2012.
4. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, et al. (2004) Biodiversité du paludisme dans le monde. Montrouge J. Libbey Eurotext. p. 3-57.
5. Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales (s. d.) <http://www.cnrtl.fr>. p. Portail lexical/Etymologie.
6. Centers for disease, control and prevention (s. d.) Laveran and the Discovery of the Malaria Parasite. <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html>
7. Centers for disease, control and prevention (s. d.) Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites. <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>
8. The official web site of the Nobel Prize (s. d.) Biography of Ronald Ross. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1902/ross.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902/ross.html)
9. Capanna E (2006) Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? *Int Microbiol* 9: 69–74.
10. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327–36.
11. World Malaria Report 2011 (s. d.) WHO. Disponible: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/). Consulté 21 mars 2012.
12. Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, et al. (2012) Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379: 413–431.
13. Roll Back Malaria (2008) Données, chiffres et stratégies clés: Plan d'action mondial contre le paludisme.
14. Rogier C, Orlandi-Pradines E, Fusaï T, Pradines B, Briolant S, et al. (2006) [Malaria vaccines: prospects and reality]. *Med Mal Infect* 36: 414–422.
15. Metselaar D, Van Thiel PH (1959) Classification of malaria. *Trop Geogr Med* 11: 157–161.
16. Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, et al. (2009) A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Med* 6: e1000048.

17. Gething PW, Smith DL, Patil AP, Tatem AJ, Snow RW, et al. (2010) Climate change and the global malaria recession. *Nature* 465: 342–5.
18. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, et al. (2011) A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria Journal* 10: 378.
19. ANOFEL (2007) Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Masson. Chapitre Paludisme.
20. Cottrell G, Kouwaye B, Pierrat C, le Port A, Bouraïma A, et al. (2012) Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in benin and its implications for cohort study. *PLoS ONE* 7: e28812.
21. Djènontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, et al. (2010) Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* 3: 83.
22. Danis M, Mouchet J (1991) Paludisme. Ellipses. 240 p.
23. Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, et al. (2000) Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol. Microbiol.* 38: 706–718.
24. Narum DL, Thomas AW (1994) Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 59–68.
25. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, Chan J-A, Foley M, et al. (2010) Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J. Biol. Chem.* 285: 14815–14822.
26. Anders RF, Adda CG, Foley M, Norton RS (2010) Recombinant protein vaccines against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Hum Vaccin* 6: 39–53.
27. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CHM, Thomas AW (2008) Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol.* 24: 74–84.
28. Duraisingh MT, DeSimone T, Jennings C, Refour P, Wu C (2008) Erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*: multiple ligand-receptor interactions and phenotypic switching. *Subcell Biochem* 47: 46–57.
29. Richards JS, Beeson JG (2009) The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol* 87: 377–90.
30. Healthcare M (s. d.) Life cycle of Plasmodium falciparum. [http://www.mcwhealthcare.com/malaria\\_drugs\\_medicines/life\\_cycle\\_of\\_plasmodium.htm](http://www.mcwhealthcare.com/malaria_drugs_medicines/life_cycle_of_plasmodium.htm)
31. Baker DA (2010) Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 172: 57–65.

32. Fried M, Duffy PE (1996) Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272: 1502–1504.
33. Rug M, Prescott SW, Fernandez KM, Cooke BM, Cowman AF (2006) The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* 108: 370–378.
34. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, et al. (2010) On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J. Infect. Dis* 202: 638–647.
35. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, et al. (2010) Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18640–18645.
36. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su X, et al. (2010) Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 1872–1877.
37. Zuckerman JN (2001) Principles and practice of travel medicine. 503 p.
38. Warrell DA, Gilles HM (2001) Essential malariology. Arnold. 348 p.
39. Organisation Mondiale de la Santé (2011) Directives pour le traitement du paludisme - 2<sup>e</sup> édition. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789242547924\\_fre.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789242547924_fre.pdf)
40. Gamain B, Gratepanche S, Miller LH, Baruch DI (2002) Molecular basis for the dichotomy in *Plasmodium falciparum* adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10020–4.
41. Fried M, Duffy PE (1998) Maternal malaria and parasite adhesion. *J. Mol. Med.* 76: 162–171.
42. World Health Organization. Regional Office for Africa (2004) A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control During Pregnancy in the African Region. [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/afr\\_mal\\_04\\_01/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/afr_mal_04_01/en/index.html)
43. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ (1990) Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet* 336: 1039–1043.
44. Hansen AM, Chaudhri G, Hunt NH (1999) Role of immune mediators in the pathology of experimental murine cerebral malaria. *Redox Rep.* 4: 321–322.
45. Kobbe R, Neuhoff R, Marks F, Adjei S, Langefeld I, et al. (2006) Seasonal variation and high multiplicity of first *Plasmodium falciparum* infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Trop Med Int Health* 11: 613–9.
46. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, et al. (2010) A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 6958–6963.

47. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, et al. (2010) The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. PLoS Pathog. 6: e1000912. 2
48. Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, Naing C-M, Jackson SM, et al. (2011) Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. Cochrane Database Syst Rev: CD008122.
49. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, et al. (1992) Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. Nature 357: 689–92.
50. Gatton ML, Peters JM, Fowler EV, Cheng Q (2003) Switching rates of *Plasmodium falciparum* var genes: faster than we thought? Trends Parasitol 19: 202–8.
51. Miller LH, Good MF, Milon G (1994) Malaria pathogenesis. Science 264: 1878–1883.
52. Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, et al. (2002) A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. J. Infect. Dis. 185: 820–827.
53. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH (2010) Advances and challenges in malaria vaccine development. J. Clin. Invest. 120: 4168–4178.
54. Genton B, Reed ZH (2007) Asexual blood-stage malaria vaccine development: facing the challenges. Curr Opin Infect Dis 20: 467–75.
55. Good MF, Doolan DL (2010) Malaria vaccine design: immunological considerations. Immunity 33: 555–566.
56. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJF, et al. (2009) Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. N. Engl. J. Med. 361: 468–477.
57. Hoffman SL, Billingsley PF, James E, Richman A, Loyevsky M, et al. (2010) Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. Hum Vaccin 6: 97–106.
58. The RTS,S Clinical Trials Partnership (2011) First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. N. Engl. J. Med. 365:1863-1875
59. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, et al. (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 364: 1411–1420.
60. Snounou G, Grüner AC, Müller-Graf CDM, Mazier D, Rénia L (2005) The Plasmodium sporozoite survives RTS,S vaccination. Trends Parasitol. 21: 456–461. 2
61. COHEN S, MCGREGOR IA, CARRINGTON S (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 192: 733–737.

62. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, et al. (1991) Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 297–308.
63. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, et al. (1998) Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 4: 358–60.
64. Gray JC, Corran PH, Mangia E, Gaunt MW, Li Q, et al. (2007) Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. *Clin Chem* 53: 1244–53.
65. Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, et al. (2011) Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 13275–13280.
66. Mitchell GH, Butcher GA, Voller A, Cohen S (1976) The effect of human immune IgG on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 72: 149–162.
67. Wilson RJ, Phillips RS (1976) Method to test inhibitory antibodies in human sera to wild populations of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 263: 132–134.
68. Khusmith S, Druilhe P (1983) Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit in vitro proliferation of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 41: 219–223.
69. Holder AA (1988) The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy* 41: 72–97.
70. McBride JS, Heidrich H-G (1987) Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Molecular and Biochemical Parasitology* 23: 71–84.
71. Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA (1994) Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J. Exp. Med.* 180: 389–393.
72. Bentley GA (2006) Functional and immunological insights from the three-dimensional structures of Plasmodium surface proteins. *Curr Opin Microbiol* 9: 395–400.
73. Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, Holder AA (1991) Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 29–33.
74. Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, et al. (1999) Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Journal of Molecular Biology* 289: 113–122.
75. Kauth CW, Woehlbier U, Kern M, Mekonnen Z, Lutz R, et al. (2006) Interactions between Merozoite Surface Proteins 1, 6, and 7 of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 31517–31527.

76. Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, et al. (2009) A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *The EMBO Journal* 28: 725–735.
77. Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, Hui GS, Case SE, et al. (1987) Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 3014–3018.
78. Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, et al. (2000) Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 68: 2215–2223.
79. Ling IT, Ogun SA, Holder AA (1994) Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunol.* 16: 63–67.
80. Singh S, Kennedy MC, Long CA, Saul AJ, Miller LH, et al. (2003) Biochemical and immunological characterization of bacterially expressed and refolded *Plasmodium falciparum* 42-kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 71: 6766–6774.
81. Chang SP, Case SE, Gosnell WL, Hashimoto A, Kramer KJ, et al. (1996) A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. *Infect. Immun.* 64: 253–261.
82. Doodoo D, Theander TG, Kurtzhals JA, Koram K, Riley E, et al. (1999) Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect. Immun.* 67: 2131–2137.
83. Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D, Okoth W, Siangla J, et al. (2009) Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS ONE* 4: e4708.
84. Malkin E, Long CA, Stowers AW, Zou L, Singh S, et al. (2007) Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Clin Trials* 2: e12.
85. Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, 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: 211–219.
86. Egan AF, Chappel JA, Burghaus PA, Morris JS, McBride JS, et al. (1995) Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 63: 456–466.

87. Branch OH, Oloo AJ, Nahlen BL, Kaslow D, Lal AA (2000) Anti-merozoite surface protein-1 19-kDa IgG in mother-infant pairs naturally exposed to *Plasmodium falciparum*: subclass analysis with age, exposure to asexual parasitemia, and protection against malaria. V. The Asembo Bay Cohort Project. *J Infect Dis* 181: 1746–52.
88. Gilson PR, Nebl T, Vukcevic D, Moritz RL, Sargeant T, et al. (2006) Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell Proteomics* 5: 1286–1299.
89. Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwarz RT (1996) Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75: 131–143.
90. Stanley HA, Howard RF, Reese RT (1985) Recognition of a Mr 56K glycoprotein on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites by mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134: 3439–3444.
91. Fenton B, Clark JT, Khan CM, Robinson JV, Walliker D, et al. (1991) Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 963–971.
92. Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, et al. (1991) Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 1751–1755.
93. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, et al. (1990) Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 39: 227–34.
94. Dubbeld MA, Kocken CH, Thomas AW (1998) Merozoite surface protein 2 of *Plasmodium reichenowi* is a unique mosaic of *Plasmodium falciparum* allelic forms and species-specific elements. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92: 187–192.
95. Flück C, Smith T, Beck H-P, Irion A, Betuela I, et al. (2004) Strain-specific humoral response to a polymorphic malaria vaccine. *Infect. Immun.* 72: 6300–6305.
96. Taylor RR, Smith DB, Robinson VJ, McBride JS, Riley EM (1995) Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect. Immun.* 63: 4382–4388.
97. al-Yaman F, Genton B, Anders RF, Falk M, Triglia T, et al. (1994) Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 593–602.

98. Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, et al. (2006) 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* 24: 4233–4246.
99. Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM (1998) IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 406–413.
100. Metzger WG, Okeno DMN, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, et al. (2003) Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol.* 25: 307–312.
101. Rzepczyk CM, Hale K, Woodroffe N, Bobogare A, Csurhes P, et al. (1997) 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.* 65: 1098–1100.
102. Franks S, Baton L, Tetteh K, Tongren E, Dewin D, et al. (2003) Genetic Diversity and Antigenic Polymorphism in *Plasmodium falciparum*: Extensive Serological Cross-Reactivity between Allelic Variants of Merozoite Surface Protein 2. *Infection and Immunity* 71: 3485–3495.
103. McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, et al. (1994) Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68: 53–67.
104. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto L, et al. (1994) A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89 Suppl 2: 77–80.
105. Burgess BR, Schuck P, Garboczi DN (2005) Dissection of Merozoite Surface Protein 3, a Representative of a Family of *Plasmodium falciparum* Surface Proteins, Reveals an Oligomeric and Highly Elongated Molecule. *J. Biol. Chem.* 280: 37236–37245.
106. McColl DJ, Anders RF (1997) Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP3). *Mol. Biochem. Parasitol.* 90: 21–31.
107. Mulhern TD, Howlett GJ, Reid GE, Simpson RJ, McColl DJ, et al. (1995) Solution structure of a polypeptide containing four heptad repeat units from a merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* 34: 3479–3491.
108. Hisaeda H, Saul A, Reece JJ, Kennedy MC, Long CA, et al. (2002) Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *J. Infect. Dis.* 185: 657–664.



109. Carvalho LJM, Oliveira SG, Theisen M, Alves FA, Andrade MCR, et al. (2004) Immunization of Saimiri sciureus monkeys with *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels. *Scand. J. Immunol.* 59: 363–372.
110. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Tiono AB, Konate AT, et al. (2009) Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite Immunol.* 31: 474–480.
111. Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, et al. (2005) Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect. Immun.* 73: 8017–8026.
112. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, et al. (2005) A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.* 2: e344.
113. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye K-S, Druilhe P (2004) Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect. Immun.* 72: 247–252.
114. Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, et al. (1991) Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 119–131.
115. de Stricker K, Vuust J, Jepsen S, Oeuvray C, Theisen M (2000) Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111: 123–130.
116. Carvalho LJM, Alves FA, Bianco C Jr, Oliveira SG, Zanini GM, et al. (2005) Immunization of Saimiri sciureus monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 242–248.
117. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, et al. (1998) The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect. Immun.* 66: 11–17.
118. Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, 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: 2617–2620.

119. Doodoo D, Theisen M, Kurtzhals JA, Akanmori BD, Koram KA, et al. (2000) Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 181: 1202–1205.
120. Theisen M, Doodoo D, Toure-Balde A, Soe S, Corradin G, et al. (2001) Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. *Infect. Immun.* 69: 5223–5229.
121. Hermsen CC, Verhage DF, Telgt DSC, Teelen K, Bousema JT, et al. (2007) Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine* 25: 2930–2940.
122. Howell SA, Withers-Martinez C, Kocken CH, Thomas AW, Blackman MJ (2001) Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J. Biol. Chem.* 276: 31311–31320.
123. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck M-L, Collins CR, Withers-Martinez C, et al. (2005) Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science* 308: 408–411.
124. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, et al. (2009) Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci Transl Med* 1: 2ra5.
125. Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, et al. (2004) Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 52: 159–168.
126. Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, et al. (1988) Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol.* 10: 535–552.
127. Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, et al. (2002) Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 70: 6961–6967.
128. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, et al. (1998) Immunisation with recombinant AMA1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 16: 240–247.
129. Staniscic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, 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: 1165–1174.

130. Dicko A, Diemert DJ, Sagara I, Sogoba M, Niambele MB, et al. (2007) Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 vaccine on antibody responses in adult Malians. PLoS ONE 2: e1045.
131. Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP, et al. (2005) Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. Infect. Immun. 73: 3677–3685.
132. Mullen GED, Ellis RD, Miura K, Malkin E, Nolan C, et al. (2008) Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. PLoS ONE 3: e2940.
133. Kinyanjui SM, Conway DJ, Lanar DE, Marsh K (2007) IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. Malar. J. 6: 82.
134. Parham P (2003) Le système immunitaire. De Boeck Université. p 26, p173-174, p 247.
135. Roopenian DC, Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat. Rev. Immunol. 7: 715–725.
136. Evain-Brion D, Malassiné A (2010) Le placenta humain. Ed. Médicales Internationales. 198 p.
137. Brambell FW (1970) The transmission of passive immunity from mother to Young,. Amsterdam; London: North-Holland publ. 385 p.
138. Lefranc MP, Lefranc G. Chapitre 20 “Les immunoglobulines humaines”. 1992. In: Breton-Gorius J, Reyes F, Rochant H, Rosa J, Vernant JP. L’Hématologie de Bernard Dreyfus. Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, pp 197-254.
139. Oudin J (1956) [The allotype of certain blood protein antigens.]. C R Hebd Seances Acad Sci 242: 2606–8.
140. Lefranc M-P, Lefranc G Human Gm, Km and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. Methods in Molecular Biology. *In press*
141. Coudray C (2006) Histoire génétique et évolution des populations berbérophones nord-africaines Université de Toulouse III.
142. Lefranc MP, Lefranc G (1990) Molecular genetics of immunoglobulin allotype expression. The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Shakib, Farouk. p. 43 – 78.
143. Lefranc MP, Lefranc G, Rabbitts TH (1982) Inherited deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in normal human individuals. Nature 300: 760–2.
144. Jefferis R, Lefranc M-P (2009) Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. MAbs 1: 332–338.

145. Dugoujon JM, Hazout S, Loirat F, Mourrieras B, Crouau-Roy B, et al. (2004) GM haplotype diversity of 82 populations over the world suggests a centrifugal model of human migrations. *Am J Phys Anthropol* 125: 175–92.
146. Dard P, Lefranc MP, Osipova L, Sanchez-Mazas A (2001) DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur J Hum Genet* 9: 765–72.
147. IMGT Home page (s. d.). Disponible: <http://www.imgt.org/>. Consulté 8 nov 2011.
148. Gendrel D, Richard-Lenoble D, Blot P, Fribourg-Blanc A (1988) [Transfer of measles immunoglobulins and antibodies from mother to child in Africa and Europe]. *Presse Med* 17: 1633–6.
149. Hartter HK, Oyedele OI, Dietz K, Kreis S, Hoffman JP, et al. (2000) Placental transfer and decay of maternally acquired antimeasles antibodies in Nigerian children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19: 635–641.
150. Richard-Lenoble D, Kombila M, Niel G, Fribourg-Blanc A, Boumerfeg M, et al. (1988) [Transplacental passage of toxoplasma antibodies. The difference between African and European mothers]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 81: 365–8.
151. Englund JA (2007) The influence of maternal immunization on infant immune responses. *J. Comp. Pathol* 137 Suppl 1: S16–19.
152. de Moraes-Pinto MI, Almeida AC, Kenj G, Filgueiras TE, Tobias W, et al. (1996) Placental transfer and maternally acquired neonatal IgG immunity in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 173: 1077–84.
153. de Moraes-Pinto MI, Verhoeff F, Chimsuku L, Milligan PJ, Wesumperuma L, et al. (1998) Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 79: F202–5.
154. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Hart AC (2001) Materno-foetal transfer of H. influenzae and pneumococcal antibodies is influenced by prematurity and low birth weight: implications for conjugate vaccine trials. *Vaccine* 20: 647–650.
155. Okoko BJ, Wesuperuma LH, Ota MO, Banya WA, Pinder M, et al. (2001) Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural west African population. *J Health Popul Nutr* 19: 59–65.
156. Rasheed FN, Bulmer JN, De Francisco A, Jawla MF, Jakobsen PH, et al. (1995) Relationships between maternal malaria and malarial immune responses in mothers and neonates. *Parasite Immunol* 17: 1–10.
157. Logie DE, McGregor IA, Rowe DS, Billewicz WZ (1973) Plasma immunoglobulin concentrations in mothers and newborn children with special reference to placental malaria: Studies in the Gambia, Nigeria, and Switzerland. *Bull World Health Organ* 49: 547–54.

158. Bonner PC, Zhou Z, Mirel LB, Ayisi JG, Shi YP, et al. (2005) Placental malaria diminishes development of antibody responses to *Plasmodium falciparum* epitopes in infants residing in an area of western Kenya where *P. falciparum* is endemic. Clin. Diagn. Lab. Immunol 12: 375–379.
159. Høgh B, Marbiah NT, Burghaus PA, Andersen PK (1995) Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. Infect. Immun. 63: 4034–4038.
160. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, et al. (1997) Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. Am J Epidemiol 146: 826–31.
161. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, et al. (2005) Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. PLoS Med 2: e407.
162. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Kwiek JJ, Meshnick SR, et al. (2006) Umbilical cord-blood infections with *Plasmodium falciparum* malaria are acquired antenatally in Kenya. J Infect Dis 194: 176–83.
163. Schwarz NG, Adegnika AA, Breitling LP, Gabor J, Agnandji ST, et al. (2008) Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. Clin Infect Dis 47: 1017–25.
164. Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouédraogo S, Dechavanne C, et al. (2011) Infections in Infants during the First 12 Months of Life: Role of Placental Malaria and Environmental Factors. PLoS ONE 6: e27516.
165. Duffy PE (2007) Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. Parasitology 134: 1877–1881.
166. Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, et al. (2003) *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. Clin. Exp. Immunol. 133: 414–421.
167. Fievet N, Varani S, Ibitokou S, Briand V, Louis S, et al. (2009) *Plasmodium falciparum* exposure in utero, maternal age and parity influence the innate activation of foetal antigen presenting cells. Malar J 8: 251.
168. Lutz MB, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. 23: 445–449.
169. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, et al. (2009) Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. PLoS Med 6: e1000116.

170. Jakobsen PH, Rasheed FN, Bulmer JN, Theisen M, Ridley RG, et al. (1998) Inflammatory reactions in placental blood of *Plasmodium falciparum*-infected women and high concentrations of soluble E-selectin and a circulating *P. falciparum* protein in the cord sera. *Immunology* 93: 264–269.
171. Redd SC, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG, Heymann DL (1996) Transplacental transmission of *Plasmodium falciparum* in rural Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 57–60.
172. Desowitz RS, Elm J, Alpers MP (1993) *Plasmodium falciparum*-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgE antibodies in paired maternal-cord sera from east Sepik Province, Papua New Guinea. *Infect. Immun.* 61: 988–993.
173. Deloron P, Dubois B, Le Hesran JY, Riche D, Fievet N, et al. (1997) Isotypic analysis of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of *P. falciparum* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 110: 212–218.
174. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL (2005) Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3630–3635.
175. Jafari-Guemouri S, Ndam NT, Bertin G, Renart E, Sow S, et al. (2005) Demonstration of a high level of parasite population homology by quantification of *Plasmodium falciparum* alleles in matched peripheral, placental, and umbilical cord blood samples. *J Clin Microbiol* 43: 2980–3.
176. King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, et al. (2002) Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol* 168: 356–64.
177. Dent A, Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Crabb BS, et al. (2006) Prenatal malaria immune experience affects acquisition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 invasion inhibitory antibodies during infancy. *J Immunol* 177: 7139–45.
178. Le Port A (2011) Survenue des premières infections palustres chez le nouveau-né au Bénin Paris: Pierre et Marie Curie.
179. WHO | Indicators for assessing infant and young child feeding practices – part I: definition (s. d.) WHO. Disponible: <http://www.emro.who.int/cah/pdf/IYCF-Indicators-2007.pdf>. Consulté 23 févr 2012.
180. Pierrat C (2010) Des moustiques et des hommes: les territoires du paludisme à Tori Bossito (Sud du Bénin) Paris: Paris 1 Panthéon Sorbonne.
181. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, et al. (1987) Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull. World Health Organ.* 65: 39–45.
182. Thiam, D. D (2010) Modèles linéaires à effets mixtes pour l'analyse de données longitudinales: Application à l'étude de la réponse anticorps de l'enfant face au Paludisme.

183. Gaudart, J., Giorgi, R., Thalabard, JC., Thiam, D., Whegang, S (2010) Modèles linéaires à effets mixtes. Disponible: [cybertim.timone.univ-mrs.fr/infos-divers/atelierR/atelier\\_r\\_seance3](http://cybertim.timone.univ-mrs.fr/infos-divers/atelierR/atelier_r_seance3). Consulté 10 mars 2012.
184. Bonnet S, Pêtres S, Holm I, Fontaine T, Rosario S, et al. (2006) Soluble and glyco-lipid modified baculovirus *Plasmodium falciparum* C-terminal merozoite surface protein 1, two forms of a leading malaria vaccine candidate. *Vaccine* 24: 5997–6008.
185. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF (1993) Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). *Molecular and Biochemical Parasitology* 59: 1–14.
186. McCarthy JS, Marjason J, Elliott S, Fahey P, Bang G, et al. (2011) A Phase 1 Trial of MSP2-C1, a Blood-Stage Malaria Vaccine Containing 2 Isoforms of MSP2 Formulated with Montanide® ISA 720. *PLoS ONE* 6: e24413.
187. Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follmann F, Bredmose L, et al. (2004) A *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine* 22: 1188–1198.
188. Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, Høgh B (1995) Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2: 30–34.
189. Kocken CHM, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der Wel A, Hackett F, et al. (2002) High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect. Immun.* 70: 4471–4476.
190. Le Port A, Cottrell G, Martin-Prevel Y, Migot-Nabias F, Cot M, et al. (2012) First malaria infections in a cohort of infants in Benin: biological, environmental and genetic determinants. Description of the study site, population methods and preliminary results. *BMJ Open* 2: e000342.
191. Le Port A, Cottrell G, Dechavanne C, Briand V, Bouraima A, et al. (2011) Prevention of malaria during pregnancy: assessing the effect of the distribution of IPTp through the national policy in Benin. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 84: 270–275.
192. Simister NE (2003) Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21: 3365–9.
193. Simister NE, Story CM (1997) Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J. Reprod. Immunol* 37: 1–23.
194. May K, Grube M, Malhotra I, Long CA, Singh S, et al. (2009) Antibody-dependent transplacental transfer of malaria blood-stage antigen using a human ex vivo placental perfusion model. *PLoS ONE* 4: e7986.

195. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK (2009) Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 13–36.
196. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE (1995) Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 52: 565–8.
197. Snounou G, Singh B (2002) Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol. Med.* 72: 189–203.
198. Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren Mats (2008) *Methods in malaria research*. 5th éd. Manassas, Virginia and Paris, France: MR4 / ATCC and BioMalPar.
199. Liljander A, Wiklund L, Falk N, Kweku M, Martensson A, et al. (2009) Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (msp1 and 2). *Malar J* 8: 78.
200. Falk N, Maire N, Sama W, Owusu-Agyei S, Smith T, et al. (2006) Comparison of PCR-RFLP and Genescan-based genotyping for analyzing infection dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 74: 944–50.
201. Cattamanchi A, Kyabayinze D, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G (2003) Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of MSP1, MSP2, and glurp. *Am J Trop Med Hyg* 68: 133–9.
202. Magesa SM, Mdira KY, Farnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, et al. (2001) Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from re-infections by using polymerase chain reaction genotyping in a holoendemic area in northeastern Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 477–483.
203. Henning L, Schellenberg D, Smith T, Henning D, Alonso P, et al. (2004) A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 687–94.
204. Felger I, Smith T, Etoh D, Kitua A, Alonso P, et al. (1999) Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93 Suppl 1: 29–34.
205. Smith T, Felger I, Beck HP, Tanner M (1999) Consequences of multiple infection with *Plasmodium falciparum* in an area of high endemicity. *Parassitologia* 41: 247–250.
206. Färnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Björkman A (1999) Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J. Infect. Dis.* 179: 989–995.
207. Vafa M, Troye-Blomberg M, Anchang J, Garcia A, Migot-Nabias F (2008) Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J* 7: 17.



208. Mayengue PI, Luty AJ, Rogier C, Baragatti M, Kremsner PG, et al. (2009) The multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections is associated with acquired immunity to asexual blood stage antigens. *Microbes Infect* 11: 108–14.
209. Mitchell A (2005) *The ESRI Guide to GIS Analysis. Volume 2, Spatial Measurements & Statistics*. Redlands (Calif.): ESRI Press.
210. Dray S, Dufour AB, Chessel D (2007) The ade4 Package— II: Two-table and K-table Methods. *R News* 7: 47–52.
211. Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J (2004) The ade4 package - I: One-table methods. *R News* 4: 5–10.
212. Guinovart C, Dobaño C, Bassat Q, Nhabomba A, Quintó L, et al. (2012) The Role of Age and Exposure to *Plasmodium falciparum* in the Rate of Acquisition of Naturally Acquired Immunity: A Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE* 7: e32362.
213. Cottrell G, Mary JY, Barro D, Cot M (2007) The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* 76: 849–54.
214. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, et al. (2011) Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85: 214–220.
215. Guevara Patiño JA, Holder AA, McBride JS, Blackman MJ (1997) Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. *J. Exp. Med.* 186: 1689–1699.
216. Uthaipibull C, Aufiero B, Syed SE, Hansen B, Guevara Patiño JA, et al. (2001) Inhibitory and blocking monoclonal antibody epitopes on merozoite surface protein 1 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 307: 1381–1394.
217. Adda CG, Murphy VJ, Sunde M, Waddington LJ, Schloegel J, et al. (2009) *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is unstructured and forms amyloid-like fibrils. *Mol Biochem Parasitol* 166: 159–71.
218. Zhang X, Perugini MA, Yao S, Adda CG, Murphy VJ, et al. (2008) Solution conformation, backbone dynamics and lipid interactions of the intrinsically unstructured malaria surface protein MSP2. *J. Mol. Biol.* 379: 105–121.
219. Feng Z-P, Zhang X, Han P, Arora N, Anders RF, et al. (2006) Abundance of intrinsically unstructured proteins in *P. falciparum* and other apicomplexan parasite proteomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150: 256–267.

220. Guevara Patiño JA, Holder AA, McBride JS, Blackman MJ (1997) Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. *J. Exp. Med.* 186: 1689–1699.

# ANNEXES

**Annexe 1:** Tableau de correspondance entre les acides aminés, les codes à 1 ou 3 lettres et les codons correspondants.

Acides aminés	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Codons correspondants
Alanine	Ala	A	GCT, GCA, GCC, GCG
Arginine	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparagine	Asn	N	AAT, AAC
Acide aspartique	Asp	D	GAT, GAC
Cystéine	Cys	C	TGT, TGC
Acide glutamique	Glu	E	CAA, CAG
Glutamine	Gln	Q	GAA, GAG
Glycine	Gly	G	GGT, GGA, GGC, GGG
Histidine	His	H	CAT, CAC
Isoleucine	Ile	I	ATT, ATC, ATA
Leucine	Leu	L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Méthionine	Met	M	ATG
Phénylalanine	Phe	F	TTT, TTC
Proline	Pro	P	CCT, CCA, CCC, CCG
Serine	Ser	S	TCT, TCA, TCC, TCG, AGT, AGC
Thréonine	Thr	T	ACT, ACA, ACC, ACG
Tryptophane	Trp	W	TGG
Tyrosine	Tyr	Y	TAT, TAC
Valine	Val	V	GTT, GTA, GTC, GTG

## Annexe 2: Poster présenté à la journée de l'Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement (mai 2011)



### Genetic characterization of *Plasmodium falciparum* clones infecting mothers at delivery and their children during their first plasmodial infections

C. Dechavanne<sup>1</sup>, E. Renard<sup>1</sup>, N. Martin<sup>2</sup>, A. Le Port<sup>1</sup>, S. Guemouri<sup>1</sup>, B. Costes<sup>2</sup>, A. Garcia<sup>1</sup>, A. Massougbdji<sup>3</sup>, F. Migot-Nabias<sup>1</sup>

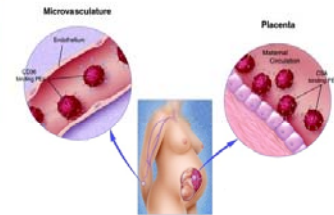
1. UMR 216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Université Paris Descartes, Paris, France; 2. Plate-Forme de génotypage et de séquençage CHU Henri Mondor, Créteil, France; 3. Laboratoire de Parasitologie, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou, Bénin

#### Introduction:

Four studies in Cameroon<sup>[1]</sup>, Tanzania<sup>[2]</sup>, Gabon<sup>[3]</sup> and Kenya<sup>[4]</sup> showed that fetal malaria experience induces a greater susceptibility to malaria infection during infancy. These studies concluded to an hypothesis of immune tolerance among newborns. Tolerance may be induced by the exposition of the fetus to soluble parasite's antigens. The newborn could not develop an effective immune response against the parasite's antigens he met *in utero*. The characterization of polymorphic parasite's genes like *msp 2* (*microzoite surface protein*) and *glurp* (*glutamate rich protein*) represents a new approach in order to validate this hypothesis.

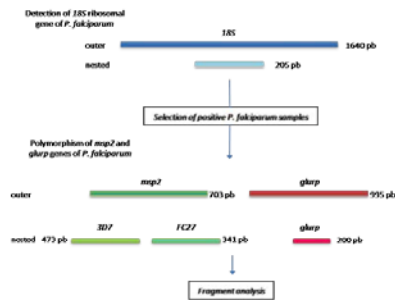
#### Purpose:

This study explores the immune tolerance hypothesis according to which tolerance can be partly induced by parasite's antigens that fetus met *in utero*. The comparison of blood stage antigen's genes between mothers with placental malaria at delivery and their infants during their first malaria infections may bring some answers.



Proposed model for the dichotomy in adhesion to microvasculature endothelium and placenta<sup>[5]</sup>

PE: parasitized erythrocytes



#### Materials and Methods:

Forty eight pairs of mothers with placental malaria residing in a malaria endemic area and their infants followed each month from birth to 18 months (to detect asymptomatic parasite carriage) and each time a febrile status (symptomatic status) was suspected, were considered. Placenta samples and infants blood were collected on filter paper (Whatman No. 3) DNA of all spots was extracted using the Chelex® method.

#### Detection of 18S ribosomal gene of *P. falciparum*:

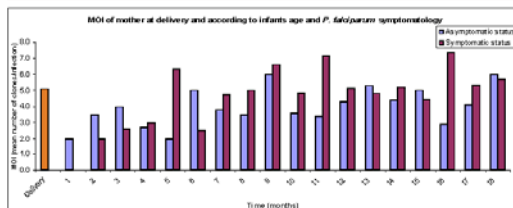
18S is a common gene which allows to detect *Plasmodium* species. A nested PCR was used to detect *P. falciparum* positive samples.

#### Polymorphism of *msp-2* and *glurp* genes of *P. falciparum*:

A nested PCR using fluorescent primers<sup>[6]</sup> was used to quantify the alleles of these genes.

#### Preliminary results:

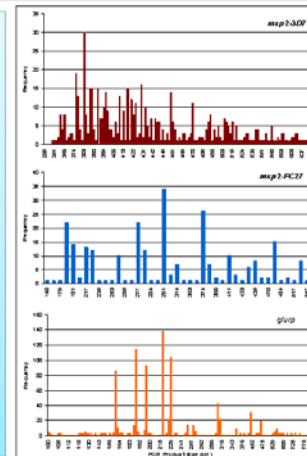
The multiplicity of infection (MOI), which is the number of clones infecting an infant at one time, was defined as the highest value when comparing *msp2* and *glurp* alleles' effectives. The mean MOI was  $5.1 \pm 3.1$  and  $4.8 \pm 2.9$  in mothers and infants, respectively. A greater MOI after 4 months of life ( $p < 0.001$ ) reflects probably the diminution of maternal antibodies in the infants' blood. There is a significant difference between the symptomatic and the asymptomatic status ( $p < 0.01$ ).



*Msp2-3D7* (131 alleles) and *glurp* (129 alleles) revealed considerably greater parasite diversity than *msp2-FC27* (41 alleles). The mean number of alleles per sample (complexity of infection) was very high: *msp2-3D7* (4.3), *msp2-FC27* (6.3) and *glurp* (7.2).

In spite of its high complexity of infection, *glurp* includes 5 predominant conserved alleles which frequencies are until 4 times higher than those of all other investigated alleles.

11% of identical clones (based on *msp2* fragments differing by no more than 3pb) were found in a mother at delivery and his infant during the survey.



#### Conclusion:

Our preliminary results show that there is an important *msp2* and *glurp* allelic diversity with a high individual complexity of infection. These genes seem to be good markers to characterize infecting clones as well as the nature of the infections (recrudescence, new infection) affecting each infant. The MOI is higher than usually described in the literature: this reflects probably the high sensibility of our detection method. The probability for infants to meet their mothers' clones must be analyzed by taking into account accurate environmental measures (entomological inoculation rate, temperature, hygrometry...). This will provide argumentation on the immune tolerance hypothesis, which knowledge is important for orientating malaria control strategies.

#### Références:

1. Le Hesran JY et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first two years of life. Am J Epidemiol. 1997, 146: 826-31.
2. Mutabingwa TK et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. PLoS Med. 2005, 2(12).
3. Schwarz Ng et al. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. Clin Infect Dis. 2008, 47: 1017-25.
4. Malhotra I et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. PLoS Med. 2009, 6(7).
5. Gamain B et al. Molecular basis for the dichotomy in *Plasmodium falciparum* adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. PNAS. 2002, 99: 10020-4.
6. Snounou G et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993, 61: 315-20.

**Annexe 3: Poster présenté au congrès Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomiques (SMAP, septembre 2011)**



**Mother and neonate distinct immunoglobulin G:  
a new way to neonatal serological diagnosis using proteomics**

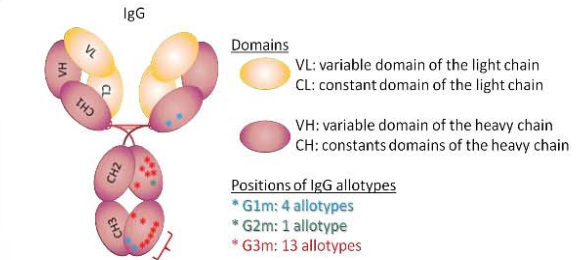
*Célia Dechavanne<sup>1</sup>, François Guillonneau<sup>2</sup>, Laïla Sago<sup>2</sup>, Virginie Salnot<sup>2</sup>, Evelyne Guitard<sup>3</sup>, Philippe Chafey<sup>4</sup>, Marie-Paule Lefranc<sup>5</sup>, Jean-Michel Dugoujon<sup>2</sup>, Patrick Mayeux<sup>2</sup>, Florence Migot-Nabias<sup>1</sup>*

1 Institut de Recherche pour le Développement, UMR 216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France; 2 Plate-forme protéomique de l'Université Paris Descartes, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France; 3 Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, UMR 5288, Université Paul Sabatier Toulouse III, 37 allées Jules-Guesde, 31073 Toulouse, France; 4 Institut Cochin, Inserm U1016, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France; 5 Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire, Université Montpellier 2, UPR CNRS 1142, Institut de Génétique Humaine, 141, rue de la Cardanille, 34396 Montpellier Cedex 5, France

**Introduction:**

Systemic transfer of maternal antibodies occurs *in utero* across the placenta. This active transport mechanism of maternal IgG to the fetus usually results in about 90% of the maternal serum level of IgG antibodies in the full-term newborn at delivery. **Presence in infant plasma of shared maternal and intrinsic antibodies hampers the serological diagnosis of infants.** If a direct diagnosis is impossible or is not sufficient, the detection of the neonate own antibodies can bring essential information mainly useful to adapt a treatment.

Gm allotypes are antigenic determinants located in the constant regions of the polypeptidic chains of IgG. **Individual variations of Gm allotype combinations may be an interesting way to distinguish maternal and neonatal antibodies.**



**Selection of discriminatory peptide sequences coded by G3m alleles**

**I** G3m5,10,11,13,14,26,27 S . DIAVEWSSGQPENNYNTIPPML . D [...] R . WQGNVFSC SVMHE.ALHNR .  
**II** G3m5,6,11,24,26 S . DIAVEWSSGQPENNYNTIPPVL . D [...] R . WQGNVFSC SVMHE.ALHNR .

**Purpose:**

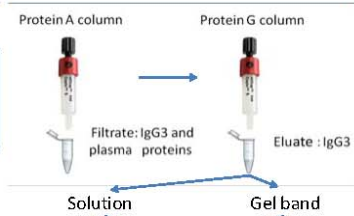
The main objective of this study is to propose a new method using mass spectrometry which will allow for the first time to determine infant neo-synthesized IgG by the detection and the quantification of Gm immunoglobulin allotypes.

**Materials and Methods:**

**Selection of plasma samples** on the basis of the allotype determination by **inhibition of hemagglutination**

2 homozygous **I** and **II** individuals  
 A **I** / **II** heterozygous mother and her **I** homozygous child (tested at 15 months of age)

**Purification by affinity chromatography** in order to isolate the **IgG3**



**Reduction, alkylation, enzymatic digestion** in order to prepare the discriminatory peptides

**Reduction:** DTT  
**Alkylation:** Chloroacetamid  
**Enzymatic digestions:** Asp.N + Trypsin (10 ng/µL each)

MALDI TOF-TOF and ESI-TRAP: **MS-MS**

Proteotypic peptides list

**Label Free** quantification

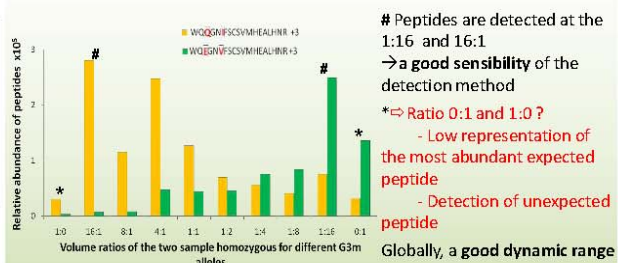
Proteogenesis software 3.0

**Results:**

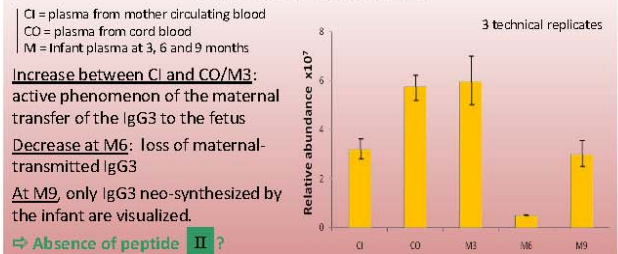
**Purification**

Final eluate is enriched in IgG3 but a residual presence of other IgG subclasses is confirmed by ELISA and MS-MS.

**Relative abundance of discriminatory peptides from a volume mixture of two different allotype homozygous samples**



**Relative abundance of discriminatory peptides from a mother and her child samples**



**Conclusion:**

It seems possible to distinguish the maternal and the neo-synthesized antibodies mixed in the first months of life of newborns, but only one of the two peptides is yet measured. We need to:

- test another mass spectrometer analysis using a higher resolution,
- verify that particular allotypes are not selected to the detriment to others during the purification step.

The detection of the neonate own antibodies can bring essential diagnosis information for the adaptation of a therapeutic treatment. To validate this new concept, the protocol will be tested on antibodies produced in the context of vertically-transmitted diseases.

**Annexe 4 : Standard Operating Procedure Indirect ELISA-IgG**

Contents:

1. Objective
2. Summary
3. References
4. Safety issues
5. Materials
6. Samples
7. Working procedure
8. Calculations
9. Validation and reporting
10. Specimen, reagent, and data management
11. Documentation of amendments to SOP

## 1. Objective

Quantification of IgG antibodies against *Plasmodium falciparum* MSP1-19.

## 2. Summary

The IgG level is determined by an indirect ELISA method using a single serum / plasma dilution obtained by checker-board titration experiments. The optical density (OD) of the test sample is converted into arbitrary units (A.U.) by means of a standard-curve from known concentrations of purified human polyclonal IgG.

Wells of microtiter plates are coated with either MSP1-19 antigen or serial dilutions of the purified human polyclonal IgG. Diluted test-samples and controls (primary antibody) are added to the wells containing the MSP1-19 antigen and specific antibodies against MSP1-19 are revealed by Peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG (secondary antibody). Bound secondary antibody is quantified by colouring with ready to use TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) substrate. Optical density (OD) is read at 450 nm with a reference at 620nm in a plate reader, and the OD value of the test-sample is converted into A.U. by means of a standard curve on each plate.

## 3. References

Doodoo, D., M. Theisen, J. A. Kurtzhals, B. D. Akanmori, K. A. Koram, S. Jepsen, F. K. Nkrumah, T. G. Theander, and L. Hviid. 2000. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J.Infect.Dis.* 181:1202-1205.

Oeuvray, C., M. Theisen, C. Rogier, J. F. Trape, S. Jepsen, and P. Druilhe. 2000. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect.Immun.* 68:2617-2620.

## 4. Safety issues

In order to perform this analysis, it is recommended that personnel wear disposable gloves and are vaccinated against hepatitis B. Chemicals and reagents must be handled according to the institutional guidelines, manufacturer's instructions and chemical / reagent datasheets.

## 5. Materials

### 5a. Chemicals:

10 M Sulphuric acid

Tween 20

TMB ONE

Phosphate buffered saline tablets 18912-014

Dry skimmed non-fat milk

NaCl

Reference:

BBB 133552

Merck cat. no 822184

4380

18912-014

Supplier:

Bie & Berntsen

Merck Eurolab

KEM EN TEC

Gibco

Matas

### 5b. Solutions:

Coating buffer

Blocking buffer

Serum dilution buffer

Washing buffer

Colour solution

Dilution buffer

10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Reference:

Appendix A

Appendix B

Appendix C

Appendix D

Appendix E

Appendix F

Appendix G

### 5c. Antibodies:

peroxidase conjugated goat anti-human IgG

Reference:

H10007

Supplier:

Caltag

### 5d. Reference reagents:

Purified human polyclonal IgG

Reference:

The Binding Site BP055

Supplier:

The Binding Site



Positive Liberian plasma samples	SSI
Negative Danish plasma samples	SSI

<u>5e. Antigen:</u>	Reference:	Supplier:
MSP1-19	From Baculovirus	IP

<u>5f. Equipment and computer programs:</u>	Supplier:
Pipettes 1-20 µl, 20 –100 µl, 40-200 µl, 200 –1000µl	own institution
8 channel pipette	own institution
Stopwatch	own institution
Rocker platform	own institution
A manual or automated plate washer	own institution
Plate reader	own institution
Computer	own institution
Program for data calculation	Ed Remarque

<u>5g. Plastic and glass ware:</u>	Reference:	Supplier:
Polystyrene microtiter plates	Maxisorp F 96 439454	Nunc / SSI
Plastic reservoir for buffers and solutions		own institution
Glass ware		own institution
Pipette tips		SSI
Plastic sealer for microtiter plates		SSI

## 6. Samples

### 6a. Human serum / plasma samples:

Serum dilution: this would normally be 1:200, unless optical density (OD) of test samples is above the readable range for the ELISA plate reader, when the test sample must be further diluted.

### 6b. Antibody quantification:

For antibody quantification, each assay includes a calibration (standard) curve obtained with a polyclonal reference IgG (1.0 mg/ml). For the standard curve, serial dilutions (2-fold) of standard IgG proteins are coated directly to duplicate wells in columns 1 and 2 using 100 µl / well. Concentrations of standard IgG are 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.13; 1.56; 0.78 ng / ml.

In order to prepare the standard reference curve for 12 plates, first make a working stock of 500 ng/ml by transferring 5 µl of the 1.0 mg / ml standard into 9.995 ml of coating buffer (1:2000).

Then prepare 8 tubes labelled 1 to 8 for a 2-fold serial dilution of the standard

- 1) To tube 1, add 8 ml of coating buffer.
- 2) Add 3 ml of coating buffer each to tubes 2 to 8.
- 3) Transfer 2 ml from the working stock (500 ng/ml) to tube 1, and mix well.
- 4) Transfer 3 ml from tube 1 into tube 2, and mix well.
- 5) Transfer 3 ml from tube 2 into tube 3, and mix well.
- 6) Transfer 3 ml from tube 3 into tube 4, and mix well.
- 7) Transfer 3 ml from tube 4 into tube 5, and mix well.
- 8) Transfer 3 ml from tube 5 into tube 6, and mix well.
- 9) Transfer 3 ml from tube 6 into tube 7, and mix well.
- 10) Transfer 3 ml from tube 7 into tube 8, and mix well.

Twelve plates should enable you to complete the IgG-ELISA of 384 serum samples against one antigen.

#### 6c. Control plasma samples

Pools of plasma from clinically immune adult Liberians (n=4) and Danish blood donors never exposed to malaria (n=2):

Plasma pool /PBS blank  
PC-AIA-01  
PC-AIA-02  
PC-AIA-03  
PC-AIA-04  
NC-AIA-05  
NC-AIA-06  
PBS blank

Expected IgG concentration range:

PC, Positive Control; NC, Negative Control.

The pools of positive plasma samples have been selected from a panel of plasma samples collected by Dr. S. Jepsen. This panel was screened for reactivity against GLURP<sub>25-514</sub>, MSP3<sub>212-380</sub>, MSP1-19kDa, and AMA1 and four pools of x samples each, which displayed high reactivity against all four antigens were selected for this study.

The pools of negative samples have been selected from a panel of blood samples from Danish blood donors never exposed to malaria.

## 7. Working procedure

- a.** Microtiter plates are coated with **1)** 100 µl per well of serial dilutions of the standard reference IgG solution in PBS coating buffer [appendix A] in columns 1 and 2 on each plate (shaded light grey in fig. a), and **2)** 100 µl per well of r MSP1-19 in PBS coating buffer at 1.0 µg/ml in columns 3 to 12 (unshaded in fig. a). Cover the plates with a plastic sealer. Each plate is labelled with antigen name, Isotype or IgG subclass, series number, date and personnel initial. The plates can be stored for 21 days in the fridge at 2 to 8 °C.
- b.** Serum / plasma samples should be diluted 1:200 (as in 6a.) in serum dilution buffer (1 % milkpowder in PBST plus 0.02 % NaAz, [appendix C]). The dilutions can be stored for 21 days in the fridge at 2 to 8 °C.
- c.** Remove the plates from the fridge and wash them four times in washing buffer (PBST with 0.5 M NaCl, [appendix D]). For each washing step leave the plate filled with washing buffer for 1 minute before it is emptied. Pad the plates dry and add 150 µl of blocking buffer (3% milkpowder in PBS-Tween 20 (PBST), [appendix B]) and keep at room temperature for 1 hour.
- d.** Empty the plates, pad them dry, and wash the plates 4 times in washing buffer. For each washing step leave the plate filled with washing buffer for 1 minute before it is emptied. Add 100 µl of dilution buffer to wells in columns 1 and 2 (shaded light grey in fig. b). Add 100 µl of the diluted 4 positive and the 2 negative control samples and a PBS blank to duplicate wells in columns 3 and 4 (shaded dark grey in fig b). 100 µl of the diluted test sample are added to duplicate wells in columns 5 to 12 (unshaded in fig. b). Incubate for 2 hours with shaking on a rocker platform at room temperature.
- e.** Wash the plates 4 times in washing buffer. For each washing step leave the plate filled with washing buffer for 1 minute before it is emptied.
- f.** Add to each well 100 µl of Peroxidase-conjugated goat anti-human IgG diluted 1:3000 in dilution buffer. Incubate for 1 hour with shaking on a rocker platform at room temperature.
- g.** Wash the plates 4 times in washing buffer. For each washing step you leave the plate filled with washing buffer for 1 minute before it is emptied.
- h.** Add to each well 100 µl of colour solution [appendix E]. Incubate at room temperature for 30 min in the dark.
- i.** Add to each well 100 µl 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and read the absorbance at 450 nm, ref. 620 nm on a plate reader. Save the results in a text file as shown in Fig. c. without the column numbers (1 to 12) and the row labels (A to H), and without space at the top or the left side of text data; the text file may be edited and saved in notepad or wordpad.
- j.** The conversion of absorbance values into A.U. is performed by using the supplied Microsoft-Excel based curve fitting program [appendix K].
- k.** For each day fill out a work protocol (appendix H).

**Fig. a Antigen coating template**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Fig. b Serum / plasma sample template**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG 100 ng/ml	Std IgG 100ng/ml	PC-1	PC-1	S-1	S-1	S-9	S-9	S-17	S-17	S-25	S-25
B	50 ng/ml	50 ng/ml	PC-2	PC-2	S-2	S-2	S-10	S-10	S-18	S-18	S-26	S-26
C	25 ng/ml	25 ng/ml	PC-3	PC-3	S-3	S-4	S-11	S-11	S-19	S-19	S-27	S-27
D	12.5 ng/ml	12.5 ng/ml	PC-4	PC-4	S-4	S-4	S-12	S-12	S-20	S-20	S-28	S-28
E	6.25 ng/ml	6.25 ng/ml	NC-1	NC-1	S-5	S-5	S-13	S-13	S-21	S-21	S-29	S-29
F	3.13 ng/ml	3.13 ng/ml	NC-2	NC-2	S-6	S-6	S-14	S-14	S-22	S-22	S-30	S-30
G	1.56 ng/ml	1.56 ng/ml	PBS	PBS	S-7	S-7	S-15	S-15	S-23	S-23	S-31	S-31
H	0.78 ng/ml	0.78 ng/ml	PBS	PBS	S-8	S-8	S-16	S-16	S-24	S-24	S-32	S-32

**8. Calculations**

For calculation, a Microsoft Excel based curve fitting program (AIA ELISA V4) is used. The AIA ELISA V4 contains a collection of macros and worksheets designed for calculating antibody units (A.U.) from

OD values, using standard curves obtained from each ELISA test plate. The standard curve is based on a four-parameter calibration curve;  $Y=MX +C$

1. Using the curve-fitting program, evaluate one ELISA reader output at a time. The ELISA reader output may look like the example in fig c below.

**Fig. c Input file for calculation of IgG levels**

4.906	5.503	3.092	3.134	3.645	3.760	4.619	4.870	3.227	3.269	4.471	4.493
4.942	5.742	2.578	2.616	5.251	5.288	0.793	0.690	0.307	0.215	1.178	1.202
4.994	6.000	4.467	4.634	1.601	1.621	1.293	1.305	0.204	0.368	5.634	5.115
5.162	5.381	3.485	3.672	0.542	0.624	4.994	5.032	0.310	0.307	4.610	4.949
4.862	5.093	0.489	0.404	0.403	0.693	2.022	2.105	0.491	0.315	5.815	5.090
3.763	3.951	0.221	0.197	0.235	0.227	0.406	0.599	1.434	1.653	0.511	0.416
1.657	1.759	0.108	0.107	0.592	0.945	4.744	4.772	1.858	1.944	2.764	2.845
0.672	0.785	0.193	0.101	0.454	0.503	5.411	5.071	1.873	1.953	4.954	4.798

2. Use the ELISA reader output text file saved in the AIA format. For example “M1GHG0DD200503.txt”, indicates an ELISA for MSP1-19 (M1), performed in Ghana (GH) for total IgG (G0) by Daniel Dodoo (DD) on the 20<sup>th</sup> may 2003 (200503)
3. Open the AIA ELISA V4 excel based curve fitting program, to generate standard curves that transform ELISA OD’s to antibody units (AU) as outlined in detail in Appendix K”.

### 9. Validation and reporting

The results are given in A.U. for each test serum / plasma sample by using the EXCEL-program to transform an absorbance value with the standard curve for each plate.

1. If the coefficient of variation (CV) of the duplicate test-sample is more that 15%, you will have to repeat the test for that particular test-sample.
2. If your plate reader is unable to read the absorbance value of a particular test sample because it is above the limit of the reader, then the sample must be tested again in a higher dilution.
3. If the absorbance values of one or more of the positive and negative control samples do not fall within the recommended range you will have to repeat the test of all samples on this particular plate.
4. If the absorbance values of the PBS control do not fall within the recommended range you will have to repeat the test of all samples on this particular plate.

### 10. Specimen, reagent and data management

Serum / plasma sample dilutions must be stored in dilution buffer + NaAz in the fridge at 4 °C until use.

The antigen solution must be stored at –20 to –80 °C until use.

The commercial antibodies must be stored according to the manufacturer’s recommendations as indicated on the bottles or on the accompanying data work sheet.

The data belongs to the investigating scientist and his institute. However, as a safety precaution a copy must be submitted electronically to the coordinator.

11. Documentation of amendments to SOP

Version	Date	Section	Amendment
01	20.01.03	-	-