

Université de Montréal

**Caractérisation du profil lymphocytaire B et de la réponse vaccinale des enfants exposés
non infectés par le virus de l'immunodéficience humaine**

par Laurence Raymond Marchand

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en microbiologie et immunologie

Août 2017

© Laurence Raymond Marchand, 2017

Résumé

En bas âge, les enfants exposés au VIH mais non infectés (ENI) ont des risques de morbidité et de mortalité plus élevés. Des perturbations dans le profil immunitaire ont été mises en évidence et associées, en outre, aux paramètres maternels relatifs à l'infection au VIH y compris l'exposition au VIH, aux agents antirétroviraux et au milieu placentaire pro-inflammatoire. Ici, nous avons caractérisé le compartiment cellulaire B et la réponse vaccinale antitétanique d'enfants ENI durant leur 1^{re} année de vie.

Les enfants ENI (n = 68) de la cohorte du CMIS ont été stratifiés selon le zénith de la charge virale (CV; ≤ 40 vs. > 40 copies/ml plasma) et le nadir du compte de CD4 (< 500 vs. ≥ 500 cellules/mm³) de la mère en grossesse. Les nouveau-nés ont reçu une prophylaxie (AZT/3TC) 12 h après la naissance et jusqu'à leur 4^e ou 6^e semaine d'âge. Les cellules mononucléées de sang ont été isolées à la naissance, à 6 et à 12 mois d'âge. Les sous-populations de cellules B (naïves; transitionnelles T1/T2; plasmablastes; mémoires classiques, activées et atypiques) ont été analysées par cytométrie en flux grâce à un marquage pour CD10, CD20, CD21, CD27 et l'IgM de surface. Les cellules B spécifiques au tétanos et la capacité de sécrétion d'IgG de la fraction mémoire ont été étudiées à l'aide d'oligomères fluorescents du fragment C du toxoïde tétanique (TTCF) et d'une détection immunoenzymatique des IgG par ELISpot.

Les nourrissons nés de mères avec une CV détectable en grossesse avaient une proportion élevée de plasmablastes (p=0,0449) et diminuée de cellules B CD19⁺ (p=0,0174) à la naissance en plus d'une proportion accrue de cellules B mémoires classiques IgM⁺ à 12 mois (p=0,0367). Ceux dont les mères avaient une immunité lymphocytaire T CD4⁺ altérée en grossesse (< 500 cellules/mm³) présentaient des fréquences augmentées de plasmablastes (p=0,0458) et de cellules B mémoires activées IgM⁺ (p=0,0071) à la naissance et à 6 mois de vie respectivement. Ces résultats suggèrent une maturation précoce du compartiment cellulaire B et une altération dans la commutation de classe chez les bambins nés de mères avec une CV détectable et/ou un compte de CD4 sous-optimal. Aucune différence majeure n'a été notée

dans la réponse vaccinale antitétanique des enfants ENI. Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que la gravité des paramètres maternels en terme de CV et de compte de CD4 n'a que peu d'impact sur l'ontogénie des cellules B chez les enfants ENI et leur capacité à répondre à une vaccination.

Mots-clés : VIH; Lymphocytes B; Enfants exposés non infectés; Tétanos; Réponse vaccinale

Abstract

In early life, HIV-exposed uninfected (HEU) children experience higher rates of morbidity and mortality. Studies revealed evidences of alterations in their immunological profile that are associated, in part, with maternal parameters related to HIV infection including *in utero* exposure to HIV, antiretroviral therapy (ART) and the pro-inflammatory placental environment. Here, we performed a longitudinal profiling of the B cell subsets and response to tetanus vaccine in HEU children during their 1st year of life.

HEU children (n = 68) from the CMIS Cohort were stratified based on the zenith of the maternal viral load (VL; ≤ 40 vs. > 40 copies/ml plasma) and the nadir of the maternal CD4 count (< 500 vs. ≥ 500 cells/mm³) during pregnancy. Newborns received prophylactic ART (AZT/3TC) from 12h after birth until week 4 or 6. Blood mononuclear cells were isolated at birth, 6, and 12 months of age. CD19⁺ B cell subsets (naïve; transitional T1/T2; classical, activated and atypical memory; plasmablasts) were analysed by flow cytometry using CD10, CD20, CD21, CD27 and surface IgM markers. Tetanus-specific B cells and the IgG secreting activity of the memory fraction were studied using fluorescent tetanus toxoid C fragment (TTCF) oligomers and an ELISpot assay.

HEU infants born to mothers with a detectable VL during pregnancy had increased proportions of plasmablasts (p=0,0449) and a lower frequency of CD19⁺ B cells (p=0,0174) at birth in addition to having an expanded percentage of IgM⁺ classical memory B cells at 12 months (p=0,0367). Infants whose mothers had an impaired CD4 immunity throughout pregnancy (< 500 cells/mm³) presented with greater frequencies of plasmablasts (p=0,0458) and IgM⁺ activated memory B cells (p=0,0071) at birth and 6 months respectively. These results suggest an early maturation of the B cell compartment and an alteration of the class switching mechanism in infants born to mothers with either a detectable VL or a low CD4 count. No relevant difference was noted in the TTCF-specific B cell subsets and the ability of memory B cells to generated specific antibodies. Overall, the severity of the maternal parameters in terms of VL and CD4 count had little impact on the ontogeny of the B cells subsets and their capacity to respond to vaccination.

Keywords : HIV; B Cells; HIV-Exposed Uninfected Children; Tetanus; Vaccine Response

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Compartiment lymphocytaire B.....	1
1.1.1 Développement précoce.....	1
1.1.2 Développement tardif des lymphocytes B.....	4
1.2 Virus de l'immunodéficience humaine.....	8
1.2.1 Survol de l'épidémiologie du virus de l'immunodéficience humaine.....	8
1.2.2 Vue d'ensemble de la structure, de la réplication du VIH-1 et de la fonction des classes d'antirétroviraux.....	10
1.2.3 Physiopathologie du VIH.....	13
1.3 Impact du VIH sur la grossesse et son déroulement.....	16
1.3.1 Condition obstétricale et périnatale.....	16
1.3.2 Transmission verticale.....	20
1.4 Enfants exposés au VIH mais non infectés.....	23
1.4.1 Aperçu des lignes directrices actuelles pour la prévention de la transmission verticale.....	23
1.4.2 Toxicité mitochondriale.....	25
1.4.3 Perturbation des paramètres hématologiques.....	27
1.4.4 Risques de mortalité chez les enfants ENI.....	28
1.4.5 Risques de morbidité reliée aux maladies infectieuses.....	30
1.4.6 Particularités du compartiment lymphocytaire T.....	35

1.4.7 Défense humorale du nouveau-né.....	37
1.3.8 Réponse vaccinale.....	39
1.3.9 Particularités du compartiment lymphocytaire B	40
1.3.10 Autres déterminants cliniques.....	42
1.5 Hypothèse et Objectifs.....	43
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	44
2.1 Description de la cohorte	44
2.1.1 Portrait des enfants ENI.....	44
2.1.2 Portrait maternel.....	44
2.2 Vaccination et modalités relatives aux prélèvements et au traitement des échantillons sanguins.....	48
2.2.1 Vaccination des enfants	48
2.2.2 Déroulement des prélèvements sanguins.....	48
2.2.3 Isolation et congélation des cellules mononucléées du sang de cordon ombilical et du sang périphérique et du plasma.....	49
2.3 Production, biotinylation et purification du fragment C du toxoïde tétanique	50
2.3.1 Transformation bactérienne	50
2.3.2 Induction protéique et biotinylation <i>in vivo</i>	52
2.3.3 Isolation et purification du TTCF	52
2.3.4 Validation de la purification, de la biotinylation et stockage du TTCF.....	53
2.5 Immunophénotypage lymphocytaire B.....	55
2.5.1 Décongélation cellulaire	55
2.5.2 Caractérisation des sous-populations lymphocytaires B.....	55
2.5.3 Évaluation de la réponse vaccinale contre le tétanos.....	60
2.6 Évaluation de la capacité des lymphocytes B mémoires à sécréter des IgG spécifiques au TTCF par ELISpot	61
2.6.1 Élaboration des contrôles et des paramètres d'expérimentation.....	61
2.6.2 Stimulation des PBMC	62
2.6.3 Préparation de la plaque ELISpot	62
2.6.4 Mise en plaque des PMBC.....	63

2.6.5 Révélation	63
2.6.7 Lecture de la plaque	64
2.7 Analyse des données	64
2.7.1 Analyse et expression des données de cytométrie	64
2.7.2 Analyse des données d'ELISpot	65
2.7.2 Analyse de la corrélation des valeurs de cytométrie et d'ELISpot	67
Chapitre 3 : Résultats	68
3.1 Problématique relative aux fluorochromes APC-H7 et PE-Cy7	68
3.2 Immunophénotypage du compartiment lymphocytaire B	70
3.2.1 Caractérisation du profil lymphocytaire B des enfants ENI en fonction du zénith de la virémie maternelle en grossesse	70
3.2.2 Caractérisation du profil lymphocytaire des enfants ENI en fonction du nadir du compte de CD4 maternel en grossesse	75
3.3 Analyse des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos	80
3.3.1 Spécificité du marquage	80
3.3.2 Fréquences des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos en fonction du zénith de la virémie maternelle en grossesse	81
3.3.3 Fréquences des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos en fonction du nadir du compte de CD4 maternel en grossesse	82
3.4 Évaluation de la capacité des lymphocytes B mémoires à sécréter des IgG spécifiques au TTCF après stimulation <i>in vitro</i>	87
3.4.1 Validation de la fonctionnalité des réactions et de la spécificité du TTCF en ELISpot	87
3.4.2 Nombre de lymphocytes B mémoires sécrétant des IgG spécifiques au tétanos en fonction du nadir de la charge virale maternelle en grossesse	90
3.4.3 Nombre de lymphocytes B mémoires sécrétant des IgG spécifiques au tétanos en fonction du nadir du compte de CD4 maternel en grossesse	90
3.4.4 Analyse de la corrélation des valeurs de cytométrie et d'ELISpot	94
Chapitre 4 : Discussion	95
4.1 Évaluation du profil lymphocytaire B	95

4.2 Analyse de la réponse vaccinale contre le tétanos	103
4.3 Limitations de l'étude	109
4.3.1 Analyse statistique des données.....	109
4.3.2 Classification des enfants ENI.....	110
4.3.3 Comparaison des enfants ENI avec un groupe témoin	111
4.3.4 Technique de détection des lymphocytes B spécifiques à un antigène	112
4.3.5 Validité statistique des sous-populations rares spécifiques au TTCF.....	114
4.4 Perspectives.....	115
4.4.1 Évaluation de la réponse vaccinale contre d'autres pathogènes	115
4.4.2 Détermination de la présence d'une réponse humorale contre des composantes antigéniques du VIH	115
4.4.3 Expression de marqueurs d'activation et d'épuisement dans le compartiment lymphocytaire B.....	116
4.4.4 Évaluation des marqueurs d'inflammation chez l'enfant ENI et de l'environnement placentaire.....	117
Chapitre 5 : Conclusion	119
Bibliographie.....	i
Annexe I : Mise au point détection de lymphocytes B spécifiques à la gp120 par cytométrie en flux	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Profil clinique des enfants ENI et informations relatives à leur naissance	45
Tableau II.	Profil démographique et clinique des mères des enfants ENI	46
Tableau III.	Programme québécois d'immunisation durant la première année de vie.....	48
Tableau IV.	Panneau d'anticorps monoclonaux conjugués et des réactifs utilisés pour l'immunophénotypage lymphocytaire B.....	57
Tableau V.	Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse	71
Tableau VI.	Fréquences des lymphocytes B matures IgM ⁺ chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse	73
Tableau VII.	Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse	76
Tableau VIII.	Fréquences des lymphocytes B matures IgM ⁺ observés chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse	78
Tableau IX.	Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse	83
Tableau X.	Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse	85
Tableau XI.	Nombre absolu et fréquence relative des cellules formant des spots chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle et du nadir du compte de CD4 en grossesse.....	91

Liste des figures

Figure 1. Modèle hiérarchique classique de l'hématopoïèse	2
Figure 2. Développement précoce des lymphocytes B en relation avec la recombinaison somatique de leur récepteur	3
Figure 3. Cheminement de différenciation T-dépendant des lymphocytes B matures	7
Figure 4. Répartition relative mondiale, en 2017, des nouvelles infections par le VIH au sein des populations à risques	8
Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1.....	12
Figure 6. Évolution clinique d'une infection typique par le VIH en absence de traitements antirétroviraux.....	15
Figure 7. Moment estimé de la survenue de la transmission verticale du VIH chez une femme en absence de toute intervention.....	21
Figure 8. Cinétique des anticorps maternels acquis passivement au cours de la grossesse et de l'allaitement chez l'enfant.....	38
Figure 9. Représentation globale de la cohorte d'enfants ENI et des expériences d'immunophénotypage B et d'ELISpot effectuées.....	47
Figure 10. Plasmide pET41(a)+ avec l'insertion BirA	51
Figure 11. Représentation des différentes étapes de production, biotinylation et purification du fragment C du toxoïde tétanique.....	54
Figure 12. Stratégie d'analyse hiérarchique des sous-populations lymphocytaires B	58
Figure 13. Établissement des barrières des sous-populations lymphocytaires B.....	59
Figure 14. Équation relative à l'évaluation de la variabilité observée au sein des répliques techniques d'ELISpot.....	67
Figure 15. Représentation du découplage des anticorps APC-H7 et PE-Cy7 dans le cadre de l'immunophénotypage B.....	69
Figure 16. Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse	72
Figure 17. Fréquences des lymphocytes B matures IgM ⁺ chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse.....	74

Figure 18. Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse	77
Figure 19. Fréquences des lymphocytes B matures exprimant l'IgM chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse	79
Figure 20. Comparaison des fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF avant et après immunisation contre le tétanos	81
Figure 21. Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse	84
Figure 22. Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse	86
Figure 23. Aspect visuel des réactions d'ELISpot pratiquées chez les contrôles et les enfants ENI pour l'énumération des lymphocytes B sécrétant des IgG	89
Figure 24. Nombre et fréquence relative des cellules formant des spots spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle et du nadir du compte de CD4 en grossesse.....	92
Figure 25. Nombre de cellules formant des spots chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle et du nadir du compte de CD4 en grossesse	93
Figure 26. Corrélation des lymphocytes B mémoires $IgM^- TTCF^+$ et du nombre de cellules formant des spots spécifiques au TTCF.....	94
Figure 27. Probabilité d'obtenir une comparaison avec une valeur p significative en fonction du nombre de tests indépendants effectués.....	109

Liste des sigles et abréviations

3

3TC : Lamivudine

A

ADNmt : ADN mitochondrial

AF700 : Alexa Fluor 700

AID: *activation-induced cytidine deaminase*

APC : Allophycocyanine

ARV : Agent antirétroviral

AZT : Zidovudine

B

BAFF : *B-cell activating factor*

BC : Colombie-Britannique

BCIP/NBT : 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate et nitro blue tetrazolium chloride

BV421 : Brilliant Violet 421

C

CA : Californie

CBMC : *Cord blood mononuclear cell*, Cellule mononucléée du sang de cordon

CCR5 : C-C chemokine receptor type 5, Récepteur de chimiokine CC de type 5

CD : Cluster de différenciation

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

CFS : Cellule formant des spots

CHU : Centre hospitalier universitaire

CMIS : Centre maternel et infantile sur le SIDA

CLP : *Common lymphoid progenitor*, Progéniteur lymphoïde commun

CMP : *Common myeloid progenitor*, Progéniteur myéloïde commun

CPD : Citrate phosphate dextrose

CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale

CRP : *C-reactive protein*, Protéine C réactive

CSA : Cellules sécrétrices d'anticorps

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CTL : Contrôle

CV : Charge virale

CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*, Récepteur de chimiokine CXC de type 4

D

DE : Allemagne

DIN : Drug identification number

DK : Danemark

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E

EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid*, Acide éthylène diamine tétraacétique

ENI : Exposé non infecté

F

FcRL4 : *Fc receptor-like protein 4*

FITC : *Fluorescein isothiocyanate*, Isothiocyanate de fluorescéine

FMO : *Fluorescence Minus One*

FRET : *Förster resonance energy transfer*

G

GCRSE : Groupe canadien de recherche sur le Sida chez les enfants (GCRSE)

H

HARSAH : Homme ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes

HFS : *HIV-free survival*

HRP : *Horseradish peroxidase*, Peroxydase de raifort

HSC : *Hematopoietic stem cell*, voir CSH

I

IFN- γ : Interféron- γ

Ig : Immunoglobuline

IgH : *Immunoglobulin heavy chain*, Chaîne lourde de l'immunoglobuline

IgL : *Immunoglobulin light chain*, Chaîne légère de l'immunoglobuline

IL : Interleukine

INNTI : Inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase inverse

INTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IRIC : Institut de recherche en immunologie et en cancérologie

ITBI : inhibiteurs du transfert de brin de l'intégrase

L

LB : *Lysogeny broth*, Bouillon de lysogénie

LIF : *Leukemia inhibitory factor*, Facteur inhibiteur de leucémie

LPV/r : lopinavir/ritonavir

LT-HST : *Long-term hematopoietic stem cell*, Cellule souche hématopoïétique de longue durée

M

MA : Massachusetts

MES : acide 2-(N-morpholino) ethanesulfonique

MO : Missouri

MPP : *Multipotent progenitor*, Progéniteur multipotent

MSIP: MultiScreen-IP

N

NC : *North Carolina*, Caroline du Nord

NK : *Natural killer*

NVP : Névirapine

O

OH : Ohio

OMS : Organisation mondiale de la santé

ON : Ontario

OR : Oregon

P

pb : paire de bases

PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*, Cellule mononucléée du sang périphérique

PBS : *Phosphate buffered saline*, Tampon phosphate salin

PE : Phycoérythrine

PerCP : Périidine-Chlorophylle-Protéine

PRDM1 : *PR domain zinc finger protein 1*

PVDF : *Polyvinylidene difluoride*, Difluorure de polyvinylidène

PVVIH : Personne vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine

Q

QC : Québec

R

R10 : Milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et de 0,1% de gentamicine à 50 mg/ml

R848 : Résiquimod

RAG : *Recombination-activating gene*

RANTES : *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

RCB : Récepteur des cellules B

RLT : Raltegravir

RPMI : Milieu Roswell Park Memorial Institute 1640

RS : Recombinaison somatique

S

SAPE : Streptavidine conjuguée à la phycoérythrine

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SLC : *Surrogate light chain*, Chaîne légère de substitution

SOGC : Société des obstétriciens et gynécologue du Canada

SRIF : Syndrome de réponse inflammatoire fœtale

STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*

ST-HST : *Short-term hematopoietic stem cell*, Cellule souche hématopoïétique de courte durée

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TAHA : Traitement antirétroviral hautement actif

TAR : Thérapie antirétrovirale

TLR : *Toll-like receptor*, Récepteur de type Toll

TNF : *Tumor necrosis factor*, Facteur de nécrose tumorale

TTCF : *Tetanus toxin C fragment*, Fragment C du toxoïde tétanique

U

UDI : Utilisateur de drogues injectables

V

VA : Virginie

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VL : Viral load

À mes très chers parents, Nicole et Robert

À mon unique amour, Frédéric

Remerciements

Il y a probablement autant de pages dans ce mémoire que de personnes sans lesquelles ce projet n'aurait pas pu être réalisé. Que vous ayez été impliqués directement ou indirectement, j'espère que vous éprouvez une fierté à avoir permis de mener à bon port toutes ces années de travail qu'a nécessité cette étude. Je voudrais d'abord souligner l'implication fort appréciée de toutes les mamans et leur famille à ce projet de recherche. Que vous ayez accouché de jour ou de nuit, votre participation à cette étude a permis de faire progresser nos connaissances sur la santé de vos enfants et de pouvoir aspirer à adapter plus adéquatement les soins qui leur sont fournis.

Merci Catherine de m'avoir transmis avec brio toutes les connaissances qu'exigeait la prise en charge du projet et des procédures expérimentales. J'ai grandement apprécié ton soutien inconditionnel et ton intérêt persistant pour les avancées de l'étude. J'aimerais également saluer le travail formidable de Martine Caty qui est, à vrai dire, l'un des piliers les plus importants dans le soutien de tous les projets de recherche au sein du laboratoire. J'espère que tu te rends compte que tu nous as tous permis de grandir, de devenir les scientifiques que nous sommes aujourd'hui et de développer un savoir-vivre extraordinaire. De plus, je souhaite exprimer ma reconnaissance envers tous les autres membres de l'équipe de laboratoire et de l'équipe du CMIS : Silvie Valois, Audrée Janelle-Moncalm, Suzanne Taillefer, Dr Marc Boucher, Dre Fatima Kakkar, Dre Isabelle Boucoiran, Dr Normand Lapointe, Ariane Larouche, Dre Insaf Salem Fourati, Dre Doris Ransy et Hinatea Dieumegard. Vous avez rendu mon travail plus agréable, plus facile et surtout plus jovial.

J'aimerais faire une mention spéciale à Dre Armelle Le Campion pour son support extraordinaire tant sur le plan expérimental que personnel. Il fallait toujours prévoir une heure de libre quand on t'appelait, mais c'était loin d'être du temps perdu. Je suis extrêmement reconnaissante de toutes les heures que tu as passées à tenter d'élucider les mystères du monde

de la cytométrie à mes côtés et d'avoir été là pour nous écouter chialer et nous encourager à persévérer et à toujours essayer de nouvelles avenues.

Hugo, vous possédez une passion hors du commun et précieuse pour la recherche. Merci de m'avoir permis d'acquérir une si belle formation scientifique et des connaissances aussi vastes sur l'univers pédiatrique du VIH malgré votre horaire chargé. Vos multiples plaisanteries m'ont permis de me souvenir qu'il est possible d'entremêler absurdité, folie et science. Vous me direz peut-être que je n'avais besoin que de Kim pour cela, mais vous y avez été pour beaucoup.

N'oublions pas de souligner l'aide précieux de nos collaborateurs : Dr Étienne Gagnon (IRIC, Montréal, QC), Dr Kai Wucherpfenning (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) et Dr Andrés Finzi (CRCHUM, Montréal, QC). Merci également aux organismes subventionnaires : le Fonds de recherche du Québec-Santé pour la remise de ma bourse de maîtrise et l'Institut de recherche en santé du Canada pour le financement du projet *Cellular Aging and HIV Comorbidities in Women and Children*.

La recherche, c'est d'abord et avant tout une question de travail d'équipe, de rigueur et d'assiduité et de résilience, mais on oublie trop souvent que ce qui nous permet de continuer à avancer malgré les dures épreuves, ce sont des amis et une famille attentionnés. Pour cette raison, j'aimerais remercier mes parents, Nicole et Robert, qui se sont fait tant de soucis pour moi tout au long de mes études. Papa, tes millions de niaiseries ont été un témoignage très précieux de ton amour et de ton support. Elles m'ont permis de garder le sourire même dans les périodes les plus difficiles et de me rappeler que j'avais une famille extraordinaire derrière moi. N'oublie pas! J'obtiendrai un diplôme en microbiologie et immunologie et non pas en biochimie. Maman, merci d'avoir tant pris soin de moi durant mon parcours scolaire. Que ce soit les innombrables encouragements, les soupers réconfortants ou les virées au IKEA, toutes ces petites attentions ont été une belle preuve de ton amour inconditionnel. Une pensée à ma

grand-maman qui a toujours trouvé que ça n'avait pas d'allure de passer autant de temps à étudier. Ça n'avait peut-être pas d'allure, mais j'ai réussi à passer au travers!

Julyyyyyy, tes cookies ont été une source de réconfort inestimable. Je te promets qu'il n'y aura pas de choucroute pour notre prochain anniversaire; je te dois bien cela!

Kim, merci pour toutes ces conneries, pour ces rires d'origine humaine et « hyènique », pour ces chansons farfelues. Tu as souvent été la raison pour laquelle je me levais le matin pour aller au labo. Surtout, merci de m'avoir permis d'être moi-même et d'avoir participé si fidèlement à ma folie quotidienne. Je suis très reconnaissante de te compter parmi mes amis.

Finalement, j'aimerais faire une mention très spéciale à la personne qui m'a brillamment soutenue à travers tous les épisodes de découragement, de fatigue extrême et de pleurs au cours des dernières années. Fred, sans toi, le parcours n'aurait pas simplement été périlleux, mais impossible à poursuivre. Merci de m'avoir encouragée, merci d'avoir sacrifié toutes ces heures de sommeil en m'accompagnant au laboratoire en pleine nuit et en restant à mes côtés durant mes longues heures de travail. Tu es une personne incroyablement aimante, apaisante, dévouée et soucieuse du bien-être des autres. Je suis extrêmement chanceuse de t'avoir dans ma vie et ne doute jamais de tout l'amour que j'ai pour toi.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Compartiment lymphocytaire B

1.1.1 Développement précoce

L'ontogénie des lymphocytes B est un processus séquentiel complexe qui fait intervenir de nombreux précurseurs découlant originellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de longue durée nichant au sein de la moelle osseuse ou de la rate fœtale et ayant la capacité de se renouveler (revu dans^{1,2}). Ces CSH de longue durée donnent, par le biais de plusieurs intermédiaires, naissance aux ancêtres de tous les lymphocytes nommés « progéniteurs lymphoïdes communs » (CLP, *Common lymphoid progenitor*). De ces derniers découlent les lymphocytes T et B, ainsi que les cellules *Natural Killer* (NK) (Fig.1). Certains rapportent aussi que les CLP pourraient, au même titre que le progéniteur myéloïde commun (CMP, *Common myeloid progenitor*), contribuer au développement des cellules dendritiques (revu dans³).

Lorsque les CLP s'engagent dans la différenciation lymphocytaire B, ils passent par une série d'étapes de développement durant lesquelles les processus de recombinaison somatique (RS) du récepteur des cellules B (RCB) et de sélection des clones avec un RCB fonctionnel surviennent (Fig.2). Il en émane des cellules B dites immatures qui évolueront en lymphocytes transitionnels et qui quitteront la moelle osseuse pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires où se fera l'interaction avec leur antigène d'intérêt.

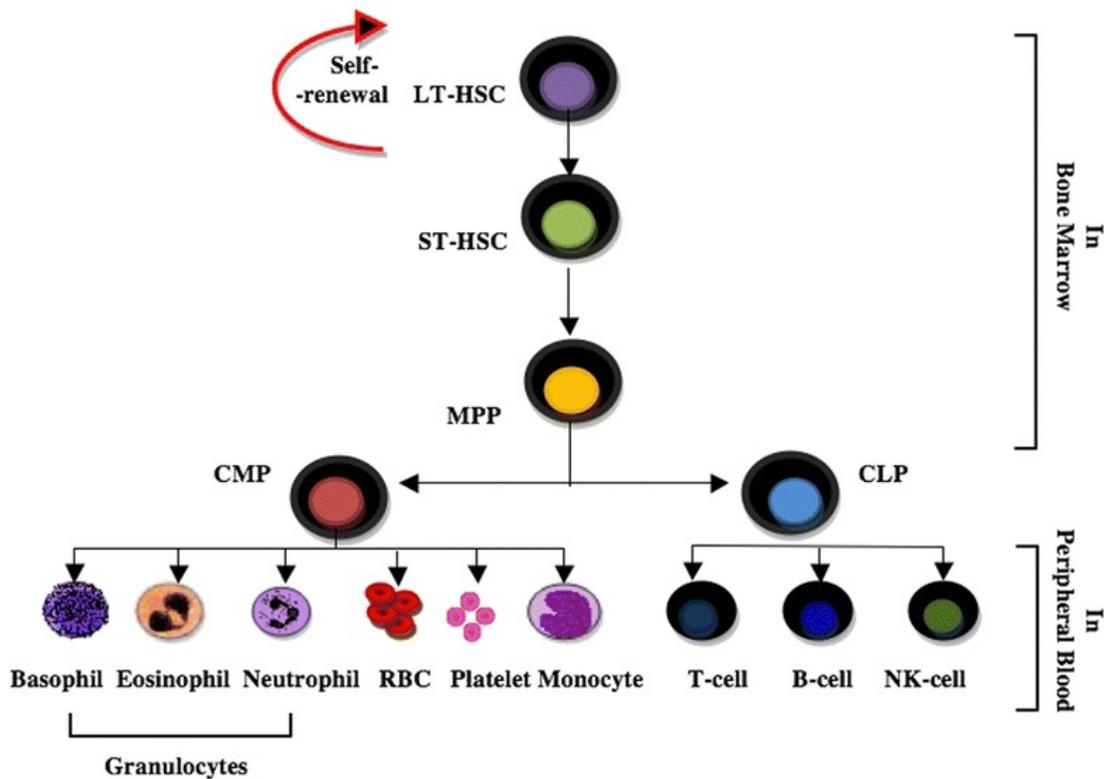
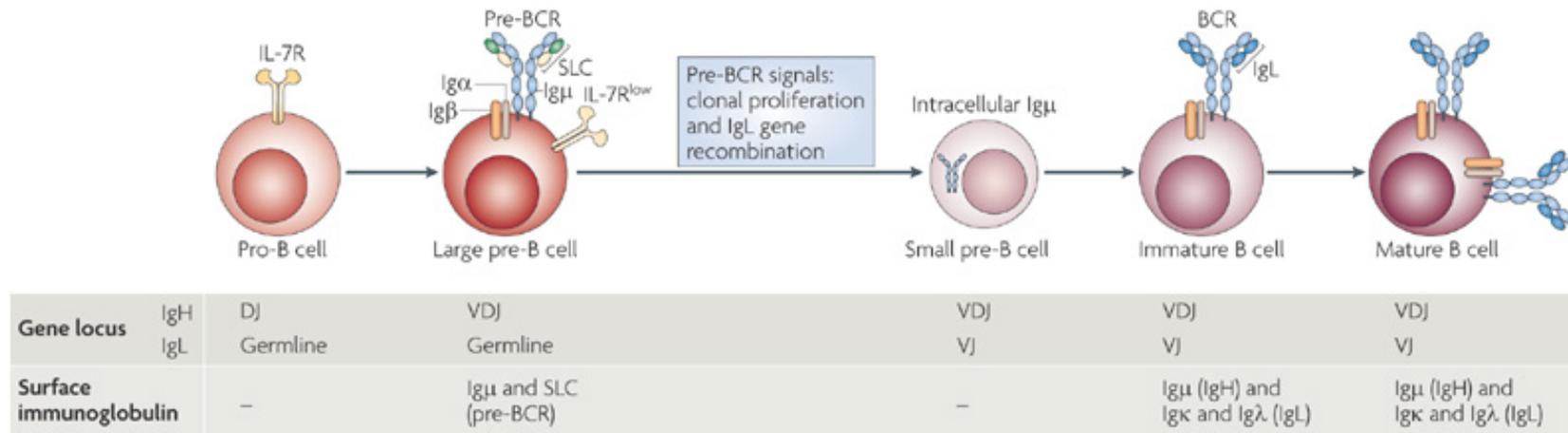


Figure 1. Modèle hiérarchique classique de l'hématopoïèse

Note : Originellement, les lymphocytes B proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC, *Hematopoïetic Stem Cell*) au sein de la moelle osseuse. Ces HSC sont divisés à deux sous-types : les HSC de longue durée (LT-HSC, *Long-term HSC*) et les HSC de courte durée (ST-HSC, *Short-term HSC*). Pour générer des lymphocytes B, les LT-HSC évoluent d'abord en ST-HSC qui sont distinguables de leurs prédécesseurs par une capacité plus restreinte à se renouveler. Ensuite, les ST-HSC perdent toute capacité de s'autorenouveler en se différenciant en progéniteurs multipotents (MPP, *multipotent progenitor*). Ces derniers s'engagent soit dans la lignée lymphoïde (CLP, *Common lymphoid progenitor*) ou dans la lignée myéloïde (CMP, *Common myeloid progenitor*). Les CLP donnent naissance aux lymphocytes sous l'influence de l'IL-7 et aux cellules Natural Killer (NK) (revu dans^{1, 2}). **Source :** Bakhuraysah MM, Siatskas C, Petratos S. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it a clinical reality? *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:12. *Figure en libre accès :* <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>



Nature Reviews | Immunology

Figure 2. Développement précoce des lymphocytes B en relation avec la recombinaison somatique de leur récepteur

Note : La recombinaison somatique (RS) est le mécanisme permettant l'expression d'un récepteur des cellules B (RBC) fonctionnel. Ce processus consiste en un réarrangement des chaînes légères (IgL) et lourde (IgH) des Ig au niveau de leurs régions variables (V), diversité (D) (absents pour la chaîne légère) et jonction (J). La recombinaison de ces gènes est effectuée dans un ordre très précis par les endonucléases *Recombination-Activating Gene* (RAG) issues des gènes *Rag1* et *Rag2*⁴ (revu dans⁵). Le réarrangement entre les segments D et J des IgH se fait au stade pré-pro B (non illustré). Une fois cette étape complétée, la cellule pré-pro B devenue pro-B subissent une recombinaison entre les segments V et DJ de ses IgH. Si cette recombinaison est productive, la cellule devient pré-B. Le stade pré-B est divisé en deux périodes de maturation nommées, soit la période large et la période petite. Durant le premier épisode, les protéines Rag1 et Rag2 sont inhibées et il y a l'expression du pré-BCR qui est composé de deux Ig μ tout juste assemblées combinées à deux chaînes légères de substitution (SLC, *Surrogate light chain*) qui sont reliées aux sous-unités protéiques Ig β et Ig α . Si la signalisation par ce complexe est compétente, la cellule connaît une prolifération clonale et progresse ensuite en phase pré-B large. Durant celle-ci, l'activité de RAG reprend, menant au réarrangement des segments de l'IgL. Une fois la recombinaison productive, il y a l'expression en surface du BCR constitué d'Ig λ de type Ig κ ou Ig λ et d'Ig μ reliés par des ponts disulfures et une évaluation de sa tolérance centrale avec les antigènes présents dans la moelle osseuse est enclenchée. Si le RCB est autoréactif, la cellule connaît un autre cycle de réarrangement des IgL ou l'apoptose. À la fin de tout ce mécanisme, la cellule devient immature et peut quitter la moelle osseuse (revu dans⁵⁻⁷). **Source :** Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. Nature reviews Immunology. 2009;9(3):195-205, copyright 2009, (licence : 4164261211092)

1.1.2 Développement tardif des lymphocytes B

Bien que les cellules transitionnelles se retrouvent en périphérie, elles sont également en forte concentration dans la moelle osseuse et ainsi, il n'y a pas une relation d'exclusion entre les cellules B immatures et transitionnelles concernant leur emplacement. Somme toute, cette population cellulaire, originellement décrite chez l'hôte murin, semble faire le pont entre la classe immature et la classe naïve⁸. Plus précisément, ces lymphocytes se divisent en deux sous-populations, soit les lymphocytes T1 qui sont caractérisés par la faible expression du cluster de différenciation (CD) 21 et d'IgD, et les lymphocytes T2 qui affichent fortement ces marqueurs⁹. À première vue, il semble que les lymphocytes T1 soient moins matures que les lymphocytes T2 en raison de leur capacité restreinte de prolifération et de sécrétion d'anticorps⁹. Puisque l'on retrouve tant des cellules T1 que des cellules T2 au sein de la moelle osseuse, il est possible que le premier groupe puisse se différencier au sein de cet environnement avant d'en sortir¹⁰. Quoi qu'il en soit, en périphérie, les lymphocytes B transitionnels connaissent des cycles d'évaluation pour déterminer s'ils produisent ou non des anticorps dirigés contre le soi^{9, 11, 12}. Notons qu'une troisième sous-population, les lymphocytes T3, est observable dans le compartiment B, mais la relation entre ces cellules, celles B naïves et les lymphocytes T1/T2 n'est pas encore tout à fait claire (revu dans¹³). Contrairement aux deux autres, les cellules B T3 expriment très peu CD38 et CD24 et pas du tout CD10 (revu dans^{10, 14}).

Une fois les tests d'autoréactivité réussis, les lymphocytes transitionnels transitent vers les organes lymphoïdes secondaires pour continuer leur différenciation (Fig.3). C'est au sein de ces organes qu'ils forment le répertoire lymphocytaire B naïf¹⁴. Les lymphocytes B naïfs qui sont IgM⁺ et IgD⁺ amorcent leur séjour dans la zone folliculaire des organes lymphoïdes secondaires où ils y rencontreront ou non l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Dans le cheminement classique, une fois que les lymphocytes B naïfs trouvent leur antigène, ce dernier est internalisé et dégradé en peptides pour être de nouveau exposé à la surface cellulaire en étant associé au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Ainsi, les cellules B naïves peuvent présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T qui ont été

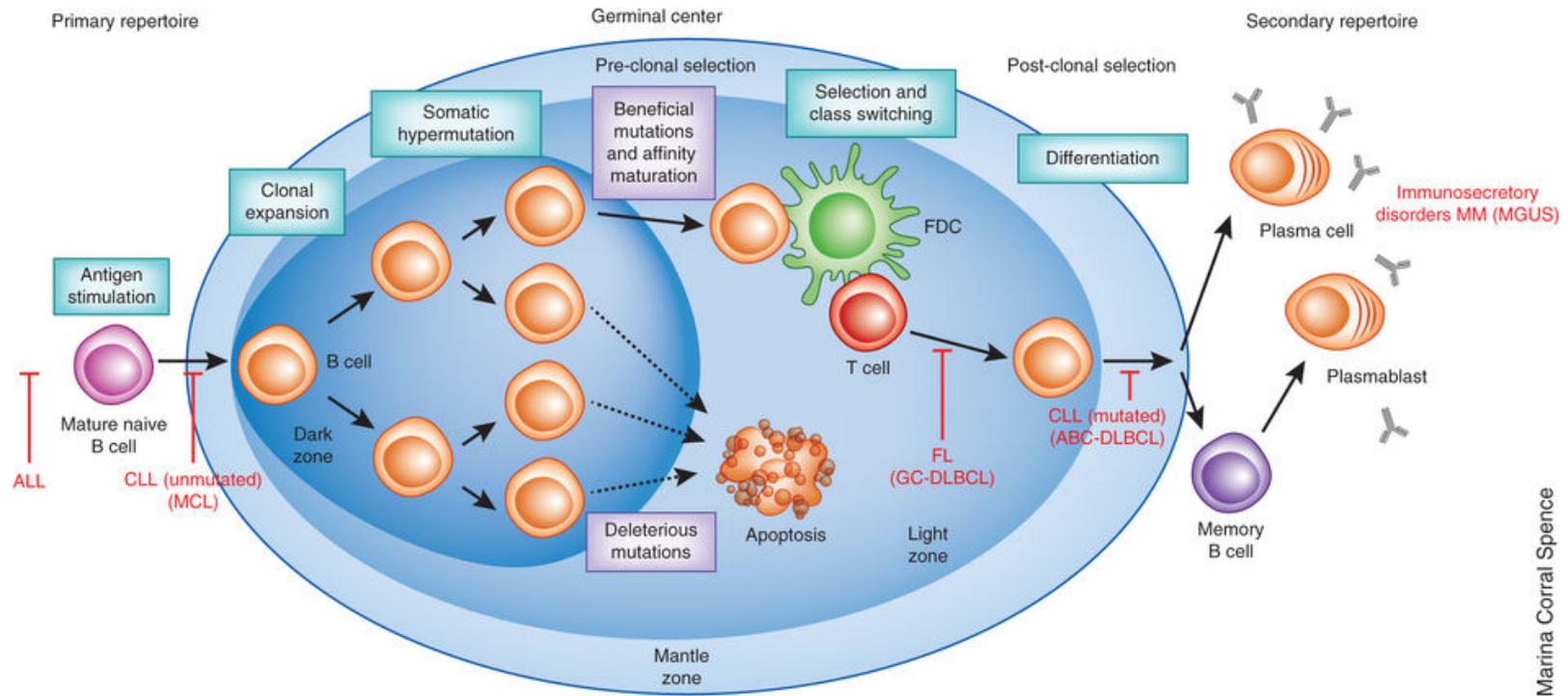
également stimulés par le même déterminant. Cette rencontre a lieu à la frontière des zones T et B de l'organe lymphoïde secondaire. La reconnaissance du peptide par les cellules T activées permettra l'interaction CD40/CD154, ce qui engage une voie de signalisation menant à une prolifération cellulaire des lymphocytes B naïfs activés (revu dans¹⁵).

Une fraction des cellules B naïves activées ayant proliféré devient des plasmablastes avec une faible affinité pour l'antigène. Une autre portion devient des lymphocytes B mémoires IgM⁺ et les cellules ayant la meilleure affinité pour le déterminant antigénique entreprendront la différenciation dépendante des centres germinatifs. Au sein de cette structure, les lymphocytes B naïfs activés connaîtront une expansion clonale qui est suivie d'une hypermutation somatique du RCB (revu dans¹⁵). Ce processus consiste à induire des mutations dans régions variables des RCB, ce qui mène soit à une augmentation de l'affinité du récepteur pour son antigène, soit à une perte de l'affinité ou encore à une dysfonction de celui-ci (revu dans¹⁶). Lors de la sélection positive, les cellules n'ayant pas une haute affinité pour leur antigène sont forcées de reprendre le processus d'hypermutation somatique ou elles sont éliminées par apoptose (revu dans¹⁵).

Parallèlement à l'hypermutation somatique, le RCB subit une seconde modification nommée « commutation de classe ». Celle-ci permet de faire transiter le RCB qui était jusqu'à présent d'isotype IgM et IgD vers un isotype IgA, IgE ou IgG. L'isotype IgG est le plus communément retrouvé en périphérie et il représente entre 10 % et 20 % des protéines du plasma¹⁷. Il joue un rôle important dans la cascade du complément ainsi que dans l'acquisition de l'immunité passive du bébé puisqu'il est capable de traverser la barrière placentaire (revu dans¹⁸). Les IgA se retrouvent surtout au niveau des muqueuses où elles assurent leur protection contre des pathogènes viraux et bactériens ainsi que contre les toxines en les neutralisant ou en empêchant leur adhésion aux muqueuses. Il s'agit aussi de l'isotype retrouvé dans le lait maternel (revu dans¹⁸). Quant aux IgE, elles sont impliquées dans les réactions d'hypersensibilité et dans la protection contre les helminthes (revu dans¹⁸).

Suite au séjour dans le centre germinatif, les cellules B se différencient en plasmablastes, en cellules mémoires ou encore en plasmocytes de longue durée qui sont majoritairement d'isotype IgG (revu dans¹⁹). Les plasmocytes retourneront dans la moelle osseuse où ils resteront et sécrèteront des anticorps à un niveau basal même en absence de pathogènes (revu dans²⁰). D'ailleurs, ces anticorps sécrétés constituent le premier front de défense lorsqu'une pathogène fait surface. Quant aux cellules B mémoires qui sont déjà expérimentées, elles pourront rapidement réagir en sécrétant une concentration élevée d'anticorps si elles rencontrent à nouveau le pathogène pour lequel elles sont spécifiques. De plus, pour les lymphocytes B mémoires ayant subi une hypermutation somatique et un changement de classe, les anticorps sécrétés auront une meilleure affinité que lors de la réponse primaire (revu dans¹⁶).

Outre ce cheminement classique de différenciation dite « T-dépendante », les lymphocytes B naïfs peuvent aussi être activés par un antigène et se différencier sans l'aide d'une cellule T en dehors des centres germinatifs. Cela a pour effet de laisser les lymphocytes B avec une RCB d'isotype IgM qui, n'ayant pas connu un processus exhaustif d'hypermutation somatique, a une moins grande affinité antigénique, mais une plus grande avidité grâce à leur disposition pentamérique (revu dans¹⁸). Cette voie de différenciation n'est habituellement entreprise qu'à la suite d'une activation par des antigènes non protéiques tels que les polysaccharides bactériens et elle permet de générer très rapidement des cellules sécrétrices d'anticorps (revu dans²⁰).



Marina Corral Spence

Figure 3. Cheminement de différenciation T-dépendant des lymphocytes B matures

Note : Dans la zone folliculaire B, les lymphocytes B naïfs peuvent interagir avec les cellules dendritiques chargées d'antigènes. Lorsqu'un antigène est reconnu par le RCB, il est internalisé, traité et il refait surface couplé à une molécule du complexe d'histocompatibilité humain de classe II. Les lymphocytes B peuvent alors être stimulés par les lymphocytes T activés par le même antigène via une interaction CD40/CD154. Ils migrent ensuite au centre germinatif où ils subissent une expansion clonale et une hypermutation somatique. Ce mécanisme consiste en l'induction de mutations par l'enzyme *activation-induced cytidine deaminase* (AID) dans les gènes des régions variables du RCB. Cela engendre soit une hausse de l'affinité du RCB, la perte de la spécificité ou encore une autoréactivité. Dans les deux derniers cas, les cellules B seront éliminées par apoptose ou renvoyées à une seconde ronde d'hypermutation somatique. Les lymphocytes B survivants peuvent par la suite subir une commutation de classe, suivie d'une différenciation en plasmablastes, en cellules B mémoires ou encore en plasmocytes de longue durée. Ces derniers retourneront dans la moelle osseuse et seront responsables de sécréter un niveau basal d'anticorps (revu dans^{15, 16, 20, 21}). De nombreuses maladies peuvent altérer le développement lymphocytaire B dans les organes lymphoïdes secondaires : les leucémies lymphoblastiques aiguë (ALL) et chronique (CLL), les lymphomes à cellules du manteau (MCL) et folliculaires (FL) comme les lymphomes B diffus à grandes cellules de type centrofolliculaire (GC-DLBCL) et de type activé B périphérique (ABC-DLBCL) et finalement les désordres associés aux myélomes multiples (MM) tels que la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS). **Source :** Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Biotechnology, Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, Busse CE, Wardemann H, Quake SR. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol.* 2014;32(2):158-68, copyright 2014 (licence : 4165010370683)

1.2 Virus de l'immunodéficience humaine

1.2.1 Survol de l'épidémiologie du virus de l'immunodéficience humaine

Qu'il ait été propagé par voie sexuelle, par utilisation d'équipement souillé servant à la consommation de drogues injectables ou à des soins médicaux ou encore qu'il ait fait l'objet d'une transmission verticale, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) touchait près de 36,7 millions de personnes en 2016²² avec une incidence de 2,1 millions d'infections²³.

Au sein d'une population, tous les individus ne sont pas exposés au même risque de contracter le VIH. Certains groupes comptent un nombre démesuré de personnes infectées, alors qu'ils ne représentent qu'un faible pourcentage de cette population. En outre, les jeunes femmes de 15 à 24 ans sont, à elles seules, représentées 20 % des nouveaux cas, alors qu'elles ne forment qu'une mince proportion de la population adulte mondiale²⁴. Cette vulnérabilité est entre autres causée par les inégalités sociales et sexuelles dont souffre cette communauté²⁴. Parmi les autres groupes à risque résident les utilisateurs de drogues injectables (UDI), les travailleurs du sexe, les hommes ayant des relations avec d'autres hommes (HARSAH), les personnes incarcérées et les individus transgenres²⁵ (Fig.4)

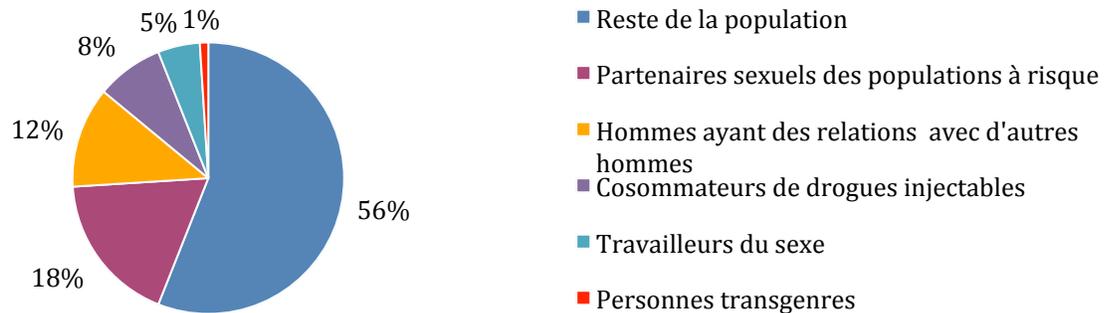


Figure 4. Répartition relative mondiale, en 2017, des nouvelles infections par le VIH au sein des populations à risques

Source : Les données employées sont issues du rapport UNAIDS Data 2017²⁶

En plus des disparités individuelles, il existe également une grande hétérogénéité entre les pays développés et ceux en développement. L'an dernier, alors que 2,1 millions d'individus résidant en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe centrale et occidentale étaient touchés par le VIH, l'Afrique orientale et australe était quant à elle la source de 19,4 millions de personnes vivant avec le VIH (PVVIH)²⁶. Pourtant, ces régions n'abritent qu'un peu plus de 6 % de la population mondiale. Parmi ces millions de personnes, on comptait 790 000 individus nouvellement infectés, ce qui représente près de 44 % des nouvelles infections à travers le monde²⁶.

Encore en 2016, seuls 76 % des individus séropositifs avaient connaissance de leur statut et 60 % d'entre eux ont eu accès à des agents antirétroviraux (ARV). De ces 60 %, la moitié a pu atteindre une suppression virale. En comparaison, en 2014 au Canada, 80 % des individus infectés par le VIH étaient au courant de leur état médical. De cette proportion, 76 % recevaient une thérapie antirétrovirale (TAR) et 89 % d'entre eux ont atteint une suppression virale²⁷. Bien que des efforts considérables soient encore nécessaires pour lutter contre le VIH, d'importants progrès ont été réalisés à travers la planète relativement à l'accès aux ARV, aux soins de santé et aux plans de prévention des infections. L'essor du déploiement des ARV, rendu possible grâce à des régimes de santé publique améliorés, à des programmes internationaux mis en place par des organismes tels que l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et au développement de nombreux médicaments²³, permet de rejoindre un nombre croissant de PVVIH. Ceci est d'une importance majeure dans la décroissance du nombre de décès associés au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui a d'ailleurs diminué de près de la moitié entre 2005 et 2015²⁶. Également, des efforts considérables dans la prévention des infections acquises par transmission verticale ont permis de limiter les nouveaux cas pédiatriques à 150 000 en 2015 comparativement à un bilan de 290 000 infections en 2010²⁴. Bien que la courbe globale du déclin de l'incidence du VIH tend à être très modeste depuis 2010, une baisse de plus de 50 % a été observée entre 2010 et 2015 dans le nombre d'enfants de moins de 15 ans nouvellement infectés²⁸. Conjointement à la disponibilité des traitements pédiatriques contre le VIH, cette diminution d'incidence a un effet prépondérant sur l'affaiblissement considérable de la mortalité liée au SIDA observé entre 2010 et 2016²⁶.

Au Canada, la prévalence du VIH a été évaluée à un peu plus de 0,2 % en 2014²⁹ avec une estimation révisée la même année à un peu plus de 65 500 PVVIH²⁷. Comparativement à 2011, ceci constitue une hausse de la prévalence qui peut s'expliquer à la fois par une incidence toujours existante bien qu'en perte d'intensité et par la réussite des TAR ainsi que du dépistage/diagnostic précoce menant à une amélioration de l'espérance de vie des individus infectés²⁹⁻³¹. Au même titre que dans de nombreux pays industrialisés, les UDI, les HARSAH ainsi que les personnes issues de régions où le VIH est endémique sont les populations avec la plus forte incidence d'infections³². De plus, les populations autochtones sont significativement plus touchées avec, en 2014, 10,8 % des nouveaux cas alors qu'elles ne représentent que 4,3 % des habitants du Canada²⁹.

1.2.2 Vue d'ensemble de la structure, de la réplication du VIH-1 et de la fonction des classes d'antirétroviraux

Le VIH-1 est inscrit au sein de la famille des *Retroviridae*. Il s'agit d'un virus dont le génome est constitué de deux molécules d'ARN identiques toutes deux simple brin. Ces dernières comprennent, au même titre que les autres virus de cette famille, les gènes *gag*, *pol* et *env* qui sont respectivement responsables des protéines de structures, des enzymes intégrase et transcriptase inverse et protéase et finalement des protéines de l'enveloppe gp41 et gp120. En plus de ces trois gènes, plusieurs gènes accessoires et régulateurs sont inscrits au sein du génome du VIH-1. Ces derniers comprennent *vif*, *vrp*, *vpu*, *nef*, *tat* et *rev* (revu dans³³⁻³⁶).

La particule virale est délimitée, au niveau externe, par une membrane comprenant une bi-couche lipoprotéique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines Env. Sous cette membrane se retrouvent d'une part une matrice qui est rattachée à la couche interne de l'enveloppe et d'autre part une nucléocapside qui renferme les molécules génomiques, la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéase ainsi que certaines protéines accessoires (revu dans³³⁻³⁶)

La glycoprotéine de l'enveloppe est composée de trois hétérodimères de gp120 et de gp41 liés de manière non covalente. La gp120 est considérablement glycosylée, comme en témoignent ses 25 sites de N-glycosylation (revu dans³⁷). Cette forte glycosylation permet à la fois d'assurer la protection des sites vulnérables du trimère contre une neutralisation par les anticorps^{38, 39} et de rendre la gp120 indiscernable des glycans présents dans l'hôte (revu dans⁴⁰). En ce qui concerne la gp41, ils s'agit de la sous-unité transmembranaire d'Env. Ensemble, la gp120 et la gp41 jouent un rôle fondamental dans le cycle de réplication du VIH-1 en permettant l'attachement et l'introduction du virus au sein, principalement, des lymphocytes T actifs exprimant le CD4, mais également des lymphocytes T CD4⁺ au repos, des monocytes, des cellules dendritiques et des macrophages (revu dans⁴¹). La gp120 a pour fonction de reconnaître le récepteur CD4 des lymphocytes T ainsi que les récepteurs de chimiokines CXC de type 4 (CXCR4, *C-X-C chemokine receptor type 4*) ou CC de type 5 (CCR5, *C-C chemokine receptor type 5*) agissant comme corécepteurs selon le tropisme viral. Quant à la gp41, elle médie la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule hôte à la suite à un changement de conformation du complexe protéique.

Une fois au sein de la cellule hôte, la décapsidation, la transcription du génome ARN en ADN s'exécutent au sein du cytoplasme. Le génome ADN, sous forme de complexe de pré-intégration, est ensuite transféré au niveau nucléaire où l'intégrase permet l'insertion de la séquence virale au sein du génome de la cellule hôte. Sous forme intégrée, le provirus peut ainsi être répliqué et transcrit en de multiples copies ARN, transporté au cytoplasme et traduit par machinerie cellulaire. Ainsi, de nouveaux virions immatures peuvent être assemblés et peuvent bourgeonner de la membrane cellulaire (revu dans^{33,35}) (Fig.5). S'en suit un processus de maturation durant lequel le précurseur Gag est scindé pour produire les multiples protéines Gag, soit les protéines p17, p24, p7 et p6 qui sont respectivement responsables de la matrice, de la capsid, de la stabilisation des dimères de l'ARN viral au niveau de la nucléocapsid et finalement de l'assemblage et la relâche des particules virales (revu dans³⁵)(Fig.5).

Plutôt que de procéder à la production de nouvelles particules virales, le VIH peut également adopter une forme latente qui contribue à la formation de réservoirs viraux,

notamment au sein des lymphocytes T CD4⁺ mémoires quiescents de longue durée, ainsi que dans les macrophages et des monocytes (revu dans⁴²). En absence d'une transcription active, le VIH peut être persistant malgré la présence d'ARV, sans compter que la localisation de plusieurs des réservoirs viraux les rend souvent réfractaires à la pénétration des TAR (revu dans⁴³). Ces réservoirs sont d'ailleurs ce qui explique pourquoi l'arrêt d'une TAR résulte en un rebond de la charge virale (CV) après une période plus ou moins longue⁴⁴.

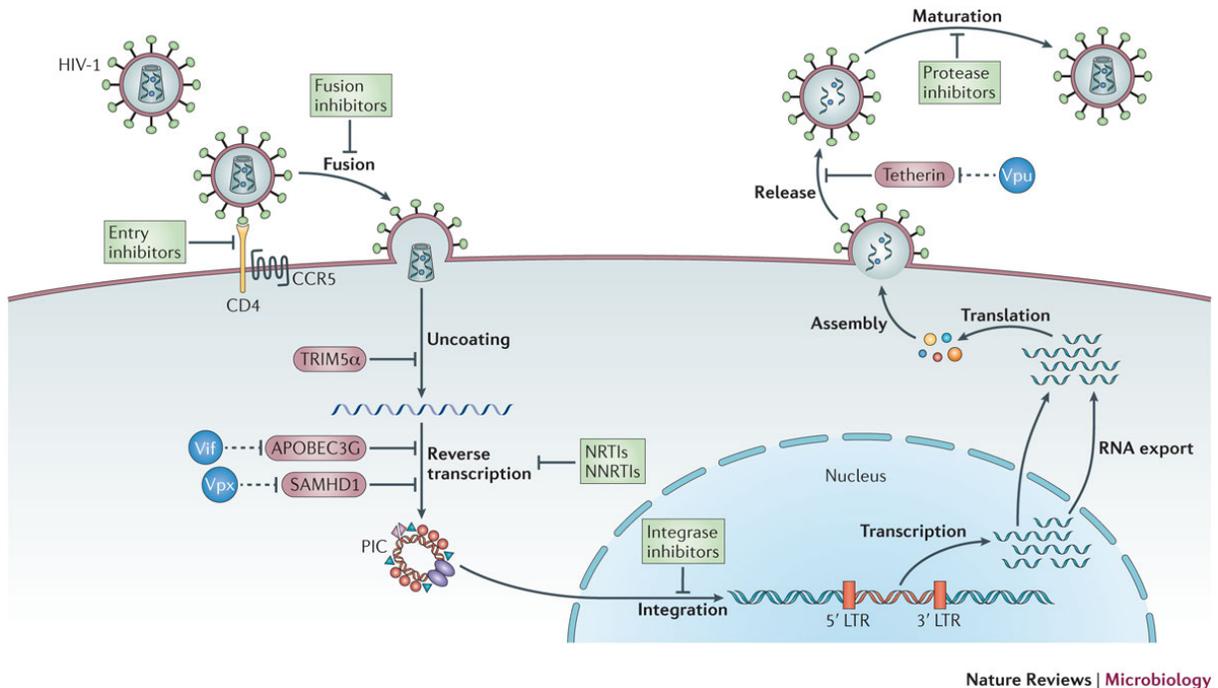


Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1

Note : Le cycle de réplication est initié lorsque la gp120 fait la reconnaissance du récepteur CD4 et du co-récepteur à la surface des cellules T CD4⁺, des monocytes, des cellules dendritiques et des macrophages (revu dans⁴¹). La gp41 induit alors la fusion membranaire, ce qui permet l'introduction du virus au sein de la cellule. S'en suivent la décapsidation et la transcription inverse du génome ARN viral. Cette étape peut être neutralisée par les inhibiteurs nucléosidiques ou non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI ou NNRTI). Par la suite, le génome ADN couplé au complexe pré-intégrateur (PIC) transite au noyau où il est intégré par l'intégrase virale au génome cellulaire. Son activité enzymatique peut toutefois être bloquée par les inhibiteurs du transfert du brin de l'intégrase. Dans le cas contraire, le provirus pourra être répliqué, transcrit et traduit par la machinerie cellulaire, après quoi de nouveaux virions pourront être assemblés et relâchés par bourgeonnement. Une fois relâché, le virus doit procéder à sa maturation en scindant le précurseur Gag pour former les protéines de structures (revu dans³³⁻³⁶).

Source : Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature reviews Microbiology, Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. Nature reviews Microbiology. 2013;11(12):877-83, copyright 2013, (licence 4153350937315)

Bien qu'une infection au VIH ne soit pas curable, un grand nombre de TAR sont aujourd'hui sur le marché et permettent de restreindre l'avancement de la maladie chez l'individu touché et de limiter sa transmission. Ces traitements agissent sur diverses cibles du cycle de réplication virale telles que la transcription de l'ARN viral en ADN, l'intégration de cet ADN viral au génome cellulaire et la maturation des particules virales immature en virus infectieux (Fig.5). De manière générale, la thérapie primaire standard est constituée d'une combinaison de trois ARV dont deux sont habituellement des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)⁴⁵. Ce type de régime s'est montré efficace pour atteindre une CV indétectable et la conserver ainsi chez une très grande majorité des individus respectant leur TAR (revu dans⁴⁶).

Malgré que les TAR fassent transiter l'infection au VIH d'un diagnostic mortel en une maladie chronique, elles ne permettent pas toujours de restaurer une fonction immunitaire adéquate (revu dans⁴⁷) et elles sont associées avec certains effets secondaires adverses comme une perte de la densité minérale osseuse⁴⁸⁻⁵⁰, le développement de maladies cardiovasculaires^{51, 52}, une exacerbation des dysfonctions rénales^{53, 54}, une dyslipidémie (revu dans⁵⁵) et de l'anémie⁵⁶⁻⁵⁸.

1.2.3 Physiopathologie du VIH

Généralement, l'infection par le VIH se décompose en trois phases à la suite de la séroconversion (Fig.6). Au cours de la première période, qui s'étend sur six à douze semaines, le virus entre d'abord dans une phase d'amplification au site d'infection durant une dizaine de journées, après quoi il devient détectable en raison de sa propagation systémique dans de nombreux organes lymphoïdes (revu dans^{34, 59}). Cette forte expansion se traduit par une virémie considérablement élevée et a pour conséquence une chute drastique du compte lymphocytaire T CD4⁺ (revu dans^{35, 41, 59}). Durant ce temps, une certaine proportion des individus infectés ressentent des symptômes tels que de la fièvre, des éruptions cutanées, de la fatigue et de l'adénopathie^{60, 61}.

Il s'ensuit une phase chronique qui débute par un déclin de la CV dû aux réponses immunitaires innée et adaptative de l'hôte (revu dans³⁴) (Fig.6). Ce déclin n'est que sporadique, puisqu'il y a subséquemment une augmentation graduelle de la virémie et une baisse des lymphocytes T CD4⁺ sur plusieurs années. La persistance virale mène à une inflammation quasi perpétuelle ayant pour effet de mettre en jeu l'intégrité des tissus lymphoïdes (revu dans³⁴) et d'épuiser la réponse lymphocytaire T (revu dans⁴¹).

La période de latence fait place au SIDA lorsque le compte de CD4 est de moins de 200 cellules/mm³. Dans un tel contexte, de multiples infections opportunistes causées en outre par *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Pneumocystis jirovecii* surviennent⁶². En ce qui concerne la tuberculose, bien que sa fréquence soit exacerbée par l'immunosuppression (revu dans⁶³), elle constitue un problème de santé majeur de manière précoce dans l'infection au VIH⁶⁴ en accélérant, en outre, la détérioration immunitaire (revu dans⁶³). À l'heure actuelle, elle est la première cause de mortalité chez les PVVIH au niveau mondial avec 400 000 décès enregistrés en 2016⁶⁵. L'Organisation mondiale de la santé souligne d'ailleurs que l'infection au VIH rend les individus 16 à 27 fois plus susceptibles de développer une tuberculose active comparativement à la population non infectée⁶⁶. Cette susceptibilité provient à la fois d'une réactivation augmentée des infections latentes, notamment dans le contexte du syndrome de reconstitution immunitaire suite à l'initiation des TAR, et d'un risque supérieur d'infection primaire et de réinfection (revu dans^{63, 67, 68}).

Quelque soient les infections opportunistes dont pourraient souffrir les PVVIH et les autres facteurs de risque relié à l'immunodéficience, l'atteinte de la phase sidatique suite à la contraction du VIH résulte en un risque de mortalité très élevé en absence d'intervention médical (revu dans⁶⁹).

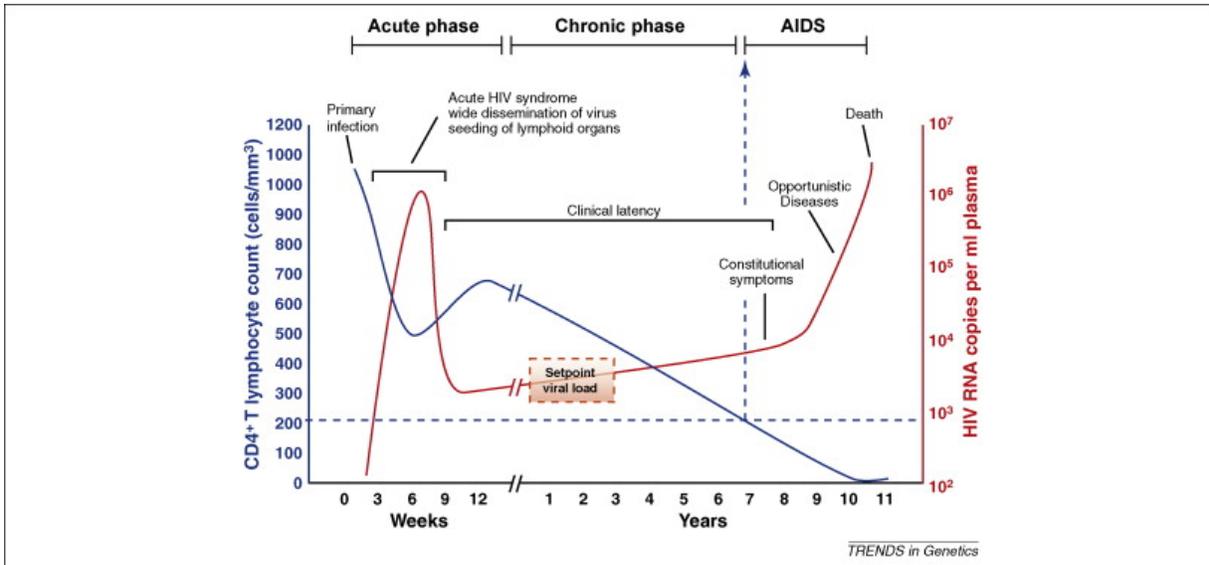


Figure 6. Évolution clinique d'une infection typique par le VIH en absence de traitements antirétroviraux

Note : Durant la phase aiguë, le virus s'amplifie au site d'infection, après quoi il se disperse de manière systémique, ce qui est perçu par une hausse de la virémie (revu dans^{34, 41, 59}). Au cours de la phase chronique qui peut s'étendre sur de nombreuses années, l'infection est dite latente ce qui n'implique toutefois pas une absence de la progression de la maladie. Bien au contraire, le compte de CD4 décroît tranquillement alors que la charge virale augmente progressivement (revu dans³⁴). Lorsque la concentration lymphocytaire T CD4⁺ atteint 200 cellules/mm³, la PVVIH est atteinte par le SIDA (AIDS) qui se caractérise par une grande susceptibilité aux infections opportunistes et qui mène à la mort de l'individu (revu dans⁶⁹). **Source :** Reprinted from Trends in Genetics, vol. 26, An P, Winkler CA, Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery, pp. 119-31, Copyright 2010, with permission from Elsevier (licence 4156200127841)

Bien que cette cinétique d'infection soit commune à beaucoup des PVVIH, elle connaît des variations en terme de vitesse de progression de la maladie. En effet, certaines personnes sont considérées comme des contrôleurs élités, signifiant qu'elles sont capables de maintenir leur CV en dessous de 50 copies/ml pour plus d'un an en absence de traitement⁷⁰. Moins de 0,5 % de la population infectée répond ainsi à l'infection par le VIH^{71, 72}. Par ailleurs, il existe les contrôleurs virémiques qui représentent moins de 1 % des gens infectés⁷¹. Ces individus sont en mesure de contenir leur virémie à de bas niveaux, soit généralement entre 200 et 2000 copies/ml, en absence de TAR⁷³, et ce, pour au moins un an⁷⁰. Ces deux groupes d'individus sont souvent intégrés au sein des personnes « asymptomatiques à long terme » qui sont caractérisées par une capacité à conserver, sans médication, un compte de CD4 constant et relativement élevé pendant de nombreuses années⁷³. Ces personnes ne présentent habituellement pas de symptôme clinique apparent et représentent de 5 % à 15 % des

personnes séropositives (revu dans⁷⁴). À l'inverse, certaines PVVIH progressent excessivement vite dans la maladie. Elles atteignent généralement un compte de CD4 associé au SIDA dans un très court délai à la suite de la séroconversion⁷⁵.

Ces cinétiques particulières de progression de la maladie sont causées par de nombreux facteurs qui ne sont pas encore tous connus. Plusieurs études ont permis d'éliminer sinon de discréditer l'idée que la capacité des PVVIH à contrôler leur virémie serait due à une infection par des souches déficientes (revu dans⁷⁶). Ce qui est certain, c'est que de multiples composantes génétiques et immunitaires sont impliquées (revu dans^{69, 73, 76}).

1.3 Impact du VIH sur la grossesse et son déroulement

1.3.1 Condition obstétricale et périnatale

En grossesse, l'infection au VIH ainsi que plusieurs aspects cliniques et socio-économiques peuvent engendrer des effets adverses sur le déroulement de la gestation et la condition maternelle et du nouveau-né. Il en résulte une morbidité et parfois même une mortalité plus importante tant chez le nourrisson que chez la mère⁷⁷ (revu dans^{78, 79}).

Dans une étude rétrospective menée aux États-Unis, il a été soulevé que les femmes enceintes vivant avec le VIH connaissaient plus fréquemment une rupture prématurée des membranes comparativement aux femmes non infectées⁷⁷. Dans un même ordre d'idée, leur statut séropositif a été associé avec un risque plus élevé de mettre au monde un enfant prématuré^{77, 80}. D'ailleurs, une méta-analyse menée par Xiao *et al.* a souligné que les femmes vivant avec le VIH avaient deux fois plus de risque d'accoucher avant 37 semaines de gestation. Pour expliquer ce phénomène, l'équipe a mis en cause l'immunosuppression, les déséquilibres immunitaires causés par l'infection ainsi que l'intégrité compromise du placenta⁸⁰. Le rôle des TAR et des traitements antirétroviraux hautement actifs (TAHA) dans la prématurité a cependant été écarté par cette équipe et d'autres groupes⁸¹, bien que d'autres

aient soulevé des liens possibles avec le moment d'initiation des TAR et avec la nature du régime d'ARV^{82, 83}. L'équipe de Palacio, quant à elle, a été en mesure de faire une association entre une expression plus élevée de CD14 solubles et de *lipopolysaccharide-binding proteins* (marqueurs inflammatoires attribués à la translocation microbienne) et le phénomène de prématurité. Ces marqueurs étaient exprimés de manière dominante chez les femmes infectées par rapport aux femmes saines dès le premier trimestre et constituaient un prédicateur significatif d'un accouchement avant terme⁸¹.

En plus des risques de prématurité, Arab *et al.* ont observé que les nouveau-nés connaissaient un retard de croissance intra-utérin⁷⁷, ce qui est associé avec un environnement pro-inflammatoire⁸⁴. Cela porte à croire que le débalancement de l'immunotolérance vu chez certaines femmes séropositives en est la cause. Dans la même optique, Xiao *et al.* ont souligné un faible poids à la naissance chez ces bébés. Les mêmes attributions que celles faites avec la prématurité ont été soutenues par l'équipe⁸⁰. Des associations entre ces issues adverses de la grossesse et certains paramètres relatifs à la nutrition maternelle ont été décrites par Mehta *et al.* en 2008. En effet, leurs travaux ont permis de mettre en valeur qu'un faible indice de masse corporelle chez la femme enceinte vivant avec le VIH était relié avec un risque plus élevé de prématurité et de faible poids à la naissance. Quant à l'anémie, problème très récurrent chez les PVVIH, elle était associée aux fausses-couches, à une mortalité élevée, à des accouchements prématurés et à un faible poids à la naissance⁸⁵. De plus, l'étude a révélé qu'un taux d'hémoglobines sous-optimal aggravait le risque de transmission verticale du VIH *in utero* et durant les premières semaines de vie⁸⁵. Certes, l'anémie et un indice de masse corporelle réduit sont aussi responsables d'effets adverses sur la grossesse et le nouveau-né en absence d'infection au VIH^{86, 87}. Or, la fréquence élevée de l'anémie chez les PVVIH (revu dans⁸⁸) et son impact sur le risque de transmission verticale font valoir l'importance de surveiller avec rigueur l'état nutritionnel des femmes enceintes séropositives, notamment dans les pays où les ressources et les suppléments alimentaires sont davantage limités.

Par ailleurs, les TAR ont été associées avec certaines pathologies durant la grossesse. Il a été démontré par Sansone *et al.* que les femmes vivant avec le VIH avaient un risque significativement plus grand de souffrir de prééclampsie que les femmes séronégatives⁸⁹. Certaines études ont établi un lien entre les troubles hypertensifs de la grossesse, dont fait partie la prééclampsie, et l'utilisation de TAHA^{89, 90}. Le TAHA amenant à une reconstitution de la fonctionnalité d'une réponse de type Th1, la prééclampsie pourrait découler d'une perte de l'immunotolérance fœtale (revu dans⁷⁸). Il en est d'autant plus intéressant qu'en absence de traitement, l'infection au VIH a pour impact de diminuer le risque de prééclampsie^{91, 92}. À titre informatif, une réponse Th1 se veut pro-inflammatoire par la nature des cytokines impliquées comprenant, en outre, l'interféron (IFN) γ , l'interleukine (IL) 2 et le facteur de nécrose tumorale (TNF, *Tumor necrosis factor*) β . Elle est déployée pour éliminer les pathogènes intracellulaires et est impliquée dans la réactions autoimmunes (revu dans^{93, 94}).

L'infection par le VIH stimule, chez les individus infectés, le déploiement d'une réponse immunitaire pour tenter d'éliminer sinon de contenir l'agent infectieux ainsi que les infections opportunistes (revu dans⁷⁹). Il en découle une activation immunitaire chronique, notamment au niveau des lymphocytes T et des cellules innées, qui résulte en une inflammation persistante chez les PVVIH (revu dans⁷⁹). En grossesse, il est primordial de conserver un état immunitaire d'immunotolérance sans quoi peuvent survenir des arrêts spontanés de grossesse ou une prématurité (revu dans⁹⁵). Pour cette raison, il y a sécrétion placentaire et fœtale de cytokines associées à une réponse Th2, ce qui tend à contrecarrer les réponses maternelles de type Th1 (revu dans⁹⁵). Lorsqu'il y a un déséquilibre dans cet état d'immunotolérance, qu'il soit conditionné par le TAHA⁹⁵ ou par une co-infection, des répercussions sur le dénouement de la gestation, ainsi que sur la santé du bébé et de la mère s'ensuivent (revu dans⁷⁹). D'ailleurs, les conclusions des travaux de l'équipe de Palacio en sont un bel exemple. En effet, la concentration élevée de CD14 soluble généralement attribuée à l'activation des monocytes suite à une stimulation par les lipopolysaccharide (LPS)⁹⁶ a été associée avec un risque de prématurité, et ce, même sous un régime d'ARV⁸¹. D'autres travaux ont même relaté que les femmes enceintes infectées avaient des niveaux plus élevés de marqueurs d'inflammation que les femmes infectées n'étant pas enceintes, suggérant un effet

synergique de ces deux conditions sur l'inflammation⁹⁷. Les trophoblastes et les cellules immunitaires de leur placenta sont également plus enclins à sécréter certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL- β (revu dans⁹⁸) et l'on retrouve une médiane plus élevée de TNF- α ^{99, 100} et d'IL-8¹⁰⁰ dans leur environnement placentaire. Bien que ces cytokines représentent un risque pour le maintien de l'immunotolérance, d'autres présentes au niveau placentaire, telles que le facteur inhibiteur de leucémie (LIF, *Leukemia Inhibitory Factor*), l'IL-10, RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*) et l'IL-16, pourraient contribuer à limiter la dissémination du VIH¹⁰⁰. D'ailleurs, il y a une expression égale ou plus forte de ces cytokines dans le placenta des femmes infectées comparativement aux femmes saines¹⁰⁰.

Comme il a été abordé précédemment, les PVVIH ont une plus grande susceptibilité aux infections actives engendrées par le *Mycobacterium tuberculosis*⁶⁶. En grossesse, les femmes vivant avec le VIH sont 10 fois plus susceptibles de développer une tuberculose que les femmes enceintes séronégatives¹⁰¹. En contexte de co-infection chez la femme enceinte, le risque de mortalité de la mère et de l'enfant connaît une augmentation de 300 % et l'Afrique se voit particulièrement affectée par ces décès¹⁰¹. Bien que les travaux de Salazar-Austin *et al.* n'aient pas témoigné d'un taux de mortalité à la hausse au sein des femmes co-infectées comparativement à celles vivant uniquement avec le VIH, leur étude, menée en Afrique du Sud sous l'ère des TAR, a mis en valeur qu'elles avaient une fréquence plus élevée de prééclampsie et que leurs nouveau-nés avaient plus fréquemment un poids inférieur à 2500 g et qu'ils étaient admis plus fréquemment au soin intensif dans leurs premiers temps de vie¹⁰². Bien qu'à leur naissance, les enfants ENI issus de mères co-infectées par le VIH et la tuberculose avaient un taux de mortalité similaire à ceux nés de mères mono-infectées par le VIH, un plus grand nombre de décès a été remarqué dans leur première année de vie. Quant aux travaux de Bekker *et al.* menés en 2011 au Cap, capital de l'Afrique du Sud, ils font état d'un taux de mortalité plus élevé chez les nouveau-nés de mères co-infectées par le VIH et le *Mycobacterium tuberculosis* comparativement à ceux issus de mères séronégatives pour le VIH ayant eu une tuberculose en grossesse¹⁰³. D'ailleurs, une mortalité légèrement augmentée a aussi été notée chez les femmes co-infectées au sein de cette étude¹⁰³. Ainsi, ces

observations indiquent que la co-infection au VIH et au *Mycobacterium tuberculosis* affecte négativement la santé de la mère et de son enfant dans les régions où ces deux maladies sont endémiques, et ce, même à l'ère des TAR.

Outre ces effets adverses, l'infection par le VIH et/ou les régimes d'ARV ont été associés à d'autres troubles, comme des risques plus élevés d'anémie, de toxicité mitochondriale et d'hémorragies obstétricales (revu dans⁷⁸). Bien que les TAR pourraient être responsables de certaines de ces conditions, il n'en reste pas moins qu'elles permettent de réduire de manière significative le risque de transmission verticale, et pour cette raison, les communautés scientifique et médicale recommandent l'utilisation de tels traitements chez les PVVIH¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

1.3.2 Transmission verticale

La transmission verticale du VIH peut survenir *in utero*, durant l'accouchement ou encore lors de l'allaitement. En absence de tout traitement, le risque de transmission est très faible en début de grossesse, augmente autour de la 14^e semaine pour atteindre un pic s'étalant des dernières semaines de gestation jusqu'à l'accouchement selon le modèle de Kourtis *et al.*¹⁰⁷(Fig.7). Les estimations proposées par ce groupe vont de pair avec ceux de l'équipe de Shaffer¹⁰⁸, bien que leurs données diffèrent quelque peu. Pour le même temps d'allaitement, cette équipe estimait un taux de transmission général de 25 à 35 % avec un risque de transmission de 5 à 10 % en grossesse, de 10 à 20 % à l'accouchement et de 1 à 10 % lors de l'allaitement¹⁰⁸.

Certains facteurs cliniques augmentent les risques de transmission du VIH *in utero* ou à l'accouchement. Bien évidemment, la virémie maternelle joue un rôle fondamental dans la possibilité de transmettre l'infection^{96, 109, 110}, mais parmi les autres facteurs, on retrouve la chorioamnionite¹¹¹, les co-infections comme chlamydia et la gonorrhée (revu dans⁷⁹), ainsi que la présence d'activité répliquative virale au niveau du tractus vaginal¹¹². Également, la

présence d'une forte concentration de CD14 solubles qui résulte de la réponse des monocytes envers les LPS est significativement associée avec un risque de transmission verticale *in utero*⁹⁶. Cette augmentation du risque de transmission pourrait être associée à une barrière mucoale endommagée qui aurait pour conséquence une translocation microbienne plus importante.

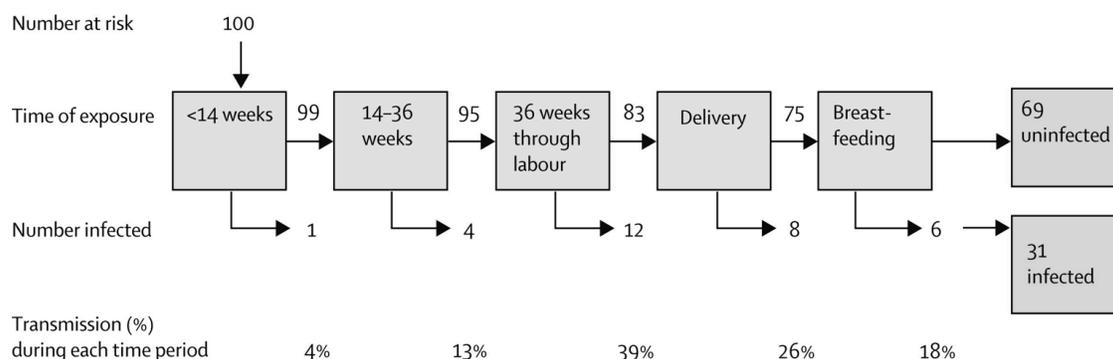


Figure 7. Moment estimé de la survenue de la transmission verticale du VIH chez une femme en absence de toute intervention

Note : Cette estimation du taux de transmission verticale faite sur un total de 100 enfants qui sont nés de mères infectées par le VIH et qui n'ont jamais été exposés à une TAR maternel. Une période d'allaitement de six mois a été considérée. Le nombre situé au-dessus des flèches entre les cases vertes représente le nombre d'enfants à risque d'acquérir le VIH. La période critique pour la transmission du VIH s'étend de la 36^e semaine de gestation jusqu'à l'accouchement. Le risque de transmission durant l'allaitement et entre les 14^e et 36^e semaines de gestation sont similaire¹⁰⁷ **Source :** Reprinted from The Lancet, Vol. 6, Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M., Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention, pp.726-32, Copyright 2006, with permission from Elsevier, (licence 4158790123338)

La transmission postnatale du VIH se fait principalement par l'allaitement. Le risque associé à cette pratique dépend, entre autres, du compte de CD4 de la mère, de sa CV, de la survenue d'une mastite, du temps d'allaitement ainsi que d'une alimentation mixte (substitut du lait maternel et lait maternel) du bambin¹⁰⁷. En absence de toute intervention médicale, pour une période d'allaitement de 6 mois, 18 % des enfants allaités seront infectés par le VIH (Fig.7)¹⁰⁷. Cette incidence augmente à 39 % si la période d'allaitement se prolonge entre 18 et 24 mois¹⁰⁷. Dans les régions en développement, l'adoption d'une alimentation mixte constitue un risque supplémentaire de transmission verticale, et ce, bien que la mère soit sous TAR. En effet, dans une étude menée par Anígilájé *et al.*, les enfants nourris sous ce modèle avaient une survie sans VIH (HFS, *HIV-free survival*) de 75,7 % à trois mois de vie, alors qu'elle était de 97,4 % et de 99,1 % respectivement pour les enfants nourris au sein exclusivement et pour les

enfants nourris seulement aux substituts ¹¹³. À 18 mois, la HFS diminuait pour tous les modèles d'alimentation, mais significativement plus pour l'alimentation exclusive aux succédanés de lait maternel. L'équipe a aussi noté un plus fort taux de mortalité chez les enfants qui sont sous une alimentation mixte¹¹³. D'autres études supportent aussi les bénéfices d'une alimentation exclusive au lait maternel si la femme est sous TAR^{114, 115}. La salubrité de l'eau et la nature des substituts au lait maternel sont en cause dans la morbidité diarrhéique et la mortalité observées dans les autres modèles d'alimentation (revu dans^{113, 116}).

Une très grande proportion de ces facteurs de risque peut être limitée par l'implémentation de stratégies préventives dont un accès à des TAR et une surveillance de la CV maternelle avant, durant et après la grossesse ^{117, 118}. D'ailleurs, l'essai clinique du Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group de Connor *et al.* a bien démontré l'efficacité de la zidovudine (AZT) donnée à la mère et en prophylaxie chez le nouveau-né dans la prévention de la transmission verticale¹¹⁹. Les travaux de Hoffman *et al.*, de Townsend *et al.* et de Forbes *et al.* mettent bien en valeur l'importance d'initier les TAR rapidement en grossesse et idéalement avant celle-ci^{118, 120, 121}. Effectivement, chez les femmes amorçant le traitement une fois enceintes, chaque semaine supplémentaire sous les ARV réduisait le risque de transmission de 8 %¹¹⁸. Selon les résultats de trois études, lorsque la TAR est initiée avant la grossesse, les risques de transmission se situent en bas de 1 %, alors qu'une médication débutée durant la grossesse augmente le risque au-delà de 1,2 %^{120, 122} voire jusqu'à 5,7 %¹¹⁸ selon les mesures de suivi périnatal. Globalement, dans les régions développées où le soutien obstétrical est omniprésent et où l'accès aux TAR/TAHA est répandu, le risque de transmission verticale s'inscrit en bas de 1 % (rapporté dans⁷⁹).

1.4 Enfants exposés au VIH mais non infectés

1.4.1 Aperçu des lignes directrices actuelles pour la prévention de la transmission verticale

En 2013, l’OMS a recommandé que les femmes enceintes et celles allaitant aient accès aux TAR/TAHA, et ce, au moins jusqu’à la fin de la période de risque de transmission verticale. Cette politique est mieux connue sous le nom de « Option B+ »¹⁰⁶. À cette époque, l’OMS proposait aussi un maintien à vie de la thérapie indépendamment de leur virémie et leur condition immunitaire, mais c’est réellement en 2016 que cette politique a été adoptée plus fermement¹²³.

Au Canada et aux États-Unis, les lignes directrices quant au mode d’accouchement recommandent de procéder par un accouchement vaginal si la femme a une CV inférieure à 1000 copies/ml durant les quatre dernières semaines (Canada) ou dans les derniers temps (États-Unis) avant l’accouchement^{124, 125}. Les normes canadiennes stipulent qu’il est plus sécuritaire de pratiquer une césarienne, et ce, autour de la 38^e semaine de gestation si la mère exprime une virémie au-delà de 1000 copies/ml ou inconnue, et si elle n’est pas sous une combinaison de TAR efficace¹²⁴. Une étude rétrospective canadienne a démontré qu’il n’y avait pas de différence significative dans l’incidence de la transmission verticale entre les deux modes d’accouchement pour les femmes sous TAHA¹²¹. Le risque de transmission était cependant plus important pour l’accouchement vaginal si la TAR maternelle était sous-optimale ou absente durant la grossesse. Dans un tel cas, le risque de transmission s’élevait à 10,8 % alors qu’il était de 3,8 % pour la césarienne¹²¹. En général, les femmes atteintes par le VIH subissent davantage de complications en postpartum que la population générale, indépendamment du mode d’accouchement¹²⁶. Cette constatation est toutefois amplifiée lorsqu’une césarienne est pratiquée¹²⁷⁻¹²⁹. Ainsi, en absence de contrindication, l’accouchement par voie naturelle est favorisé.

Les politiques concernant l'allaitement divergent entre les pays plus fortunés et ceux où les ressources médicales sont limitées. L'OMS recommande depuis quelques années que les femmes sous ARV maintiennent exclusivement une alimentation par allaitement chez leur nouveau-né et leur nourrisson, et ce, jusqu'à six mois d'âge ¹⁰⁶. Elle préconise également que l'enfant soit sous TAR en prophylaxie pour les six premières semaines de vie si l'enfant est allaité ¹²³. Au Canada, malgré les faibles risques de transmission verticale durant l'allaitement chez la femme sous TAR, il est toujours indiqué, par le Comité sur les maladies infectieuses de la Société des obstétriciens et gynécologue du Canada (SOGC) et par le Groupe canadien de recherche sur le SIDA chez les enfants (GCRSE), de nourrir l'enfant uniquement avec du lait maternisé ¹³⁰. Les *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC,) de concert avec le Département de la Santé et des Services sociaux des États-Unis soutiennent également l'abstention de l'allaitement chez les femmes vivant avec le VIH ^{131, 132}.

Chez un enfant qui n'est pas allaité, l'OMS recommande qu'il soit mis sous traitement prophylactique pour quatre à six semaines afin de restreindre les risques de développement d'une infection par le VIH postnatale ¹²³. Au Canada, le Comité sur les maladies infectieuses de la SOGC et le GCRSE suggèrent d'initier la prophylaxie dans les 72 h suivant l'accouchement et idéalement dans les six à douze premières heures de vie ¹³⁰. Il est recommandé que le régime prophylactique considère la CV maternelle à l'accouchement, qu'il comprenne de l'AZT et qu'il soit maintenu pendant six semaines ¹²⁴.

Bien qu'il n'en ait pas été question ici, plusieurs autres mesures préventives ont été établies par les pays et les organisations mondiales concernant le suivi durant la grossesse ^{123, 124, 130, 133}. Au final, l'ensemble de ces politiques de prévention de la transmission verticale a permis de donner accès aux TAR à 76% des femmes enceintes touchées par le VIH en 2016. Par conséquent, cela a mené à une diminution drastique de 47 % de l'incidence pédiatrique du VIH depuis 2010 ²⁶. Ainsi, une population grandissante d'enfants est aujourd'hui exposée au VIH sans y être infectée. Dans plusieurs régions de l'Afrique australe, les enfants exposés non infectés (ENI) peuvent constituer jusqu'à 30% des naissances ¹³⁴.

Que ce soit la conséquence d'une exposition prolongée aux ARV ^{135, 136}, d'un milieu *in utero* où l'immunité est déséquilibrée ou d'une exposition au VIH maternel et aux co-infections qui y sont associées, les enfants ENI présentent des altérations immunitaires ainsi qu'une mortalité et une morbidité supérieures aux enfants non exposés.

1.4.2 Toxicité mitochondriale

Les INTI, qui sont largement utilisés chez les PVVIH et en prophylaxie chez les nouveau-nés exposés, engendrent des effets adverses sur la fonction et l'intégrité des mitochondries comme initialement rapporté par Blanche *et al.*¹³⁷. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer l'impact des INTI sur la fonction mitochondriale. D'abord, les INTI peuvent inhiber directement l'activité de la polymérase γ , qui est l'enzyme responsable de la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ensuite, les INTI peuvent s'intégrer à l'ADNmt et causer la terminaison de l'élongation en raison de l'absence d'un groupement OH en position 3'. Cela se solde en une déplétion des séquences répliquées. Finalement, il est possible que les mécanismes de réparation de l'ADN ne puissent corriger adéquatement l'incorporation des INTI. Il y a alors l'apparition de mutations dans les séquences et des problèmes d'excision peuvent en découler. L'ensemble de ces effets adverses mène à une perte du niveau de nombreux produits géniques qui sont impliqués dans la phosphorylation oxydative et donc dans la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) qui est essentielle à l'organisme (revu dans^{138, 139}).

Les altérations et la toxicité mitochondriales associées à l'exposition aux TAR chez les enfants ENI ont été mises en lumière par de nombreuses équipes. Les résultats de ces diverses études n'abondent cependant pas tous dans le même sens et les conclusions restent souvent conflictuelles. En effet, alors que certains groupes ont montré une augmentation des copies d'ADNmt chez ces enfants ^{140, 141}, d'autres ont plutôt noté une perte de cet ADN ^{142, 143}. Au sein du premier parti, Côté *et al.* ont remarqué que les enfants ENI nés de mères sous TAHA et exposés à de l'AZT affichaient une teneur plus importante d'ADNmt que les enfants non exposés, et ce, même après 8 mois de vie. Toutefois, le nombre de copies d'ARNmt chez ces

bambins était moins élevé que celui chez le groupe contrôle. Il a été suggéré par l'équipe que le niveau supérieur d'ADNmt serait une réponse au stress subi par l'organelle et permettrait de contrebalancer l'altération de sa fonction causée par l'exposition à l'AZT et au VIH. La plus faible présence d'ARNmt pourrait, quant à elle, être un signe d'une altération dans le patron d'expression génique et dans l'intégrité des transcrits ¹⁴⁰. Ross *et al.* ont également observé une hausse de l'ADNmt dans le sang périphérique des enfants ENI exposés aux TAR. Dans la même ligne de pensée que l'équipe précédente, ils proposent que cette augmentation de l'ADNmt soit le résultat d'une réponse compensatoire des mitochondries face à la perte de fonction engendrée par le VIH et les TAR au sein de cet organite ¹⁴¹.

Bien que Noguera-Julian *et al.* aient rapporté une quantité plus faible d'ADNmt chez les enfants ENI, ils ont observé, au même titre que les deux études précédentes, des signes de perte de fonctionnalité au sein de la mitochondrie. Plus précisément, le complexe IV de la CRM présentait une activité réduite durant toute la première année de vie des enfants ENI comparativement aux sujets témoins. Il a semblé toutefois y avoir une cinétique de normalisation de cette fonction avec l'âge ¹⁴⁴. Tout comme cette équipe, Aldrovandi *et al.* ont aussi noté une quantité plus faible d'ADNmt chez les enfants ENI. De manière intéressante, leur étude a permis de comparer la teneur de cet ADN chez les enfants non exposés aux ARV, exposés uniquement à de l'AZT et exposés à une combinaison d'ARV comprenant de l'AZT et du lamivudine (3TC). Ainsi, ils ont été capables de voir que bien que les enfants ENI montraient une déplétion dans l'ADNmt comparativement aux sujets témoins, les enfants exposés à des ARV avaient davantage de copies de cet ADN. Également, une hausse du niveau de l'ADNmt chez les sujets exposés au VIH a été observée durant leurs 5 premières années de vie ¹⁴³.

Outre la quantité d'ADNmt, des études ont révélé d'autres troubles associés à des anomalies mitochondriales chez les enfants ENI : présence de mutation dans les séquences d'ADNmt¹⁴⁵, altération de la morphologie mitochondriale, hyperlactatémie et troubles de neurodéveloppement (revu dans^{138, 146}).

1.4.3 Perturbation des paramètres hématologiques

Lorsque les paramètres hématologiques des enfants ENI sont analysés, Pacheco *et al.* ont constaté une réduction des niveaux d'hémoglobines, de plaquettes, de neutrophiles, de lymphocytes (plus particulièrement les lymphocytes T CD4⁺) chez les enfants recevant des ARV comparativement aux enfants naïfs au traitement ¹⁴⁷. Dans cette étude, ces différences ont été perçues jusqu'à l'âge de 2 mois, après quoi, vers 6 mois, aucune différence significative n'était notable pour le taux d'hémoglobine et la concentration en neutrophiles ¹⁴⁷. Le traitement prophylactique prescrit dès la naissance et pour six semaines pourrait expliquer la cinétique de progression des paramètres hématologiques étudiés. Jusqu'à 2 ans d'âge, les enfants exposés aux ARV affichaient des valeurs plus faibles que les enfants naïfs pour les plaquettes, les lymphocytes totaux dont les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Lorsque les enfants ENI sont comparés entre eux en fonction du type de thérapie auquel ils ont été exposés, les divergences dans les paramètres hématologiques sont plus marquées entre les enfants sans thérapie et les enfants en multithérapie qu'entre les enfants sans thérapie et ceux sous monothérapie, et ce, jusqu'à l'âge de 2 mois. Ces différences s'amoindrissent toutefois après 6 mois de vie ¹⁴⁷. La présence d'inhibiteurs de protéase dans la constitution de la multithérapie avait peu d'effets sur les résultats hématologiques des enfants traités, sauf sur la présence des plaquettes.

Une autre étude conduite en 2007 a révélé des observations similaires à celles effectuées par Pacheco *et al.* ¹⁴⁸. En effet, à leur naissance, les enfants exposés à une TAR présentaient une concentration plus faible d'hémoglobines que la normale. Cette infériorité était toutefois plus sévère chez les enfants de mères sous TAHA, et ce, jusqu'à quatre semaines de vie. D'ailleurs, plus de cas d'anémie (toxicité hématologique de grade 2 ou plus) ont été perçus au sein de ce groupe dans les 3 premiers mois de vie et cette donnée était associée avec l'exposition au TAHA maternel. Ces observations impliquent que l'exposition *in utero* aux ARV ont un effet direct sur les valeurs hématologiques de l'enfant ¹⁴⁸. Tout comme ce qu'ont observé Pacheco *et al.*, une neutropénie était notable chez de nombreux enfants ENI à leur naissance. Cependant, cette équipe n'a pas noté de perturbations considérables au niveau du compte de plaquettes.

Au même titre que ces deux études, les travaux de Le Chenadec *et al.* ainsi que de El Beitune *et al.* ont remarqué un faible niveau d'hémoglobines à la naissance des enfants ENI. D'autres perturbations de l'hématopoïèse congruentes avec les observations discutées ci-haut ont été également soulignées par ces études et associées avec les ARV ^{149, 150}. Ainsi, il est possible de conclure que l'exposition anténatale et postnatale aux ARV altère le profil hématologique des enfants ENI.

1.4.4 Risques de mortalité chez les enfants ENI

De nombreuses études ont rapporté une mortalité prédominante chez les enfants ENI. Une majorité de celles-ci ont eu lieu avant que les programmes de prévention de la transmission verticale et que l'utilisation de la névirapine (NVP) chez la mère et le nouveau-né soient bien instaurés ou même implantés dans les principales régions endémiques pour le VIH. Cette mortalité n'est toutefois pas réservée qu'à l'ère pré-TAR. En effet, depuis l'expansion de ces politiques, promues plus particulièrement à partir de 2002 par l'OMS ¹⁵¹, un risque de mortalité augmenté chez ces enfants a aussi été soulevé ¹⁵²⁻¹⁵⁵, et ce surtout dans la période néonatale chez les enfants prématurés ¹⁵⁵.

En 2016, Brennan *et al.* ont mené une méta-analyse des articles publiés entre 1994 et 2016 portant sur l'étude quantitative de la mortalité des enfants ENI ¹⁵². Ce travail a permis d'estimer, toutes causes et toutes époques confondues, que les enfants ENI des pays à revenus faibles et moyens présentaient un risque de mortalité plus élevé de 70 % comparativement aux enfants non exposés. Ce risque est d'ailleurs significativement plus important indépendamment de l'ère dans laquelle les études ont eu lieu, du moment considéré dans les deux premières années de vie des enfants et de la région africaine étudiée ¹⁵². Bien que cette étude permette d'avoir une vue d'ensemble des travaux réalisés sur la mortalité au sein des enfants ENI, elle est affectée par l'hétérogénéité significative qu'il y a dans les résultats des différentes publications. Cette discordance entre les études provient, entre autres, de la manière dont elles sont construites, mais également du fait que les politiques de prévention et les pratiques de soins pédiatriques et obstétricaux ont été en constante évolution dans les deux

dernières décennies. C'est d'ailleurs ce que souligne fortement une seconde méta-analyse, publiée en 2016 par l'équipe de Becquet, dans laquelle le risque de mortalité est presque deux fois plus élevé à l'âge de 12 mois pour les enfants ENI comparativement au groupe non exposé. Cette différence n'atteint toutefois pas une valeur statistiquement significative contrairement au risque doublé observé à 24 mois de vie ¹⁵⁶. Encore une fois, la majorité des études considérées pour cette méta-analyse a été réalisée avant l'ère des ARV.

Par ailleurs, il a été remarqué que la mortalité des enfants ENI est plus significative quand la mère n'a reçu aucun ARV que lorsque celle-ci a eu accès à une thérapie sous-optimale ou encore à une triple thérapie ¹⁵⁷. Dans cette étude, 17 % des enfants ENI ont perdu la vie après que leur mère soit décédée, ce qui constitue un ratio de risque de 11.1 par rapport aux enfants ENI n'ayant pas perdu leur mère. D'autres travaux ont aussi mis en valeur l'effet de la mortalité maternelle sur le sort des enfants ENI ^{153, 158, 159}. Cela témoigne de l'importance de la santé maternelle dans le sort clinique des enfants ENI. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en absence de soins appropriés apportés par la mère, l'enfant est exposé à plus de complications médicales qui tardent à être reconnues. Également, si la mère présente un portrait de santé défaillant, elle risque d'exposer son enfant à davantage de pathogènes qui sont autrement bien contrôlés ou absents de l'environnement infantile.

Outre l'absence de TAR maternelle et le décès de la mère, de multiples facteurs de natures diverses peuvent être mis en cause dans la mortalité observée au sein des enfants ENI. Ces facteurs dépendent, entre autres, de leur vulnérabilité immunitaire, de la condition médicale du nouveau-né (poids à la naissance et prématurité), des pratiques d'alimentation pédiatriques et également de la santé maternelle durant et après la grossesse. En ce qui concerne ce dernier paramètre, des associations ont été faites entre une haute virémie maternelle, un faible taux d'hémoglobine chez la mère et un risque de mortalité élevée chez les enfants ENI. L'effet du compte de CD4 reste toutefois controversé entre les différentes études (revu dans ¹⁵⁶). Pour ce qui est de la nutrition et du temps d'allaitement, comme discuté à la section 1.3.2, l'alimentation mixte et l'alimentation exclusive aux succédanés de lait

maternel constituent des risques supplémentaires de mortalité dans les pays à revenu faible et moyen ^{113, 114}. En tout, dans les régions endémiques pour le VIH, l'abstention d'allaitement, le faible poids du nouveau-né, l'inaccessibilité des ARV à vie chez la mère et l'absence de celle-ci en raison de son décès ont un impact variable, mais considérable sur la survie des enfants ENI. En fait, 63,6 % de la mortalité observée chez ces derniers sont attribuables à ces facteurs ¹⁵⁷. De plus, une grande partie des éléments présentés peuvent également expliquer une morbidité augmentée chez ces enfants.

1.4.5 Risques de morbidité reliée aux maladies infectieuses

Bien que non infectés, les enfants ENI sont plus enclins à développer des maladies infectieuses sévères nécessitant l'hospitalisation et provoquant même la mort. Les infections touchant les enfants ENI ne sont, en général, pas différentes de celles retrouvées dans la population pédiatrique normale ¹¹⁶ et elles touchent principalement les voies respiratoires. Cependant, une vulnérabilité inhabituelle envers *Pneumocystis jirovecii* a été rapportée, ce qui soulève des préoccupations au sujet de l'intégrité de l'immunité des enfants ENI puisqu'il s'agit d'un pathogène habituellement associé aux individus immunodéprimés dont font partie les PVVIH ¹⁶⁰⁻¹⁶³. D'ailleurs, les travaux de McNally *et al.* illustrent bien la relation entre ce pathogène et l'immunodéficience. Alors que des cas de pneumonie causée par *Pneumocystis jirovecii* ont été observés chez les enfants touchés par le VIH et exposés à ce dernier, aucun des enfants non exposés n'a été affecté par ce champignon opportuniste ¹⁶¹.

Outre cette infection particulière, il a été montré que les enfants ENI souffraient plus fréquemment ou plus sévèrement d'une morbidité causée par les *Streptococcus* du groupe B, et ce, peu importe leur origine (revu dans ¹⁶⁴). Dans l'étude belge d'Adler *et al.*, les enfants ENI étaient 13 fois plus touchés que la population saine du même âge ¹⁶⁵. Les résultats des travaux d'Epalza *et al.*, faits en Suisse, indiquent également une plus grande et sévère susceptibilité des enfants ENI envers ce pathogène ¹⁶⁶. Il en est de même à Soweto, Afrique du Sud, alors qu'entre 2004 et 2008, la population ENI montrait une incidence 2,25 fois plus grande de cette infection invasive, notamment sous forme de bactériémies et de méningites,

que le groupe non exposé ¹⁶⁷. La différence d'incidence entre l'étude d'Adler *et al.* et celle-ci peut venir du fait que la fréquence d'infections invasives par les *Streptococcus* du groupe B est plus élevée à Soweto (2,72 cas/1000 naissances) que dans la population infantile africaine et mondiale (1,21 et 0,53 cas/1000 naissances respectivement) ¹⁶⁷. La qualité et l'accessibilité des suivis médicaux peuvent également être mises en cause. À noter que plusieurs études ont rapporté que la fréquence de la colonisation anogénitale par le *Streptococcus* du groupe B dans les dernières semaines de gestation n'est pas différente selon le statut VIH de la femme enceinte¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Ainsi, la morbidité causée par ce pathogène chez les bambins ENI ne découle donc pas d'une exposition accentuée à l'accouchement.

Une seconde bactérie du genre *Streptococcus* affecte également plus fréquemment et sévèrement les enfants ENI d'Afrique du Sud durant leur première année de vie. Selon von Mollendorf *et al.* ¹⁷², *S. pneumoniae* est responsable d'une incidence trois fois plus élevée d'infections invasives chez ce groupe lorsqu'il est comparé aux enfants non exposés. Une mortalité augmentée due à cette infection a aussi été détectée au sein de ces enfants avant l'âge de 6 mois. L'équipe a tout de même observé une diminution, voire une normalisation de la fréquence des infections invasives par *S. pneumoniae* entre 2009 et 2013, ce qui suggère une meilleure prise en charge des infections maternelles au VIH et une implantation efficace de la vaccination contre les infections à pneumocoque.

D'autres études menées dans les régions à revenu plus élevé ont aussi montré des perturbations dans la morbidité des enfants ENI. Une étude menée en Amérique latine et dans les régions des Caraïbes par Mussi-Pinhata *et al.* ¹⁷³ a rapporté la morbidité chez 462 enfants ENI pendant leurs six premiers mois de vie. De ces 462 enfants, 61 % ont eu au moins une infection durant leur suivi. Autour de 77 % de ces infections ont eu lieu dans la période postnatale (≥ 28 jours) et elles affectaient principalement la peau et les muqueuses (44,4 %), le tractus respiratoire inférieur (20,7 %) et supérieur (17,4 %). Les infections subies par les enfants ENI ont nécessité une hospitalisation dans 17,5 % des cas et les causes de leur morbidité étaient en grande partie des bronchiolites et des pneumonies. Ainsi, les maladies

infectieuses du tractus respiratoire inférieur avaient un niveau de sévérité considérable nécessitant une prise en charge par un centre hospitalier. L'ensemble des infections postnatales était associé avec les paramètres de la santé maternelle, dont le compte de CD4, tout juste après l'accouchement et la situation sociodémographique¹⁷³.

Au sein de la cohorte européenne de l'étude de Taron-Brocard *et al.*¹⁶³, 9,15 % des enfants ENI ont connu au moins une infection nécessitant une hospitalisation ou causant la mort. La majorité des infections avait une source virale, alors que les maladies bactériennes et fongiques représentaient 22,8 % et 1,1 % des cas respectivement. Dans plus du quart des cas, l'infection touchait le tractus respiratoire inférieur. L'équipe a enregistré un cas de pneumocystose, mais la majorité des pneumonies était due à des infections par des bactéries encapsulées. Il a été également remarqué que, durant la première année de vie des enfants ENI, la morbidité bactérienne reliés aux maladies du tractus respiratoire inférieur était inversement associée au compte de CD4 maternel. De plus, seules les infections causées par des bactéries encapsulées corrélaient négativement avec ce paramètre maternel. Il est donc possible de supposer que l'immunité humorale des enfants ENI est affectée par l'état immunitaire de la mère¹⁶³.

Une étude plus récente effectuée par Adler *et al.*¹⁶⁵ fait part d'observations très similaires à celles de Taron-Brocard *et al.*, notamment au niveau de la fréquence des infections sévères, de la présence élevée d'infections par des bactéries encapsulées, d'une atteinte prédominante du système respiratoire et d'une association quoique non significative entre un compte de CD4 maternel en-dessous de 200 cellules/mm³ et une fréquence plus élevée d'infection sévères. De plus, Adler *et al.* ont montré que les enfants ENI étaient quatre fois plus affectés par les pneumococcies invasives que les enfants sains avant que le vaccin contre le pneumocoque soit disponible. Pour les streptocoques invasives du groupe B, ils sont 13 fois plus touchés que la population saine du même âge. D'ailleurs, les résultats d'une étude faite en Suisse en 2010 montrent également une plus grande et plus sévère susceptibilité des enfants ENI envers ce dernier pathogène¹⁶⁶.

À ce jour, une grande portion des études disponibles sur les problèmes de morbidité des enfants ENI ont pris lieu dans des régions défavorisées ou avant que les TAR soient plus facilement accessibles (revu dans¹¹⁶), ce qui suggère une santé maternelle moins adéquate, un accès limité aux soins de santé et des conditions sanitaires sous-optimales. Dans la très grande majorité des pays d’Afrique subsaharienne, il y a moins de 0,5 médecin par 1000 habitants¹⁷⁴ et moins de 50% de la population qui a accès à des installations sanitaires adéquates¹⁷⁵. On constate également que près 53% des enfants souffrant de pneumonie dans les régions à faible revenu ne sont pas pris en charge adéquatement par des services de santé¹⁷⁶. De plus, il faut prendre en compte que, dans les pays d’Afrique subsaharienne, il y a un taux important de mortalité au sein des enfants âgés de cinq ans et moins, et ce, sans regard à l’exposition au VIH. En 2013, la mortalité infantile au sein de ces régions constituait près de la moitié de tous les décès pédiatriques observés mondialement et environs 61,5% de la mortalité observée dans cette région a pour cause les maladies infectieuses dont la pneumonie¹⁷⁷.

Somme toute, les conditions de vie défavorables ne permettent d’expliquer qu’en partie la morbidité observée chez les enfants ENI. Plusieurs groupes de recherche ont également souligné la présence de ces particularités chez des enfants issus de régions à revenu plus élevé. Outre les conditions sociodémographiques et l’accessibilité à des soins de santé adéquats, l’une des causes mises de l’avant pour expliquer la morbidité des enfants ENI et son association avec la santé maternelle est le transfert limité d’anticorps maternels à l’enfant durant la grossesse, résultant en une protection plus limitée de l’enfant dans ses premiers mois de vie^{163, 167}. D’ailleurs, certaines singularités, quoique limitées, ont été observées dans le transfert placentaire et l’avidité de certaines sous-classes d’immunoglobulines (Ig) G spécifiques contre le *Streptococcus* de groupe B¹⁷⁸ (revu dans¹⁶⁴), ce qui pourrait expliquer leur plus grande susceptibilité à ce pathogène. Cependant, les anomalies dans le transfert placentaire des Ig peuvent difficilement expliquer le maintien d’un risque de morbidité et de mortalité plus important jusqu’à l’âge de deux ans¹⁵² même en absence d’allaitement. Ce qui peut toutefois amplifier ce phénomène est l’abstention d’allaitement. En effet, en plus des risques relatifs à l’origine des succédanés du lait maternel et à la salubrité de l’eau dans les régions à plus faible revenu, le fait de ne pas allaiter limite le transfert passif des anticorps

maternels dans les premiers mois de vie de l'enfant¹⁷⁹. D'ailleurs, certains ont remarqué un plus grand taux d'hospitalisation chez les enfants ENI n'ayant pas été exclusivement allaités¹⁸⁰.

Une autre explication proposée par de récentes études est que l'exposition aux ARV, notamment aux INTI, puisse avoir un impact sur l'hématopoïèse et ainsi diminuer la faculté des enfants ENI à maintenir une défense adéquate contre les pathogènes auxquels ils sont exposés¹⁶⁵. Si l'hématopoïèse prend du temps à regagner une activité normale à la suite de la prophylaxie, cela pourrait expliquer, en partie, la persistance de la vulnérabilité des enfants ENI aux maladies infectieuses. Il sera question du profil lymphocytaire T et B de ces enfants dans les sections suivantes.

Par ailleurs, il a été suggéré que l'environnement foetal des enfants ENI, qui est modelé par l'inflammation et l'activation immunitaire, par la présence d'ARV ainsi que par l'exposition aux particules virales et à d'autres pathogènes issus des co-infections, puisse influencer les processus épigénétiques chez l'enfant. Cela pourrait avoir pour conséquence de modifier l'expression de certains gènes reliés aux fonctions immunitaires de manière permanente¹⁸¹.

Parmi tous ces facteurs de risque, le rôle de la santé maternelle et de celle du ménage reste encore aujourd'hui sous-estimé. Comme il a été mentionné plus tôt, plusieurs études ont permis d'associer un faible compte de CD4 maternel avec la morbidité et la mortalité touchant les enfants ENI^{163, 173, 182, 183}. Cela prêche à supposer que la progression de l'infection au VIH chez ces mères est un facteur de risque pour la santé de leur enfant. Puisque l'immunosuppression mène à une susceptibilité élevée aux infections opportunistes^{62, 184-186}, il y a certes un risque plus important d'exposition et donc fort probablement de transmission de ces maladies infectieuses aux enfants ENI en bas âge (revu dans¹⁸⁷). Il paraît donc essentiel de pallier le manquement majeur d'études évaluant les relations entre la fréquence des infections

bactériennes et virales chez les membres des familles affectés par le VIH et la fréquence des infections chez les enfants ENI durant leur période de vulnérabilité immunitaire.

Il n'en reste pas moins que, bien que tous pertinents, ces facteurs ne peuvent pas individuellement expliquer entièrement la problématique de la morbidité des enfants ENI. Il y a donc fort à penser que son étiologie est multifactorielle. À la vue de ces études, on peut raisonnablement conclure que la morbidité des enfants ENI qui touche surtout le tractus respiratoire inférieur n'est pas limitée aux pays à faible revenu et que les paramètres immunitaires de la mère et de l'enfant peuvent avoir un effet sur l'incidence des infections au sein de ce groupe. À ce jour, de plus amples études sont encore requises pour comprendre plus adéquatement les raisons de la morbidité

1.4.6 Particularités du compartiment lymphocytaire T

De nombreuses études ont fait part de perturbations dans le profil lymphocytaire T des enfants ENI. Il est important de noter qu'il y a une divergence fréquente quant aux résultats et aux conclusions relatives aux perturbations du compartiment T, mais que certaines observations tendent à être récurrentes. L'une des constatations les plus communes est une diminution de la fréquence ou du compte lymphocytaire T CD4⁺, et ce, tant dans les premiers temps de vie ^{147, 188, 189} que plus tard dans l'enfance ^{190, 191} (revu dans ^{79, 192}). Dans une étude rétrospective effectuée avec la cohorte du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) à l'hôpital Sainte-Justine, Kakkar *et al.* ont rapporté que lorsque les enfants ENI sont comparés entre eux, ceux exposés à une CV maternelle de moins de 50 copies/ml à l'accouchement ont un compte et une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD4⁺, et ce, tant à 2 mois qu'à 6 mois ¹⁹³. Ainsi, il est possible de penser que l'exposition au VIH *in utero* et à l'accouchement pourrait mener à un déséquilibre du compartiment T dont l'importance est relative à la virémie maternelle. Par ailleurs, un faible compte de CD4 maternel a été aussi associé à un plus faible pourcentage de lymphocyte T CD4⁺ chez l'enfant ^{147, 191}. Pour expliquer ce phénomène, certains ont proposé une exportation thymique diminuée due à une altération dans l'activité de leurs cellules progénitrices ^{147, 191, 194}. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par

les travaux de Nielsen *et al.*¹⁸⁸. Les ARV sont l'un des facteurs les plus aptes à affecter l'hématopoïèse (revu dans¹⁴⁷).

En procédant avec plus de minutie, il est possible de caractériser plus rigoureusement ces débalancements dans le compartiment T. En effet, chez les lymphocytes T CD4⁺, les enfants ENI ont significativement moins de lymphocytes T naïfs CD4^{+188, 195} et CD8^{+189, 195} (revu dans^{79, 146}) dans les premiers temps de vie. De plus, une teneur plus importante en cellules T CD8⁺ effectrices mémoires a été constatée^{189, 196} (revu dans¹⁴⁶). D'ailleurs, les cellules T des enfants ENI expriment plus fortement CD154 (ligand de CD40), ce qui indique un état d'activation (revu dans^{79, 146}).

Ces observations mènent à penser que les lymphocytes T des enfants ENI connaîtraient une stimulation *in utero* menant à une différenciation des cellules naïve vers un état activé. Cette stimulation pourrait être issue d'une exposition aux particules virales^{189, 195}. D'ailleurs, à plusieurs reprises, il a été démontré que ces enfants étaient en mesure de déployer une réponse T spécifique au VIH^{146, 195} (revu dans^{146, 192}). Cette réponse spécifique au VIH tend toutefois à disparaître dans les premiers temps de vie des enfants ENI (revu dans^{79, 146}).

L'activation immunitaire est également appuyée par une production plus majeure d'IFN- γ et plus faible d'IL-4 par les cellules du sang de cordon des enfants ENI. Cela indique une déviation de la fonction immunitaire vers une réponse de type Th1^{99, 146}. Cette observation ne fait toutefois pas l'unanimité puisque d'autres ont montré un profil Th2 dominant chez les enfants ENI caractérisé par une expression prédominante de récepteurs de chimiokines associés à une réponse Th2 comme le CCR3 et le CCR8¹⁹⁷.

1.4.7 Défense humorale du nouveau-né

L'une des premières lignes de défense des nouveau-nés contre le développement de potentielles maladies infectieuses provient des anticorps maternels acquis par transfert transplacentaire (isotype IgG) ou par l'allaitement (isotype IgA) (revu dans¹⁷⁹). En effet, avant même l'adhésion à un programme d'immunisation, le nouveau-né détient déjà divers anticorps d'origine maternelle qui lui permettent de compenser la naïveté de son système immunitaire. Les anticorps maternels acquis *in utero* sont conservés en circulation jusqu'à leur 1^{er} anniversaire, alors que la persistance de ceux acquis durant l'allaitement dépend de la durée de cette pratique. Les IgA sont de plus circonscrites dans les voies intestinales (revu dans¹⁷⁹) (Fig.8).

Ce transfert peut toutefois être bouleversé par le statut médical de la mère. Parmi les troubles affectant l'héritage de ces anticorps se trouve l'infection au VIH. En effet, chez les nouveau-nés ENI, on retrouve un titre moins élevé d'IgG spécifiques à la rougeole^{198, 199} au tétanos²⁰⁰⁻²⁰³, aux infections par l'*Hemophilus influenzae* de type B²⁰², au pneumocoque²⁰² et la coqueluche²⁰²(revu dans²⁰⁴). Toutefois, ils ont un titre augmenté d'IgG visant le toxoïde de la diphtérie et les antigènes de surfaces de l'hépatite B selon l'étude de Simani *et al.*²⁰¹. Comme mentionné à la section 1.4.5, l'immunité passive contre les streptocoques du groupe B montre des signes de perturbations et pourrait être sous-optimale chez les enfants ENI^{178, 205}.

Chez les femmes vivant avec le VIH et leurs enfants ENI, le taux de transfert d'anticorps contre la rougeole dans le sang de cordon ombilical a été inversement associé avec la CV maternelle dans les dernières semaines de gestation ainsi qu'avec le titre d'anticorps spécifiques contre gp41 chez la mère¹⁹⁸. Un autre facteur limitant le transfert placentaire d'anticorps est une co-infection avec la malaria. Cette maladie tend à altérer l'intégrité placentaire et à affecter les récepteurs Fc spécifiques pour les IgG qui sont nécessaires pour le passage de ces anticorps à travers la barrière placentaire^{198, 200}. Également, il est important de considérer que chez les PVVIH, les réponses vaccinales contre plusieurs vaccins peuvent être altérées (revu dans²⁰⁴). S'il y a un titre sous-optimal d'anticorps, il est possible que le transfert

soit altéré. De plus, puisque ce transfert se fait davantage dans les derniers temps de gestation, si un enfant naît prématurément, comme on le constate souvent chez les femmes séropositives, il peut y avoir un impact direct sur l'immunité passive de l'enfant ENI (revu dans ²⁰⁴).

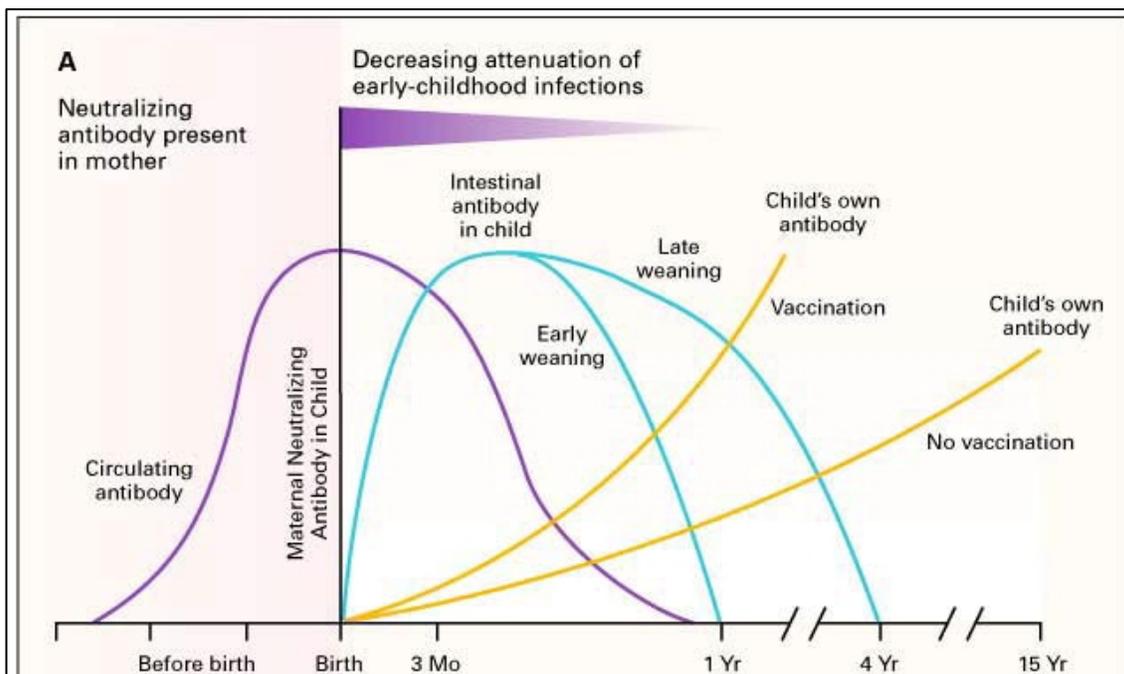


Figure 8. Cinétique des anticorps maternels acquis passivement au cours de la grossesse et de l'allaitement chez l'enfant

Note : Le transfert transplacentaire d'anticorps maternels est initié tardivement durant la gestation. Ce phénomène permet au nouveau-né dont l'activité et la mémoire immunitaire ne sont pas encore bien instaurées d'être protégé contre les pathogènes auxquelles il pourrait faire face dans les premiers temps de vie. Cette immunité passive qui peut durer jusqu'à un an dans la circulation est peu à peu remplacée par celle de l'enfant après la naissance. Outre par le transfert transplacentaire, les anticorps maternels peuvent être acquis par l'allaitement et leur persistance dépend, dans un tel contexte, de la durée de cette pratique d'alimentation. Les anticorps acquis de cette manière se retrouvent en totalité au niveau intestinal et permettent de protéger l'enfant de morbidité entérique en plus de moduler la colonisation bactérienne intestinale (revu dans ^{179, 206}).

Source : Reproduced and adapted with permission from Zinkernagel RM. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. The New England journal of medicine. 2001;345(18):1331-5, Copyright Massachusetts Medical Society

1.3.8 Réponse vaccinale

L'évaluation de la réponse vaccinale chez les enfants ENI n'est pas dépourvue de résultats contradictoires. Somme toute, ces enfants ont été associés à plusieurs reprises avec une réponse vaccinale tout aussi robuste que la population non exposée du même âge ²⁰¹ (revu dans^{79, 192}). En effet, ils affichent des titres d'anticorps similaires aux enfants non exposés et suffisamment élevées et durables pour assurer leur protection contre le tétanos, les infections par *Haemophilus influenzae* de type B, le virus de l'hépatite B et le virus de la rougeole (revu dans^{79, 192}).

Des niveaux mêmes plus élevés d'anticorps sont induits chez les enfants ENI à la suite de la vaccination contre *Bordetella pertussis* ²⁰², et ce, plus rapidement que chez les enfants non exposés ²⁰³. Une réponse vaccinale également plus forte contre le pneumocoque a aussi été notée ²⁰². Toutefois, il faut noter qu'il y a une variabilité notable du niveau de la protection contre les divers sérotypes de *S. pneumonia*, même après l'administration de la troisième dose du vaccin ²⁰⁷. Cette réponse plus robuste observée chez les enfants ENI face à certains vaccins pourrait s'expliquer par l'altération de transfert maternel d'IgG durant la grossesse. Comme décrit à la section 1.4.7, l'immunisation passive contre les maladies infantiles communes est moins dominante chez ces enfants. En ayant moins d'anticorps maternels, il y a moins d'interférence avec le processus d'immunisation actif (revu dans¹⁴⁶). D'ailleurs, dans l'étude de Jones *et al.*, ce sont les enfants qui avaient une plus faible immunisation passive contre *S. pneumoniae* qui ont eu les titres d'anticorps les plus notables après la vaccination²⁰².

Par ailleurs, il ne semble pas y avoir une proportion plus grande d'enfants ENI ne répondant pas aux vaccins. En effet, seuls 6,7 % à 11,5 % d'entre eux ne réagissent pas à l'immunisation contre l'hépatite B, ce qui est comparable au reste de la population pédiatrique (revu dans¹⁹²). Il en est de même pour l'immunisation contre la diphtérie et le tétanos alors que respectivement 94,7 % et 100 % des enfants ENI atteignent une séroprotection adéquate comparativement à 98,2 % et 96,4 % chez les enfants non exposés ²⁰⁸. Une étude a toutefois rapporté que les enfants ENI avaient une plus faible concentration d'anticorps neutralisants

spécifiques à la polio après l'administration orale du vaccin, bien que la très grande majorité a atteint le seuil de séroprotection. Cette réduction était reliée à une période d'allaitement plus courte²⁰⁹.

1.3.9 Particularités du compartiment lymphocytaire B

Bien que le phénomène soit peu documenté, les enfants ENI montrent certaines singularités au niveau du profil lymphocytaire B. Concernant la fréquence des lymphocytes B, une plus grande valeur a été observée chez les enfants ENI en fonction de la CV maternelle par Kakkar *et al.*¹⁹³. En effet, les enfants exposés à une CV maternelle de plus de 1000 copies/ml à l'accouchement avaient une fréquence augmentée de cellules B à 2 et à 6 mois de vie comparativement au groupe exposé à une virémie en dessous de 50 copies/ml. Les auteurs ont soutenu que puisque le compte absolu de lymphocyte B n'était pas distinct entre les deux groupes, la différence de fréquence pouvait découler d'une perturbation du répertoire de cellules immunitaires causée par l'exposition au VIH¹⁹³.

Dans une optique similaire, en comparant les enfants ENI et les enfants non exposés, Borges-Almeida *et al.*⁹⁹ ont trouvé un pourcentage total de lymphocytes B augmenté à l'accouchement chez le premier groupe principalement dû à une fréquence accrue de cellules B immatures (sIgM⁻CD34⁺CD19⁺CD10^{-/+}) et CD19⁺CD5⁺. L'expression de CD5 se fait au niveau des populations cellulaires anergiques dans le compartiment B et a pour effet d'instaurer une tolérance de la cellule en inhibant la signalisation issue du récepteur des cellules B (RCB)²¹⁰.

Ces observations sont contraires à celles effectuées par Nduati *et al.*²¹¹ puisqu'en comparant les enfants ENI et non exposés entre eux durant leurs deux premières années de vie, ils ont remarqué que les premiers avaient une fréquence inférieure de lymphocytes B totaux qui était due à une altération dans la sous-population mémoire classique (CD19⁺ CD10⁻ CD27⁺) associée avec une exposition au VIH. Celle-ci était d'ailleurs caractérisée par une

fréquence plus faible de cellules ayant fait la commutation de classe (IgM⁻). Puisque ce groupe cellulaire joue un rôle important dans la défense contre les bactéries encapsulées (revu dans²⁰⁶), cette observation pourrait expliquer la plus grande susceptibilité des enfants ENI aux infections touchant les voies respiratoires causées par les pneumocoques. D'ailleurs, une absence de cellules B mémoires IgM⁺ est associée avec une incidence plus élevée d'infection du tractus respiratoire. (revu dans²⁰⁶). En plus d'afficher une fréquence plus basse de lymphocyte B mémoire, les enfants ENI vivent une accumulation plus lente de cette sous-population dans leurs deux premières années de vie. L'équipe mentionne aussi que la CV maternelle est associée positivement avec un pourcentage plus fort de plasmablastes et de cellules B mémoires, mais négativement avec les cellules naïves. De plus, il y a une corrélation directe entre le compte de CD4 maternel et la fréquence totale de cellules B chez l'enfant. Il est ainsi possible de voir que les paramètres maternels influencent la distribution et l'intégrité de ce compartiment cellulaire.

À l'inverse de tous ces résultats présentés, un groupe de recherche mentionne n'avoir trouvé aucune différence dans le profil cellulaire B entre les enfants exposés ou non au VIH maternel, et ce, de 6 mois à 18 mois¹⁸⁹. Cette même équipe fait également part d'une absence de perturbation dans le compartiment lymphocytaire T, ce qui est très surprenant considérant la littérature exhaustive et vient remettre en doute les modalités de leur étude. Les conclusions conflictuelles de ces études pourraient provenir de la manière avec laquelle les échantillons sanguins ont été traités, mais également de la stratégie phénotypique utilisée pour caractériser les différentes populations cellulaires. En outre, si les marqueurs de surface ne sont pas les mêmes ou encore si les anticorps conjugués ne viennent pas du même clone ou ne sont pas couplé au même fluorochrome, il est possible de voir des différences dans les fréquences cellulaires.

Au niveau de la viabilité des lymphocytes B, une étude menée par Miyamoto *et al.*¹⁹⁰ a montré qu'une plus grande proportion de cellules affichant le marqueur d'apoptose Capsase-3 était présente chez les enfants ENI comparativement aux enfants non exposés. La Caspase-3

est nécessaire dans l'apoptose enclenchée par la voie Fas²¹². L'exposition aux ARV menait à une distribution plus serrée des fréquences de cellules B en apoptose chez les enfants ENI et celles-ci tendaient à être plus importantes que chez les enfants ENI non exposés aux ARV. Cela pourrait indiquer un impact des ARV sur la viabilité des lymphocytes B à long terme puisque les enfants au sein de cette étude étaient âgés de 6 à 18 ans. Bien que le mécanisme n'est pas très bien compris, une telle apoptose a déjà été aussi rapportée chez les lymphocytes T des enfants ENI²¹³.

1.3.10 Autres déterminants cliniques

Parmi les autres attributs cliniques des enfants ENI, des études ont mis en lumière des altérations dans l'évolution de la croissance intra-utérine et postnatale²¹⁴ (revu dans¹³⁸), des perturbations métaboliques reliées aux lipides²¹⁵ et à l'insuline²¹⁶ ainsi que des troubles de neuro-développement²¹⁷ (revu dans²¹⁸). De plus, des compartiments leucocytaires autres que les lymphocytes B et T présentent des particularités notables⁹⁹ (revu dans^{146, 192}).

1.5 Hypothèse et Objectifs

À la vue de l'ensemble des études menées auprès des enfants ENI, il est évident que ces derniers présentent des perturbations cliniques préoccupantes malgré l'absence d'infection par le VIH. La source exacte de ces multiples particularités semble être multifactorielle; les paramètres médicaux, le milieu pro-inflammatoire placentaire et le statut de l'infection au VIH de la mère ont été mis en cause dans plusieurs des problèmes observés, de même que les conditions de vie, les ARV et le mode d'alimentation.

Des travaux exhaustifs ont été effectués sur le compartiment lymphocytaire T de ces enfants, alors que la caractérisation du compartiment lymphocytaire B et de sa fonctionnalité reste sous-évaluée et conflictuelle. De plus, la majorité des preuves d'une efficacité de la réponse vaccinale des enfants ENI est basée sur des indicateurs sériques, alors que peu se sont interrogés sur la fréquence des lymphocytes B spécifiques à un antigène donné et sur la relation de cette fréquence avec celles des lymphocytes B capables d'être activés et de sécréter des anticorps à la suite d'une stimulation.

En prenant en considération d'une part les résultats des études de Kakkar *et al.*¹⁹³ et d'autre part les relations entre les perturbations du compartiment cellulaire T, la virémie et le compte de CD4 maternels, nous avons émis comme hypothèse que, chez la mère, un compte de CD4 inférieur à la normale et une CV détectable en grossesse affectaient le développement et la fonctionnalité du profil lymphocytaire B des nourrissons ENI en promouvant une activation et une maturation précoce, ainsi qu'une altération des fonctions du répertoire B mémoire face à la vaccination. Afin de mieux comprendre l'impact de la sévérité des paramètres maternels relatifs à la CV et à l'immunité cellulaire T CD4⁺ sur le compartiment lymphocytaire B et de ses attributs dans le contexte d'une réponse vaccinale, nous avons entrepris une caractérisation numérique des sous-populations cellulaires B chez ces enfants, mesuré la fréquence de lymphocytes B spécifiques au tétanos et évalué la capacité des cellules mémoires spécifiques au tétanos à sécréter des anticorps suivant une stimulation.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1 Description de la cohorte

2.1.1 Portrait des enfants ENI

Suite à l'acceptation par le Comité d'éthique de la recherche du Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine du projet *Anomalies Immunitaires chez les nourrissons et les enfants exposés au VIH mais non infectés*, 78 couples mère-enfant ont été recrutés de septembre 2014 à janvier 2017. Ce recrutement s'est effectué par le biais de la cohorte mère-enfant du CMIS du CHU Sainte-Justine. Pour participer à l'étude, la mère devait, d'une part, être âgée de 18 ans et plus au moment du recrutement et devait donner un consentement libre et éclairé. D'autre part, l'enfant devait être né à terme, soit après 37 semaines de gestation.

De cette cohorte de 78 couples mères-enfants, 68 d'entre eux ont fait l'objet de l'étude présentée au sein de ce mémoire (Fig.9). Dans les premières semaines de vie, tous les enfants ont reçu un traitement prophylactique d'antirétroviraux. Chez 65 enfants, ce traitement était constitué d'AZT et de 3TC. Chez les trois autres enfants, le régime a compris ces deux antirétroviraux, mais également du raltégravir (RLT), de la NVP ou du RLT combiné à du lopinavir/ritonavir (LPV/r). Le Tableau I fait le portrait détaillé des caractéristiques des enfants participant à cette étude.

2.1.2 Portrait maternel

Des 68 couples mères-enfants participant à l'étude, trois femmes sont mères de deux enfants chacune, totalisant 65 mères distinctes. Le Tableau II présente un portrait des mères des enfants ENI.

Tableau I. Profil clinique des enfants ENI et informations relatives à leur naissance

Sexe			Mode d'accouchement		
Sexe	Nombre absolu d'enfants	Nombre relatif d'enfants (%)	Mode d'accouchement	Nombre absolu de naissances	Nombre relatif de naissances (%)
Féminin	38	55,88	Voie basse	39	57,35
Masculin	30	44,12	Césarienne d'urgence	15	22,06
Total	68	100	Césarienne planifiée	14	20,59
			Total	68	100

Poids à la naissance						
Tranche de poids (g)	Nombre absolu d'enfants	Nombre relatif d'enfants (%)	Moyenne (g)	Médiane (g)	Poids minimal (g)	Poids maximal (g)
1500-1999	0	0,00				
2000-2499	2	2,94				
2500-2999	21	30,88				
3000-3499	21	30,88	3 311	3 258	2 278	5 160
3500-3999	18	26,47				
4000-4499	4	5,88				
4500-4999	1	1,47				
5000-5499	1	1,47				
Total	68	100				

Âge gestationnel à la naissance						
Tranche de temps (sem)	Nombre absolu d'enfants	Nombre relatif d'enfants (%)	Moyenne (sem)	Médiane (sem)	Temps minimal (sem)	Temps maximal (sem)
[37-38[10	14,71				
[38-39[15	22,06				
[39-40[17	25,00	39,32	39,29	37,29	41,29
[40-41[22	32,35				
41 et plus	4	5,88				
Total	68	100				

Durée du traitement prophylactique						
Tranche de temps (sem)	Nombre absolu d'enfants	Nombre relatif d'enfants (%)	Moyenne (sem)	Médiane (sem)	Temps minimal (sem)	Temps maximal (sem)
[4-5[13	19,12				
[5-6[2	2,94				
[6-7[52	76,47	5,62	6,00	4,00	8,00
[7-8[0	0,00				
8	1	1,47				
Total	68	100				

Tableau II. Profil démographique et clinique des mères des enfants ENI

Origine ethnique		
Origine ethnique	Nombre absolu de mère	Nombre relatif de mères (%)
Africaine	38	58,46
Antillaise	11	16,92
Caucasienne	9	13,85
Latino-américaine	3	4,62
Arabe	1	1,54
Mulâtre	1	1,54
Asiatique	2	3,08
Total	65	100

Régime maternel d'antirétroviraux durant la grossesse		
Classe d'antirétroviraux	Nombre absolu de grossesses	Nombre relatif de grossesses (%)
Aucun traitement	1	1,47
INTI combinés et IP	35	51,47
INTI combinés et combinaison avec INNTI	3	4,41
INTI combinés avec ITBI	9	13,24
INTI et combinaison avec INNTI	2	2,94
Changements de régime	14	20,59
Autres	4	5,88
Total	68	100

Âge maternel à l'accouchement						
Tranche d'âge (an)	Nombre absolu de grossesses	Nombre relatif de grossesses (%)	Moyenne (an)	Médiane (an)	Âge minimal (an)	Âge maximal (an)
18-24	7	10,29	32	33	20	44
25-29	16	23,53				
30-34	22	32,35				
35-39	17	25,00				
40-44	6	8,82				
45-49	0	0,00				
Total	68	100				

Zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse						
Charge virale (copies/ml)	Nombre absolu de grossesses	Nombre relatif de grossesses (%)	Moyenne (copies/ml)	Médiane (copies/ml)	Charge virale minimale (copies/ml)	Charge virale maximale (copies/ml)
≤ 40	42	61,76	6 234	40	40	140 573
>40	26	38,24				
Total	68	100				

Nadir du compte CD4 maternel durant la grossesse						
Compte CD4 (cellules/mm3)	Nombre absolu de grossesses	Nombre relatif de grossesses (%)	Moyenne (cellules/mm3)	Médiane (cellules/mm3)	Compte CD4 minimal (cellules/mm3)	Compte CD4 maximal (cellules/mm3)
<500	38	55,88	480	462	45	1 242
≥500	30	44,12				
Total	68	100				

Légende : INTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse; IP : Inhibiteur de protéase; INNTI : Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse; ITBI : inhibiteur du transfert de brin de l'intégrase

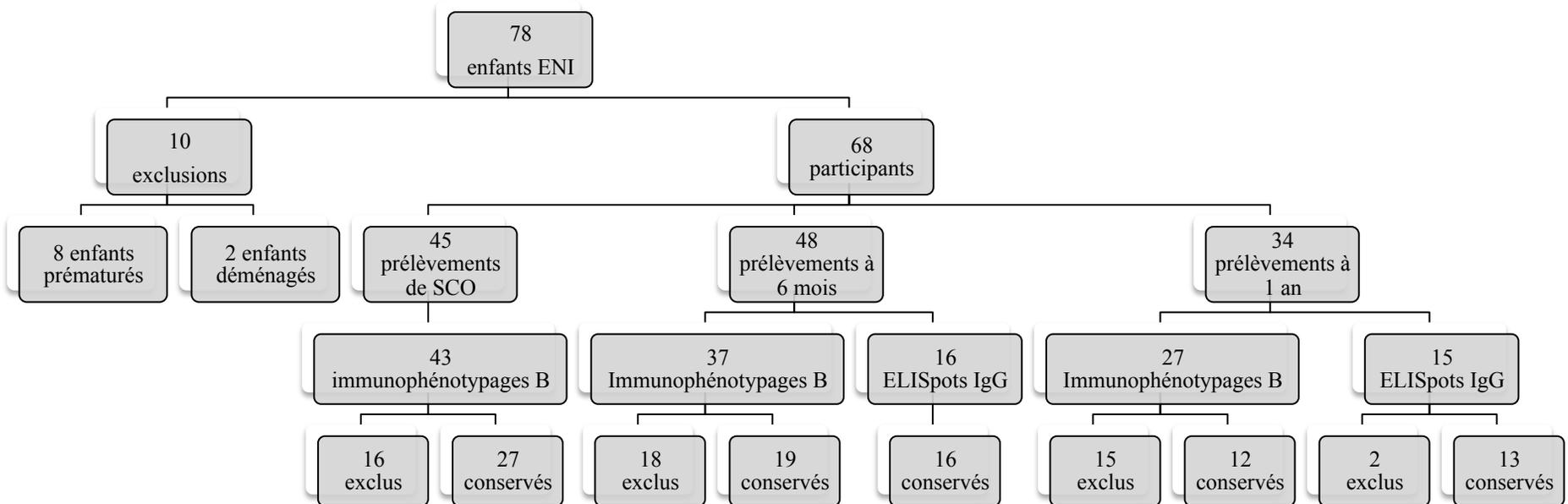


Figure 9. Représentation globale de la cohorte d'enfants ENI et des expériences d'immunophénotypage B et d'ELISpot effectuées

2.2 Vaccination et modalités relatives aux prélèvements et au traitement des échantillons sanguins

2.2.1 Vaccination des enfants

À l'exception d'un sujet, l'ensemble des enfants de la cohorte a suivi le programme québécois d'immunisation en vigueur durant leur participation au projet de recherche. Le calendrier des vaccins prévus dans la première année de vie est présenté au Tableau III²¹⁹. L'immunisation contre le tétanos s'est faite par le biais de l'injection de la formule combinée Infanrix-Hexa (DIN 02253852, GlaxoSmithKline Inc, Laval, QC) à 2, 4 et 12 mois et par les vaccins combinés Infanrix-IPV/HIB (DIN 02257122, GlaxoSmithKline Inc) ou Pediacel (DIN 02243167, Sanofi Pasteur, Toronto, ON) à 6 mois.

Tableau III. Programme québécois d'immunisation durant la première année de vie

Maladies ciblées	Âge de l'administration (mois)			
	2	4	6	12
Diphtérie; Hépatite B; Coqueluche; Polio; Tétanos; Infections à <i>Hemophilus influenza</i> de type B	X	X		
Diphtérie; Coqueluche; Polio; Tétanos; Infections à <i>Hemophilus influenza</i> de type B			X	
Pneumocoque	X	X		
Infections à Rotavirus	X	X		
Méningocoque de sérogroupe C				X
Rougeole; Rubéole; Oreillons				X

2.2.2 Déroutement des prélèvements sanguins

Trois échantillons de sang ont été prélevés durant la première année de vie. Les prélèvements sous l'appellation « 6 mois de vie » ont rassemblé tous les échantillons prélevés entre 5 mois et 27 jours d'âge et 8 mois et 29 jours. Au-delà de cet âge et jusqu'à 13 mois et

14 jours, les prélèvements sont sous l'enseigne de « 12 mois de vie ». Le sang de cordon ombilical (n=45) des enfants a été recueilli dans les sacs de collecte de sang contenant une solution de citrate, phosphate et dextrose (CPD) comme anticoagulant (Fresenius Kabi Canada, Toronto, ON). À 6 mois (n=48) et 12 mois de vie (n=34), une ponction veineuse a été réalisée dans des tubes de prélèvement contenant de l'acide d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pour collecter un maximum de 10 ml de sang selon le poids de l'enfant.

2.2.3 Isolation et congélation des cellules mononucléées du sang de cordon ombilical et du sang périphérique et du plasma

Le plasma et les cellules mononucléées du sang de cordon ombilical (CBMC, *cord blood mononuclear cells*) ou du sang périphérique (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) ont été isolés dans un intervalle de 6 h suivant la collecte. Le plasma a été recueilli à la suite d'une centrifugation de 10 min à 1500g du sang complet et congelé à -80 °C. Il a ensuite été remplacé par un volume équivalent de milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (WISSENT, Saint-Jean-Baptiste, QC).

Suite à la récupération du plasma, les CBMC et les PBMC ont été séparées par gradient de densité. Pour cela, le sang a été dilué 1:2 avec du RPMI et a été très délicatement couché sur du milieu de séparation de lymphocytes (Corning, Tewksbury, MA) dans un tube conique. Autrement, des tubes de type Leucosep™ (Greiner Bio-One, Monroe, NC) ont été utilisés. Ces derniers permettent de conserver distincts le milieu de séparation et le sang déposé au-dessus grâce à la présence d'une membrane poreuse de polyéthylène de haut grade qui divise les deux substances. Ainsi, le sang peut être versé sans attention particulière. L'utilisation de tels tubes ne requiert pas une dilution 1:2 du sang avec du RPMI. Ensuite, les tubes ont été centrifugés pendant 30 min à 1000g avec une faible vitesse de décélération. Puis, les PBMC et les CBMC ont été collectés et lavés à trois reprises avec du RPMI supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (WISSENT) et de 0,1 % de gentamicine à 50 mg/ml (WISSENT); milieu nommé, pour la suite du mémoire, R10. Une fois les lavages terminés, les cellules ont été mises en

suspension avec du milieu de congélation composé à 90 % de SVF et à 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Millipore Sigma, St-Louis, MO). Ensuite, elles ont été transférées dans des tubes cryogéniques et congelées à -80 °C pour une durée de 4 h à 7 jours avant d'être entreposées dans l'azote liquide.

2.3 Production, biotinylation et purification du fragment C du toxoïde tétanique

Les protocoles de production, biotinylation et purification du fragment C du toxoïde tétanique (TTCF, *Tetanus toxin C Fragment*) ont été mis au point par Mme Catherine Gravel au cours de sa maîtrise, en collaboration avec le Dr Étienne Gagnon de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC, Montréal, QC). Le protocole de production du TTCF a été développé par l'équipe du Dr Kai Wucherpfennig (Institut de cancérologie Dana-Farber, Boston, MA) qui est à la base de la technique de détection des lymphocytes B mémoires spécifiques contre un antigène par cytométrie²²⁰. Afin de restreindre le temps et le matériel nécessaires à la production protéique et de faciliter les manipulations²²¹, une biotinylation *in vivo* a été exécutée pour le TTCF. Ce protocole provient des travaux de l'équipe du Dre Anette Stryhn Buus (Copenhague, DK) portant sur l'utilisation des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I biotinylés pour déterminer la présence de lymphocytes T spécifiques²²¹.

2.3.1 Transformation bactérienne

Pour accomplir la production et la biotinylation du TTCF, il a fallu procéder à une transformation bactérienne d'*E. coli* BL21 (DE3) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) par la méthode de choc thermique avec les vecteurs d'expression pET15b-TTCF et pET41a(+)-BirA à un ratio 5:1. Le premier vecteur, gracieusement fourni par le Dr Kay Wucherpfennig, a été construit à partir du plasmide pET15b (Millipore Sigma) dans lequel un fragment de 1450 paires de base (pb) a été inséré au niveau des sites de restriction des

enzymes BamH1 et NdeI. Ce fragment contenait la séquence de la protéine TTCF rattachée à un site de biotinylation et à une étiquette de polyhistidine. Cette dernière a permis de récupérer la protéine TTCF par chromatographie sur colonne lors de sa purification. Ce vecteur est également doté d'un gène de résistance à l'ampicilline. Le second vecteur, pET41a⁺BirA, a été développé à partir du plasmide pET41a(+) (Millipore Sigma) et de la séquence de l'enzyme BirA du plasmide pET21a-BirA (Addgene, Cambridge, MA) par Mme Catherine Gravel²²². Il contient à la fois la séquence codant pour l'enzyme BirA, une séquence GST et un gène de résistance à la kanamycine (Fig. 10). Suivant la transformation, la suspension bactérienne a été mise en culture 16h à 37 °C sous agitation dans 50 ml de bouillon de lysogénie (LB, *lysogeny broth*) additionné d'ampicilline et de kanamycine. Ces deux antibiotiques avaient pour but de sélectionner les bactéries proprement transformées par les deux vecteurs d'intérêt (Fig.11).

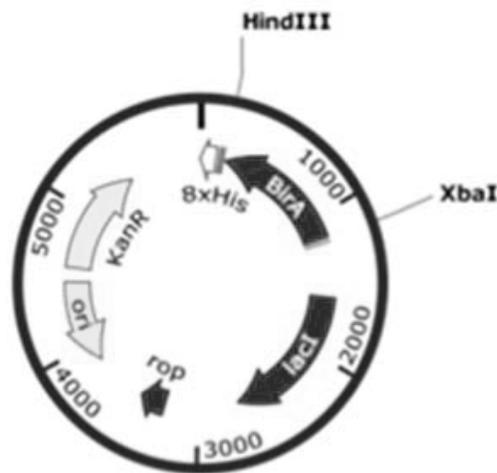


Figure 10. Plasmide pET41(a)+ avec l'insertion BirA

Note : Le plasmide de 5962 pb comprend un gène de résistance à la kanamycine, ainsi que le gène de l'enzyme BirA de 984 pb entre les sites de restriction des enzymes HindIII et XbaI.

Source : Gravel C. Construction du plasmide pET41-BirA. Anomalies immunitaires chez les enfants exposés au VIH mais non infectés. Papyrus: Université de Montréal; 2015. p. 38. *Reproduite et modifiée avec la permission de Mme Catherine Gravel*

2.3.2 Induction protéique et biotinylation *in vivo*

Suivant l'incubation de 16 h, une expansion de la culture bactérienne a été effectuée en la transférant dans 450 ml de milieu de culture *Super Broth* à pH 7.4 (3,2 % tryptone; 2,0 % extrait de levure; 0,5 % NaCl; 5 ml/L NaOH à 1 M) additionné, au moment de l'utilisation, de 6 ml de MgSO₄, de 10 ml de sucrose filtré, d'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml et de kanamycine à 50 µg/ml. Une incubation à 37 °C avec agitation a été maintenue jusqu'à ce que la suspension atteigne une densité optique de 1 (Fig. 11).

In vivo, l'expression des protéines TTCF et BirA a été induite par 1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 37 °C pendant 6 h. L'ajout de la biotine (Millipore Sigma) à une concentration de 100 mg/L s'est accompli simultanément à l'induction protéique pour optimiser la biotinylation du TTCF par BirA dans les bactéries. Une fois l'induction et la biotinylation finalisées, la suspension bactérienne a été centrifugée à 4000g pendant 20 min et les culots ont été mis, à sec, à -80 °C jusqu'au moment de la purification (Fig. 11).

2.3.3 Isolation et purification du TTCF

Afin de récupérer le TTCF biotinylé, le culot bactérien a été mis en suspension dans le réactif d'extraction B-PER (Thermo Fisher Scientific) à raison de 5 ml/g de culot bactérien et une incubation de 15 min avec légère agitation a suivi. Ensuite, le lysat bactérien a été centrifugé à 16 000g pendant 20 min. Puis, le surnageant de lyse été mis sur colonne d'affinité HisPur NI-NTA (Thermo Fisher Scientific). Les tampons d'équilibration, de lavage et d'élution avaient des concentrations respectives de 10 mM, 25 mM et 250 mM d'imidazole. Chronologiquement, la colonne a été équilibrée, chargée avec la solution protéique diluée préalablement 1:2 avec du tampon d'équilibration et lavée à cinq reprises avant que la protéine TTCF soit éluee et recueillie. La colonne a finalement été lavée avec une solution d'acide 2-(N-morpholino) ethanesulfonique (MES) et de l'eau ultrapure (Fig. 11).

Tout au long du processus de purification par chromatographie sur colonne, des échantillons ont été collectés pour vérifier, sur gel, la qualité des lavages avant et après chargement du surnageant de lyse, ainsi que la concentration des fractions issues l'élution de la protéine d'intérêt. Également, un dosage par test de Bradford a permis de surveiller la concentration protéique des fractions de l'élution.

2.3.4 Validation de la purification, de la biotinylation et stockage du TTCF

Une validation de l'isolation du TTCF (52 kDa) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 4-20 % préfabriqué de type Mini-Protean TGX (Bio Rad, Mississauga, ON) a été exécutée. Pour ce faire, les fractions recueillies durant la purification ont été diluées 1:2 avec le tampon Laemmli 2X (Bio Rad). La migration s'est effectuée avec un tampon de migration Tris/glycine/SDS à 200 V durant 30 à 40 min. Le gel a ensuite été coloré pendant 1 h avec une solution de Bleu de Coomassie (50 % Méthanol; 40 % H₂O; 9,75 % acide acétique; 0,25 % *Coomassie Brilliant Blue R250*). À la suite de cette coloration, le gel a été décoloré pendant 12 h dans la solution de décoloration (50 % Méthanol; 40 % H₂O; 10 % acide acétique) Le poids moléculaire des bandes a été identifié grâce à l'échelle de référence *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio Rad). Après cette vérification, la concentration du TTCF dans les fractions d'élution a été quantifiée par spectrophotomètre NanoVue 4282 (GE Healthcare Life Sciences, Mississauga, ON) et ajustée à 1 mg/ml dans du PBS. La mise en conservation de la solution protéique s'est effectuée par l'ajout d'azoture de sodium à une concentration finale de 0,02 %.

Quant à la validation de la biotinylation, elle a été observée par migration sur gel suite à une incubation de 1 h de différents ratios de la protéine TTCF avec de la streptavidine (Amresco, Solon, OH). L'oligomérisation du TTCF avec la streptavidine se remarque par un décalage de la bande du TTCF sur le gel. Des bandes à 112 kDa, 164 kDa, 216 kDa et 268 kDa indiquent respectivement un monomère, un dimère, un trimère et un tétramère. La procédure d'électrophorèse est la même que celle présentée plus haut.

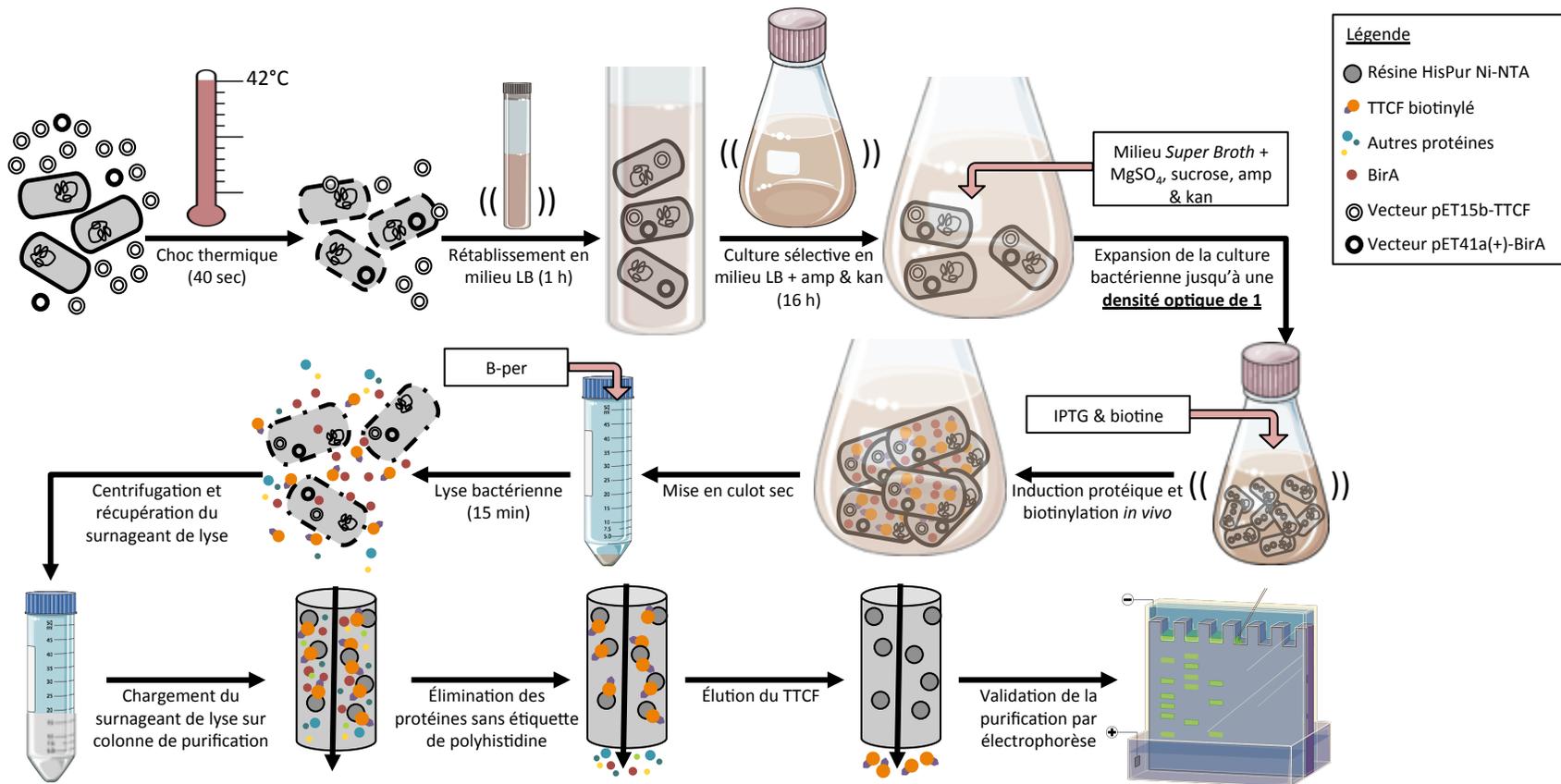


Figure 1. Représentation des différentes étapes de production, biotinylation et purification du fragment C du toxoïde tétanique

Légende : Amp : Ampicilline; Kan : Kanamycine, LB : Lysogeny broth; TTCF : Tetanus toxin C fragment

Source : Les images relatives au matériel de laboratoire (tubes d'échantillon, tube de 50 ml, gel d'électrophorèse et bouteille) sont en libre usage sous la licence *Creative Common 3.0* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) et proviennent de la banque d'illustrations médicales des Laboratoires Servier (<https://smart.servier.com/>). La teinte des illustrations issues de cette banque d'images a été légèrement modifiée à des fins d'harmonisation. Les illustrations peuvent être retrouvées dans la banque d'images sous les titres suivants : Tubes d'échantillon et de 50 ml : *Tube*; Gel d'électrophorèse : *Gel electrophoresis*; Bouteille : *Bath*.

2.5 Immunophénotypage lymphocytaire B

L'étude des sous-populations lymphocytaires B s'est faite de concert avec l'évaluation de la présence de lymphocytes B spécifiques contre le TTCF. Au total, 43, 37 et 27 marquages ont été effectués sur les cellules des enfants ENI à la naissance, à 6 mois et à 12 mois respectivement. Cependant, des anomalies avec les fluorochromes en tandem Allophycocyanine (APC)-H7 et Phycoérythrine (PE)-Cy7 ont été discernées, de manière sporadique, dans les résultats à partir du 16 juin 2016. Subséquemment, la compagnie BD Biosciences a annoncé un rappel sur ces deux produits ainsi que sur l'anti-CD10 humain Alexa Fluor 700 (AF700). Par précaution, l'ensemble des marquages réalisés du 16 juin 2016 jusqu'à l'arrêt forcé des expérimentations en janvier 2017 a été retiré des analyses finales. En raison des exclusions, seulement 27 échantillons de sang de cordon, 19 échantillons à 6 mois et 12 échantillons à 12 mois ont été comptabilisés (Fig. 9). De plus amples informations sur la nature des anomalies sont données à la section 3.2.1

2.5.1 Décongélation cellulaire

Dès leur sortie de l'azote liquide, les PBMC et les CBPM ont été décongelés rapidement dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit glaçon (<1 min). Les cellules ont été ensuite transférées dans un tube conique de 50 ml, et du R10 chaud a été ajouté à celles-ci progressivement et sous agitation de la manière suivante: 5 ml ajoutés au goutte à goutte, 10 ml ajoutés à une vitesse de 5 gouttes par 5 gouttes, 20 ml ajoutés à un rythme de 1 ml à la fois et 5 ml ajoutés en jet direct. Une fois le volume de 40 ml atteint, les suspensions cellulaires ont été centrifugées pendant 10 min à 526g et lavées à nouveau avec 10 ml de R10.

2.5.2 Caractérisation des sous-populations lymphocytaires B

Suivant la décongélation, les culots cellulaires ont été mis en suspension dans 5 ml de R10 pour subir un traitement de 5 min avec 250 unités de benzonase nucléase (Millipore

Sigma) d'une pureté >99 %. Une centrifugation de 5 min à 526g a subséquemment été réalisée avant de procéder à un blocage des récepteurs Fc de 20 min avec du SVF. Les cellules ont ensuite été lavées avec du R10, suspendues à nouveau dans 200 µl de tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate Buffered Salin*) (WISSENT) contenant 5 % de SVF, puis finalement marquées pendant 30 min avec l'ensemble des anticorps présentés au Tableau IV. Il est à noter qu'un mélange de tous les anticorps est préparé avant d'être distribué sur chaque échantillon cellulaire pour s'assurer d'un marquage uniforme. Ce mélange est également filtré (0,45 µm) afin de restreindre la présence d'agrégats.

Suite à cette incubation, les cellules ont été lavées avec du PBS, puis mises en suspension dans 300 µl de PBS avant d'être analysées à l'analyseur BD LSRFortessa (BD Biosciences, Mississauga, ON). Les populations lymphocytaires ont été définies tel que présenté à la Figure 12. La position des fenêtres pour délimiter et interpréter les populations cellulaires a été fondée sur les résultats d'une expérience de *Fluorescence Minus One* (FMO) exécutée par Mme Catherine Gravel. Cette expérience consiste à mélanger tous les anticorps conjugués inscrits dans le panneau à l'exception de celui d'intérêt. Ainsi, il est possible de déterminer précisément la position d'une population positive (Fig.13).

Tableau IV. Panneau d'anticorps monoclonaux conjugués et des réactifs utilisés pour l'immunophénotypage lymphocytaire B

Utilité	Antigène ciblé	Fluorochrome	Clone	Volume employé par réaction (µl)	Fournisseur
Marqueurs d'exclusion	CD3 humain	PerCP	UCHL1	4,4	Biologend
	CD14 humain	PerCP	MφP9	4,4	BD Pharmingen
	CD16 humain	PerCP	3G8	4,4	Biologend
Identification de la lignée lymphocytaire B	CD19 humain	BV421	HIB19	22,0	BD Biosciences
Identification des sous-populations lymphocytaires B	CD10 humain	AF700	H10a	4,4	BD Pharmingen
	CD20 humain	APC-H7	2H7	4,4	BD Biosciences
	CD21 humain	PE-Cy7	B-ly4	8,8	BD Biosciences
	CD27 humain	FITC	M-T271	44,0	BD Pharmingen
Isotypie du RCB	IgM humain	APC	G20-127	22,0	BD Pharmingen
Spécificité du RCB	TTCF biotinylé	Streptavidine-PE	NA	NA	Thermo Fisher Scientific

Note : Une réaction comprend en moyenne 5×10^6 PBMC

Légende : CD : Cluster de différenciation; NA : non applicable; RCB : Récepteur des cellules B; PerCP : Périidine-Chlorophylle-Protéine; BV421 : Brilliant Violet 421; AF700 : Alexa Fluor 700; APC : Allophycocyanine, PE : Phycoérythrine-Cy7; FITC : Fluorescein isothiocyanate; TTCF : Tetanus toxin C fragment; Ig : Immunoglobuline

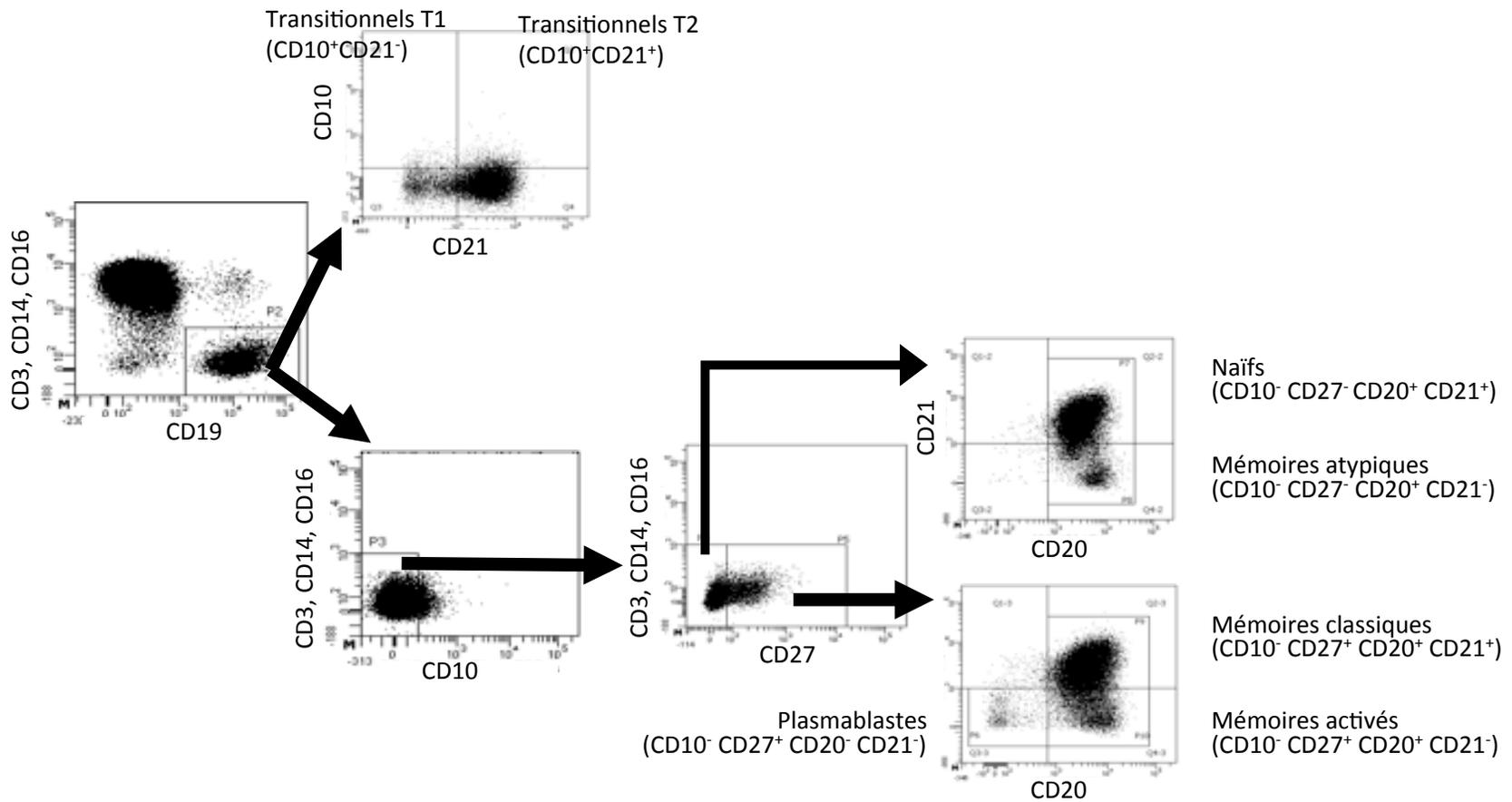


Figure 12. Stratégie d'analyse hiérarchique des sous-populations lymphocytaires B

Note : Dans les lymphocytes B CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD16⁻: **Transitionnels** CD10⁺(T1: CD21⁻; T2: CD21⁺), **Naïfs** (CD10⁻ CD27⁻ CD20⁺ CD21⁺), **Mémoires atypiques** (CD10⁻ CD27⁻ CD20⁺ CD21⁻), **Mémoires classiques** (CD10⁻ CD27⁺ CD20⁺ CD21⁺), **Mémoires activés** (CD10⁻ CD27⁺ CD20⁺ CD21⁻), **Plasmablastes** (CD10⁻ CD27⁺ CD20⁻ CD21⁻). Les marqueurs CD3, CD14 et CD16 sont absents chez les lymphocytes B et permettent d'exclure, en outre, les lymphocytes T, les macrophages, les cellules Natural Killer (NK) et les neutrophiles. Il est à noter que l'expression de l'IgM a été évaluée chez toutes les sous-populations mentionnées ci-haut.

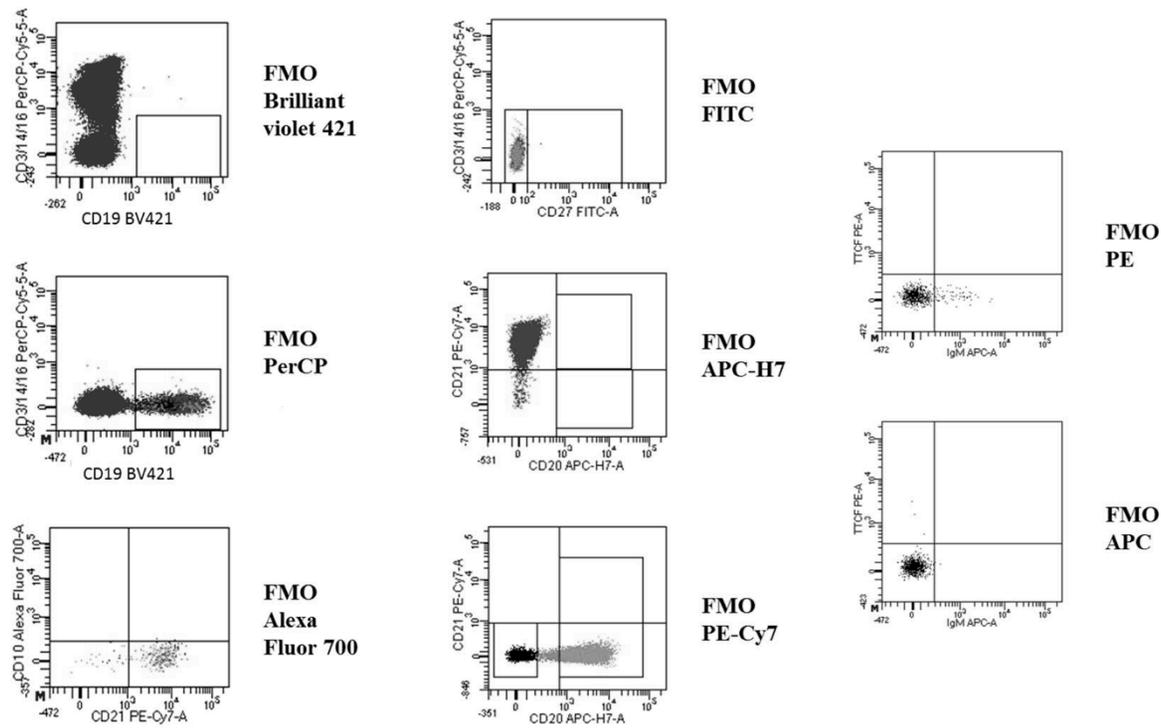


Figure 13. Établissement des barrières des sous-populations lymphocytaires B

Note : La détermination des positions des barrières pour délimiter chaque sous-population lymphocytaire a été effectuée grâce à une expérience de *Fluorescence Minus One* (FMO)

Légende : PerCP : Péroxydase-Chlorophylle-Protéine; BV421 : Brilliant Violet 421; AF700 : Alexa Fluor 700; APC : Allophycocyanine, PE: Phycoérythrine-Cy7; FITC : Fluorescein isothiocyanate

Source : Gravel C. Contrôles FMO du marquage des lymphocytes B. Anomalies immunitaires chez les enfants exposés au VIH mais non infectés. Papyrus: Université de Montréal; 2015. p. 51, *Reproduite et modifiées avec la permission de Catherine Gravel.*

2.5.3 Évaluation de la réponse vaccinale contre le tétanos

L'étude de la présence de lymphocytes B spécifiques contre le tétanos chez les enfants ENI se faisait simultanément aux expériences d'immunophénotypage lymphocytaire B. Dans le but de permettre une plus grande avidité dans les complexes anticorps-antigène et donc une meilleure détection des lymphocytes B spécifiques au tétanos^{220, 221}, une oligomérisation des TTCF biotinylés grâce à la streptavidine a été exécutée. Avant utilisation, la streptavidine conjuguée à la PE (SAPE) premium grade (250 kDA) à 1 mg/ml (Thermo Fisher Scientific) a été filtrée à une grosseur de 0,45 µm afin de restreindre la présence d'agrégats. Suite à cette filtration, 14 µl de SAPE ont été mélangés à 4,8 µl de TTCF biotinylé (52 kDA) à 1 mg/ml dans un microtube de 0,5 ml. Ces volumes permettent d'avoir un ratio moléculaire de 1 SAPE pour 2 TTCF biotinylé. Ce mélange a été ensuite mis sur glace et agité doucement pendant 90 min pour permettre l'oligomérisation.

Suite à cette incubation, le mélange a été complété à 100 µl avec du PBS et centrifugé pendant 10 min à 14 000g pour assoir les agrégats au fond du microtube. Après le lavage et la mise en suspension des PBMC suivant le blocage des récepteurs Fc, 5 µl de la solution d'oligomères de TTCF ont été ajoutés aux cellules. Ces suspensions ont par la suite été incubées 1h sur glace à l'obscurité avec une agitation légère. Ce n'est qu'après cette première incubation que le mélange d'anticorps pour le marquage lymphocytaire B a été ajouté pour une seconde incubation de 30 min.

Afin de valider la fonctionnalité des oligomères de TTCF lors des marquages, l'hybridome SA13 (ATCC, Manassas, VA) sécrétant des immunoglobulines (Ig) d'isotype G spécifiques contre la toxine tétanique a été employé. Ce contrôle a été traité comme l'ensemble des échantillons des enfants ENI, mais n'a pas été incubé avec le panneau d'anticorps destinés à marquer les sous-populations lymphocytaires B.

2.6 Évaluation de la capacité des lymphocytes B mémoires à sécréter des IgG spécifiques au TTCF par ELISpot

L'examen de la fonctionnalité des lymphocytes B mémoires chez les enfants ENI a été réalisé sur les échantillons à 6 et à 12 mois de vie et uniquement chez les enfants pour lesquels une anomalie lors de l'immunophénotypage B n'avait pas été observée. Ainsi, 16 tests ont été menés à 6 mois et 15 ont été faits sur les échantillons cellulaires de 12 mois. Les produits utilisés pour réaliser l'ensemble des expériences d'ELISpot provenaient tous de la trousse *Human IgG ELISpot Basic* (Mabtech, Cincinnati, OH) à moins d'avis contraire.

2.6.1 Élaboration des contrôles et des paramètres d'expérimentation

Pour chaque enfant ayant fait l'objet d'une ELISpot, trois répliques techniques ont été exécutées avec leurs PBMC stimulés pour évaluer la présence de lymphocyte B mémoires fonctionnels spécifiques au tétanos. Il en a été de même pour la détection de toutes les IgG sécrétés par les PBMC stimulés.

Plusieurs contrôles ont permis de valider des expériences encourues. Premièrement, pour évaluer si les réactifs et les milieux employés provoquaient des spots, quatre puits ont subi l'ensemble des étapes de l'ELISpot sans toutefois avoir de cellules. Deux d'entre eux ont reçu du TTCF et les deux autres, des anticorps biotinylés MT78/145. Deuxièmement, afin de vérifier la fonctionnalité du TTCF, trois puits par expérience ont été alloués à des PBMC stimulés prélevés chez un individu sain adulte vacciné depuis 6 semaines. Ce contrôle a également permis de vérifier si la variabilité était importante entre les résultats des multiples expériences ELISpot effectuées. Troisièmement, la validation de la stimulation a été à la fois inspectée par le contrôle positif mentionné ci-haut et, à un niveau individuel, par la présence de spots dans les puits servant à la détection de tous les IgG sécrétés par des PBMC stimulés des enfants ENI. Quatrièmement, un contrôle négatif, représenté par des PBMC issus d'un enfant non adhérent au programme d'immunisation, a permis de valider la spécificité des spots pour le TTCF. Trois répliques techniques ont été exécutées avec les PBMC stimulés de ce

contrôle. Finalement, pour chaque enfant ENI et pour le contrôle négatif, deux puits ont été ensemencés avec les PBMC stimulés et exposés à tous les réactifs à l'exception du TTCF et des anticorps MT78/145. Ainsi, les spots observés dans ces puits étaient issus de cellules ayant produit des anticorps spécifiques contre un autre antigène que le TTCF, tel que la streptavidine.

2.6.2 Stimulation des PBMC

Les échantillons de PMBC ont été décongelés comme il est décrit ci-haut (section 2.5.1). Suite à cette opération, les PBMC ont été mis en suspension dans 1 ml de R10 et incubés à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ le temps de faire les comptes cellulaires (30-50 min). Ensuite, la concentration cellulaire a été ajustée à 2,5 x10⁶ cellules/ml avec du R10 et les échantillons ont été divisés en deux. La première fraction a été stimulée avec de l'IL-2 à une concentration de 10 ng/ml et du résiquimod (R848) à une concentration de 1 µg/ml. Le R848 est un agoniste des récepteurs de type Toll (TLR, *Toll-like receptor*) 7 et 8 qui stimulent spécifiquement les lymphocytes B mémoires²²³. Il a été rapporté par Pinna et al. que la combinaison de l'IL-2 et du R848 permettait d'induire et de supporter une activation polyclonale au sein des lymphocytes B mémoires sans ou avec très peu d'effets sur les lymphocytes T, les lymphocytes B naïfs et les cellules NK²²³. Quant à la seconde fraction, elle a été laissée sans stimulant. Les PBMC ont finalement été incubés à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ pour 96 h.

2.6.3 Préparation de la plaque ELISpot

Contrairement au protocole habituel nécessitant de recouvrir les puits de l'antigène d'intérêt avant la mise en plaque des cellules, il a été choisi de revêtir les puits avec 20 µl d'anticorps monoclonaux de capture MT91/145 anti-IgG humain à une concentration de 15 µg/ml. Il était ainsi possible de travailler avec la même protéine TTCF biotinylée que celle utilisée pour l'immunophénotypage B.

Avant l'ajout des anticorps de capture, les plaques stériles MultiScreen-IP (MSIP) à 96 puits dotées d'une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF, *Polyvinylidene difluoride*) (Millipore Sigma) ont été traitées avec 20 µl d'éthanol à 35 % pendant <1 min. Puis, elles ont été lavées à cinq reprises avec du PBS. Une fois les anticorps de captures ajoutés, la plaque a été mise à 4 °C jusqu'à la mise en plaque des cellules le lendemain.

2.6.4 Mise en plaque des PMBC

Suivant les cinq lavages des plaques avec du PBS, elles ont été bloquées à 37 °C avec de R10 jusqu'à ce que les PBMC soient prêts à y être ajoutés (≥ 2 h). Concernant les PBMC, ils ont été d'abord traités avec 250 unités de benzonase nucléase (Millipore Sigma)/5 ml R10 pendant 5 min, puis lavés et finalement mis en suspension pour un compte cellulaire. La concentration cellulaire a alors été ajustée à 1×10^6 PBMC vivants/ml avec du R10 suite à un second lavage.

Dans les puits permettant la détection des cellules B mémoires spécifiques au TTCF ou la détection de spots non spécifiques au TTCF, 2×10^5 cellules stimulées ont été ajoutées. Pour les puits servant à la détection des plasmablastes spécifiques au TTCF, 2×10^5 PBMC non stimulés ont été mis. Un total de 5×10^3 cellules/puits a été nécessaire pour la détection de toutes les IgG sécrétés. Les puits ne recevant pas de PBMC ont été remplis avec du R10. Les plaques ont, par la suite, été incubées pendant 21 h à 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO₂.

2.6.5 Révélation

Suite au retrait des PBMC, les plaques ont été lavées à dix reprises avec du PBS additionné de 0,05 % Tween 20 (PBST) (Millipore Sigma) afin d'éliminer toute cellule ou tout débris cellulaire qui aurait pu adhérer à la membrane des puits. Selon qu'ils servaient à la détection de tous les IgG ou à l'identification des anticorps spécifiques au TTCF, les puits ont

reçu 100 µl de TTCF dilué à 0,2 µg/ml avec du PBS 0,5 % SVF ou 100 µl de l'anticorps biotinylé MT78/145 dilué à 1 µg/ml avec du PBS 0,5 % SVF. Les plaques ont, par la suite, été incubées durant 2 h avant d'être lavées à six reprises. Puisque le milieu de conservation du TTCF contenait de l'azoture de sodium et que ce produit affecte l'activité enzymatique de la peroxydase de raifort (HRP, *Horseradish peroxidase*)²²⁴⁻²²⁶, l'utilisation d'une streptavidine couplée à l'enzyme phosphatase alcaline (ALP, *phosphatase alcaline*) à une dilution 1:1000 a été de mise. Après une incubation de 1 h avec cette enzyme, les puits ont été rincés à trois reprises avec du PBST, suivi de trois lavages avec du PBS. La formule « plus » des substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphate et Nitro Blue Tetrazolium Chloride (BCIP/NBT-plus) a ensuite été ajoutée pour 4 min 30 s avant d'être éliminée par un rinçage à l'eau. Avant de lire les résultats, les plaques ont été séchées 12 h à l'air ambiant.

2.6.7 Lecture de la plaque

La capture d'image des puits, le compte automatisé des spots et le contrôle de qualité des comptes ont été effectués avec le logiciel CTL ImmunoSpot sur l'analyseur CTL ImmunoSpot S5 UV (Cellular Technology Ltd, Shaker Heights, OH).

2.7 Analyse des données

2.7.1 Analyse et expression des données de cytométrie

Toutes les sous-populations lymphocytaires B étaient considérées comme valides si elles étaient issues d'une population mère contenant au moins 500 évènements. Avec un tel nombre d'évènements, il y avait une stabilisation des fréquences analysées par l'appareil de cytométrie, ce qui assurait la validité de cette donnée. Lorsqu'une population cellulaire détenait moins de 500 évènements, les populations en découlant étaient disqualifiées et non comptabilisées dans les analyses finales. Entre $2,5 \times 10^6$ et $4,0 \times 10^6$ évènements totaux étaient acquis en cytométrie pour chaque enfant ENI, à moins qu'une très faible quantité de cellules ait été disponible pour la procédure.

La fréquence des lymphocytes B CD19⁺ est exprimée sous forme de pourcentage dans les lymphocytes. Celle des lymphocytes B transitionnels, naïfs, mémoires IgM⁻ et des plasmablastes est présentée sous forme de pourcentage dans les lymphocytes B CD19⁺. Quant aux cellules B expérimentées IgM⁺ et aux cellules B spécifiques au TTCF, leur abondance relative était exprimée sous forme de pourcentage dans leur sous-population mère (Exemple : la fréquence des lymphocytes B naïfs TCF7⁺ dans les lymphocytes B naïfs).

Les résultats ont été analysés à l'aide de la 8^e version du logiciel BD FACSDiva™ (BD Biosciences) et de FLOWJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR). Les analyses statistiques et la mise en forme des données ont été effectuées grâce à la 5^e version du logiciel Graphpad Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA). Deux types de stratification ont été employés pour comparer les fréquences des sous-populations lymphocytaires B des enfants ENI entre eux. D'une part, ces données ont été réparties en fonction du zénith de la CV maternelle durant la grossesse. Le premier groupe d'enfants a été exposé à une CV indétectable (≤ 40 copies/ml de plasma) durant toute la grossesse alors que le second groupe était issu de mères ayant eu au moins une CV détectable durant la gestation. D'autre part, les résultats ont été stratifiés en fonction du nadir du compte lymphocytaire T CD4⁺ durant la grossesse. Le premier groupe était constitué des enfants dont le nadir du compte lymphocytaire T CD4⁺ maternel était inférieur à 500 cellules/mm³ de sang et le second groupe comprenait le reste des sujets. La normalité de la distribution des valeurs a été évaluée par un test de D'Agostino-Pearson et devait avoir une valeur p supérieure à 0,05 pour qu'il soit considéré que les données suivaient une distribution gaussienne. La signification des résultats a été subséquentement analysée par un T-test si la distribution était gaussienne ou par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney dans le cas contraire. Une valeur p inférieure ou égale à 0,05 était considérée comme significative et aucune correction pour comparaison multiple n'a été appliquée.

2.7.2 Analyse des données d'ELISpot

Pour dénombrer les cellules formant des spots (CFS) véritablement spécifiques au TTCF chez les enfants ENI, la moyenne des spots issus de chacune des réactions suivantes a

été soustraite de celle notée pour les puits avec PBMC stimulés et TTCF : a) Réaction des PBMC stimulés en absence de TTCF et d'anticorps MT78/145 anti-IgG humain, b) Réaction des PBMC non stimulés en présence de TTCF et c) Réaction du TTCF et de l'anticorps MT78/145 anti-IgG humain en absence de PBMC. Aucun seuil de positivité n'a été imposé, puisque de faibles réponses étaient attendues chez les enfants ENI. Ainsi, une réponse était considérée comme valide si la moyenne des spots dans les puits avec PBMC stimulés et TTCF était toujours positive après la soustraction expliquée ci-haut.

Pour comparer la teneur en lymphocytes B mémoires étant capables, après stimulation, de sécréter des IgG spécifiques au TTCF chez les enfants ENI, les données ont été exprimées sous deux formes. La première est la méthode de présentation communément retrouvée dans la littérature et consiste à rapporter le nombre de CFS spécifiques au TTCF sur un million de PBMC ($\text{CSF}/1 \times 10^6 \text{ PBMC}$). Cette méthode permet d'avoir une valeur absolue du nombre de cellules B mémoires spécifiques chez un sujet et permet de mettre en valeur la différence de nombre de cellules B mémoires spécifiques à différents âges et entre des individus. Le désavantage de cette technique est qu'elle ne prend pas en compte que la stimulation peut souvent causer une expansion préférentielle ou une plus ou moins bonne expansion dépendamment de l'échantillon utilisé²²⁷. La seconde forme dans laquelle les lymphocytes B mémoires sécrétant des anticorps spécifiques au TTCF sont exprimés repose sur leur fréquence au sein des toutes les CFS (% CFS spécifiques au TTCF/CFS). Cette méthode permet de tenir compte d'une potentielle expansion non équitable des populations mémoires entre les différents patients et de la variation dans le nombre initial de cellules B mémoires entre les sujets²²⁷.

La variabilité entre les répliques techniques chez chacun des enfants ENI a été évaluée grâce à l'équation illustrée à la Figure 14. Cette équation est très appropriée dans un contexte où la variation entre les répliques peut être importante tout en ayant une faible médiane²²⁸. La pertinence de considérer la médiane plutôt que la moyenne réside dans le fait que la médiane ne serait pas affectée si une valeur d'une des répliques était aberrante. Le fait d'additionner 1 à

cette médiane permet d'éliminer les risques de division par zéro²²⁸. Selon le travail de Z. Moodie *et al.*, une variabilité obtenant un score entre 0,31 et 2,47 se trouve dans la moyenne de la variation observée globalement. Des données avec une variabilité de plus de 10 devraient, selon les auteurs, être rejetées²²⁸, ce qui a été appliqué dans ce projet.

$$\text{Variabilité} = \frac{\text{Variance}}{(\text{médiane} + 1)}$$

Figure 14. Équation relative à l'évaluation de la variabilité observée au sein des répliques techniques d'ELISpot

Les analyses statistiques et la mise en forme des données ont été également effectuées avec la 5^e version du logiciel Graphpad Prism (Graphpad Software). Les mêmes critères de stratifications et les mêmes tests de normalité et de significativité que ceux présentés au point 2.7.2 ont été employés.

2.7.2 Analyse de la corrélation des valeurs de cytométrie et d'ELISpot

Afin de tester si l'ensemble des lymphocytes B mémoires spécifiques au TTCF était en mesure d'être activé et de sécréter des anticorps, une analyse de corrélation a été effectuée par le biais du test de Spearman. Une relation de corrélation était considérée comme significative si la valeur p était inférieure ou égale à 0,05. Pour comparer les fréquences observées en cytométrie avec le nombre de CFS spécifiques au TTCF, le nombre de cellules B mémoires IgM⁻ TTCF⁺ observés en cytométrie a été exprimé par million de lymphocytes plutôt que par million de PBMC, puisqu'il n'était pas possible d'avoir une valeur juste du nombre de PBMC acquis par le cytomètre. Si le nombre de cellules B mémoires IgM⁻ TTCF⁺ observés en cytométrie avait été exprimé par million d'évènements acquis, cela aurait inclus tous les débris cellulaires captés par l'analyseur. Également, le nombre de cellules B mémoires IgM⁻ TTCF⁺ par million de lymphocytes comprend les lymphocytes B mémoires classiques, activés et atypiques.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Problématique relative aux fluorochromes APC-H7 et PE-Cy7

Comme annoncé à la section 2.5, des anomalies ont été observées lors de l'immunophénotypage B à partir du 16 juin 2016. Ces anomalies se présentaient comme un nuage d'évènements s'étendant en diagonale dans les cadrans des fluorochromes APC et PE. Après plusieurs essais pour en découvrir la source, il a été possible de déduire que le phénomène provenait d'un découplage des anticorps anti-CD20 humain APC-H7 et anti-CD21 humain PE-Cy7 simultanément dans un intervalle de temps très limité entre la fin du marquage et le passage au cytomètre (Fig.15). Un fluorochrome en tandem comme le sont l'APC-H7 et le PE-Cy7 se distingue des autres fluorochromes par le fait qu'ils sont composés de deux molécules fluorescentes dont l'une joue le rôle d'accepteur et l'autre le rôle de donneur. La formation de tels couples permet, par le principe de *Förster resonance energy transfer* (FRET), de modifier les longueurs d'onde émises normalement par les fluorochromes individuels. Autrement dit, lorsque le fluorochrome donneur est excité par un laser, il transfère son énergie au fluorochrome accepteur, qui lui-même émettra des photons²²⁹. Un découplage survient quand le fluorochrome accepteur connaît une perte d'émission et que le fluorochrome donneur se met à émettre lui-même des photons. Peu de temps après que nous ayons identifié le problème, BD Biosciences a annoncé un rappel sur les deux anticorps problématiques en indiquant qu'un changement d'un éclairage fluorescent à une source lumineuse DEL dans l'un de leurs nouveaux entrepôts était responsable de la perte de l'intégrité de plusieurs de leurs produits. Un remplacement des produits fautifs et un dédommagement ont été accordés au laboratoire. De ce fait, tous les marquages effectués entre le 16 juin 2016 et janvier 2017 ont été retirés des analyses finales. Il est cependant à noter que bien que le problème ait été remarqué pour la première fois en juin 2016, il est fort probablement que d'autres expériences antérieures à cette date aient été affectées. Il est, en effet, très difficile de percevoir l'anomalie quand seul l'un des deux anticorps conjugués découple et aucun test de qualité sur les lots reçus n'a été effectué avec des billes de compensation.

Échantillon 1: Aucune anomalie

Échantillon 2: Première acquisition

Échantillon 2: Seconde acquisition
(moins de 15 min après la fin de la première acquisition)

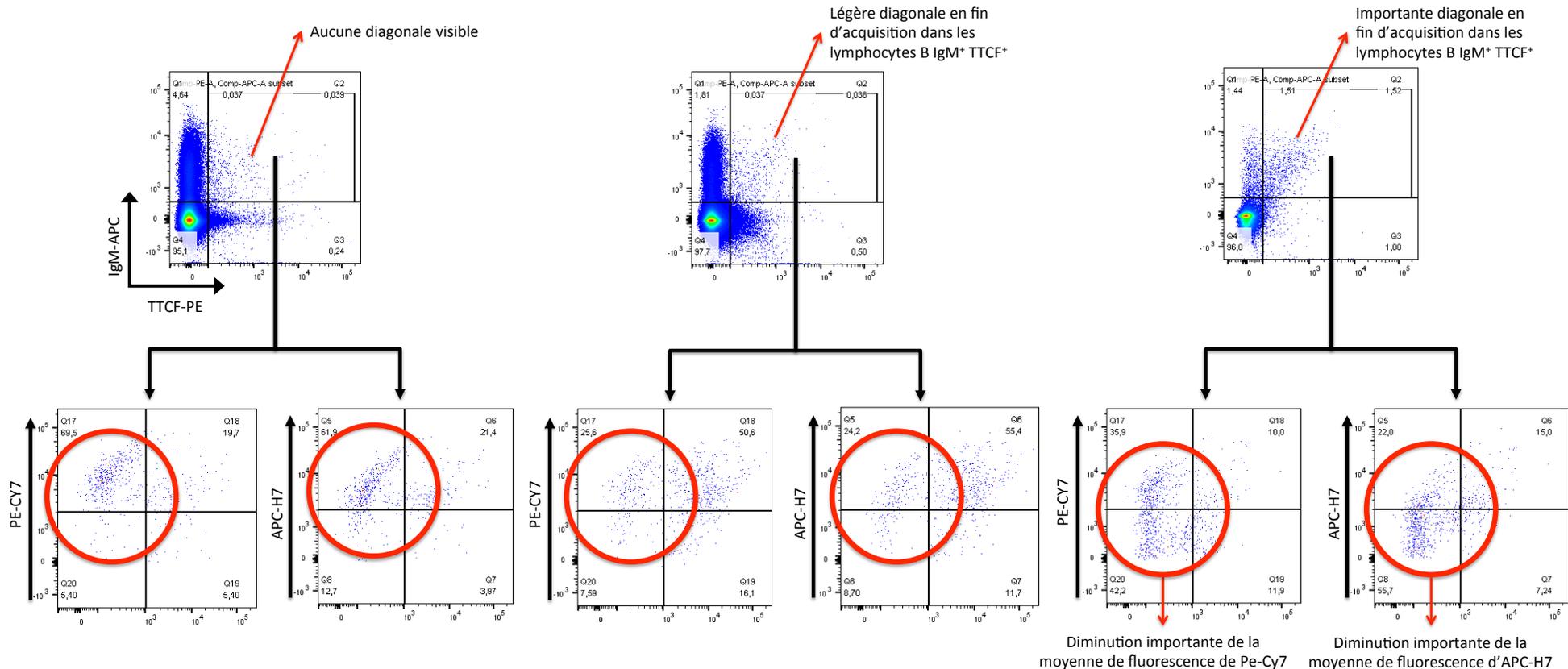


Figure 15. Représentation du découplage des anticorps APC-H7 et PE-Cy7 dans le cadre de l'immunophénotypage B

Note : L'échantillon 1 présente un marquage sans problème de découplage des anticorps APC-H7 et PE-Cy7. L'échantillon 2 a été passé au cytomètre à deux reprises. Le problème de diagonale a commencé à s'afficher vers la fin du premier temps d'acquisition. Une pause de 15 minutes a été faite afin de vérifier si les paramètres du cytomètre étaient en ordre. L'échantillon a ensuite été remis pour une seconde acquisition. Il est alors possible de voir un important découplage des deux anticorps, ce qui s'illustre par une diagonale dans les cadres IgM-APC⁺ TTCF-PE⁺

Légende : TTCF : Tetanus toxin C fragment; APC : Allophycocyanine; PE : Phycoérythrine

3.2 Immunophénotypage du compartiment lymphocytaire B

3.2.1 Caractérisation du profil lymphocytaire B des enfants ENI en fonction du zénith de la virémie maternelle en grossesse

Lorsque les enfants ENI sont divisés en fonction qu'ils aient été exposés ou non à une virémie maternelle détectable (>40 copies/ml) au cours de la grossesse, très peu de différences sont observables entre les deux groupes. Dans les sous-populations lymphocytaires classiques, une fréquence de lymphocytes B CD19⁺ significativement plus élevée est observée à la naissance chez les enfants issus de mères ayant eu une CV indétectable durant toute la grossesse (valeur P=0,0174). À l'inverse, ces enfants affichent une fréquence de plasmablastes significativement plus faible que les enfants exposés à une virémie détectable au cours de la grossesse (valeur P=0,0449). Ces divergences ne perdurent toutefois pas à travers le temps puisque dès l'âge de 6 mois, aucune distinction n'est notable entre les deux groupes d'enfants ENI (Fig.16 et Tab.V).

Conjointement à l'analyse ces populations classiques, la fréquence des lymphocytes matures expérimentés IgM⁺ au sein de leur population a été évaluée. Il est à noter qu'aucune fréquence valide n'a été retenue pour les plasmablastes et les lymphocytes mémoires activés IgM⁺ à la naissance, puisque moins de 500 événements ont été acquis dans les populations desquelles ils découlent. Qu'une seule dissimilitude est ressortie entre les deux groupes d'enfants. En effet, bien que la fréquence des lymphocytes B mémoires classiques IgM⁺ diminue avec le temps chez tous les enfants, à 12 mois, ceux venant de mères ayant eu un zénith de CV détectable durant la grossesse ont une perte moins drastique de ces cellules. Cela mène à une proportion significativement plus élevée des lymphocytes B mémoires classiques IgM⁺ (valeur P=0,0367) (Fig.17 et Tab VI).

Tableau V. Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse

Sous-populations lymphocytaires B		Sang de cordon			6 mois			12 mois		
		≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P	≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P	≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P
Lymphocytes B totaux	Moyenne (%)	13,1800	7,9770	0,0174	20,6700	20,9500	0,3837	23,6100	24,1800	0,4726
	Valeur minimale (%)	4,0710	2,9020		8,5180	6,2850		15,2400	12,6000	
	Médiane (%)	11,9300	6,2450		21,6400	17,8500		19,4200	23,6500	
	Valeur maximale (%)	27,4000	19,4800		28,6400	43,1100		46,1600	42,4400	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B transitionnels T1	Moyenne (%)	6,3700	4,9410	0,0992	2,2140	3,2340	0,0590	2,8930	2,2660	0,1474
	Valeur minimale (%)	1,1660	1,0610		0,9219	1,8920		1,6900	0,5346	
	Médiane (%)	5,9120	3,8160		1,7270	2,3320		3,0100	1,7560	
	Valeur maximale (%)	12,4500	13,0900		4,3550	5,8700		4,5960	6,0810	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B transitionnels T2	Moyenne (%)	10,9900	10,4300	0,4710	7,4000	9,3390	0,2110	5,8570	7,8300	0,1830
	Valeur minimale (%)	5,5220	3,1700		2,0410	5,7480		3,1830	1,9830	
	Médiane (%)	10,8200	10,8600		6,9080	8,6590		5,2780	8,5010	
	Valeur maximale (%)	21,7000	16,3400		15,7600	14,7000		8,7640	11,9800	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B transitionnels totaux	Moyenne (%)	17,3600	15,3700	0,1864	9,6330	11,8100	0,1269	8,1280	9,9140	0,4178
	Valeur minimale (%)	7,6980	6,7240		3,3020	8,7430		6,6380	4,1790	
	Médiane (%)	16,5200	14,5900		8,4180	11,5000		8,0840	9,2360	
	Valeur maximale (%)	25,7900	24,8400		18,2100	14,8000		9,6540	18,0600	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B naïfs	Moyenne (%)	70,8600	72,4200	0,2933	68,4100	71,5100	0,3210	66,4400	67,7800	0,1171
	Valeur minimale (%)	63,5900	56,1100		43,0800	61,5600		60,4500	43,6800	
	Médiane (%)	69,8500	74,6400		69,9400	70,5400		65,6100	71,7600	
	Valeur maximale (%)	83,0600	82,0600		80,4700	78,5400		73,2800	76,3900	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		
Plasmablastes	Moyenne (%)	0,0807	0,1289	0,0449	0,9357	2,3530	0,4163	2,4790	2,2330	0,4178
	Valeur minimale (%)	0,0070	0,0354		0,2604	0,2918		0,9356	0,3325	
	Médiane (%)	0,0822	0,1212		0,8899	0,7415		2,3930	2,5220	
	Valeur maximale (%)	0,2204	0,2907		1,7870	10,0200		4,8530	3,6070	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires classiques	Moyenne (%)	3,9890	4,7830	0,1302	6,0300	5,0430	0,4163	6,9190	8,6200	0,2226
	Valeur minimale (%)	1,5260	2,1990		2,3220	2,7750		4,7430	4,2880	
	Médiane (%)	3,8580	4,5160		4,9350	5,5300		6,2840	8,7890	
	Valeur maximale (%)	8,0120	8,1500		13,1600	8,1520		10,3100	12,9100	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires activés	Moyenne (%)	0,1438	0,4422	0,1271	1,3320	0,9272	0,1655	1,9730	2,0040	0,4726
	Valeur minimale (%)	0,0722	0,0516		0,4958	0,5702		0,9549	0,6366	
	Médiane (%)	0,1374	0,1565		1,0760	0,8637		1,6730	1,7200	
	Valeur maximale (%)	0,2366	3,5630		3,6980	1,3440		3,5790	4,7200	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires atypiques	Moyenne (%)	6,2010	6,8440	0,3224	6,8300	5,6980	0,2110	6,8040	6,5060	0,1171
	Valeur minimale (%)	3,0180	1,5160		1,8130	1,6530		2,8910	2,5930	
	Médiane (%)	5,6430	5,2930		6,3300	5,2350		6,9570	3,0950	
	Valeur maximale (%)	11,2500	22,3500		12,6500	11,5300		13,2400	21,6800	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		

Note : Les fréquences des lymphocytes B totaux sont exprimées comme un % des lymphocytes. Les fréquences des autres sous-populations sont exprimées comme un % dans les lymphocytes B totaux. Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, une discrimination basée sur l'expression d'IgM a été appliquée et les fréquences présentées reflètent celles des sous-populations IgM.

Légende : NA : non applicable; Valeur P soulignée et en gras : différence significative

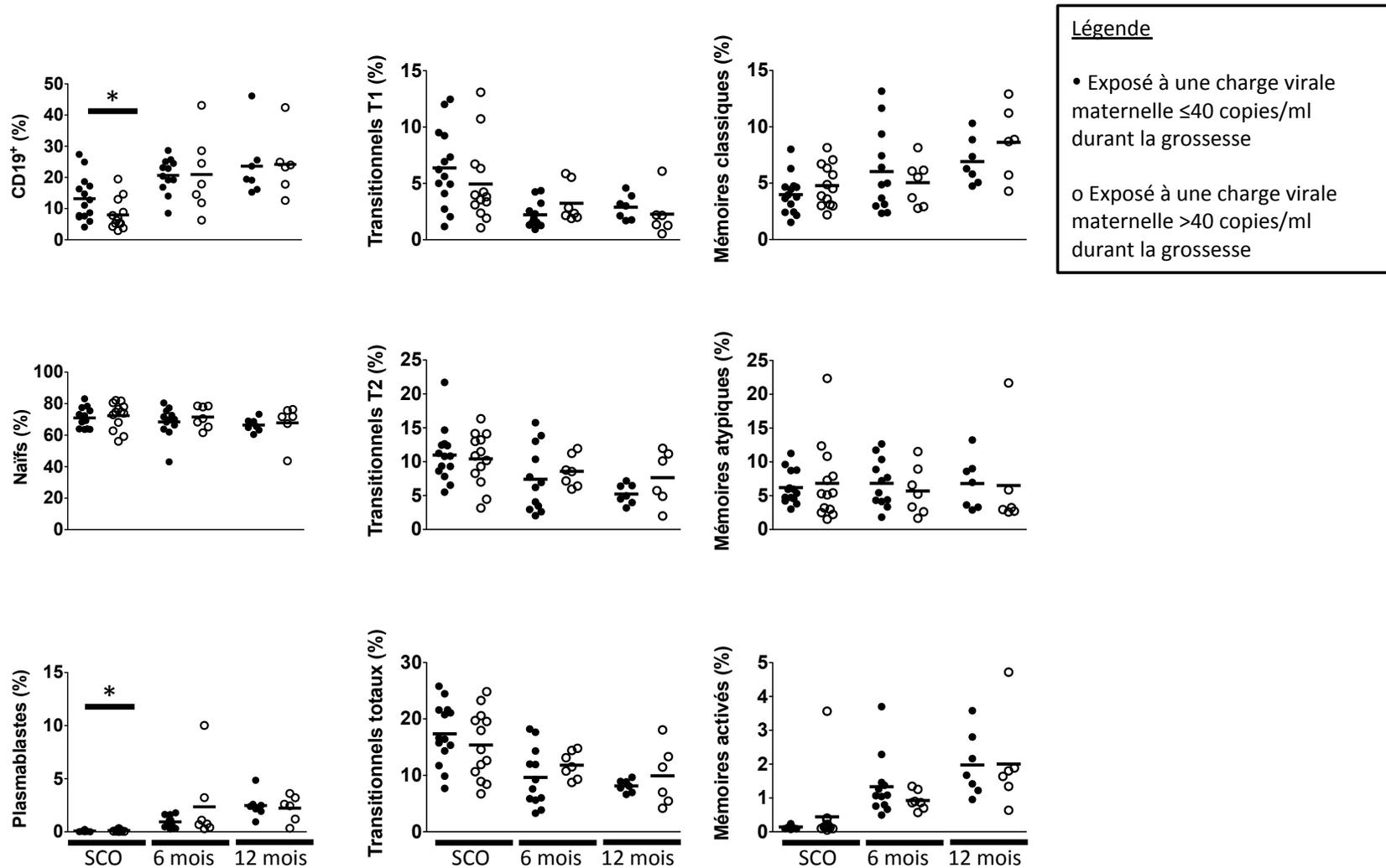


Figure 16. Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse

Note : Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, une discrimination basée sur l'expression d'IgM a été appliquée et les fréquences présentées reflètent celles des sous-populations IgM. La bande noire dans chacune des distributions représente la valeur moyenne des fréquences présentées.

Légende : SCO : Sang de cordon ombilical; * : Valeur $P \leq 0,05$

Tableau VI. Fréquences des lymphocytes B matures IgM⁺ chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse

Sous-populations lymphocytaires B		Sang de cordon			6 mois			12 mois		
		≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P	≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P	≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P
Plasmablastes	Moyenne (%)	NA	NA	NA	7,8480	10,5400	0,3698	16,5900	21,2400	0,3242
	Valeur minimale (%)	NA	NA		5,4320	2,3440		4,7750	7,2850	
	Médiane (%)	NA	NA		7,3190	8,2180		12,5100	22,1200	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		11,9100	20,6400		34,2300	33,4500	
	Taille de l'échantillon	0	0		10	7		7	4	
	Test statistique choisi	NA			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires classiques	Moyenne (%)	80,5000	82,9500	0,1720	76,0300	75,1800	0,4496	64,1500	70,3000	0,0367
	Valeur minimale (%)	60,2700	65,3200		64,6000	60,7000		50,6100	60,3400	
	Médiane (%)	82,3500	86,0300		76,5200	78,3600		66,9700	71,5900	
	Valeur maximale (%)	91,8800	89,9800		83,8000	85,2300		70,1100	75,6000	
	Taille de l'échantillon	14	13		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires activés	Moyenne (%)	NA	NA	NA	50,4600	50,2200	0,4496	46,7100	48,4200	0,4178
	Valeur minimale (%)	NA	NA		33,7300	40,1600		39,0800	37,8600	
	Médiane (%)	NA	NA		50,3700	50,9600		47,9400	49,0300	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		60,3800	59,5200		56,2800	56,4000	
	Taille de l'échantillon	0	0		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	NA			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires atypiques	Moyenne (%)	82,5400	78,2500	0,0822	51,100	59,040	0,0590	51,4200	53,4300	0,4178
	Valeur minimale (%)	67,7800	65,1600		28,830	50,550		44,1000	42,5600	
	Médiane (%)	85,3500	79,1000		51,790	61,730		50,5000	52,5000	
	Valeur maximale (%)	89,0100	88,0300		62,800	66,180		59,8300	66,5400	
	Taille de l'échantillon	13	11		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		

Note : Les fréquences des sous-populations sont exprimées comme un % dans leur sous-population respective non discriminée par rapport à l'IgM.

Légende : NA : non applicable; Valeur P soulignée et en gras : différence significative

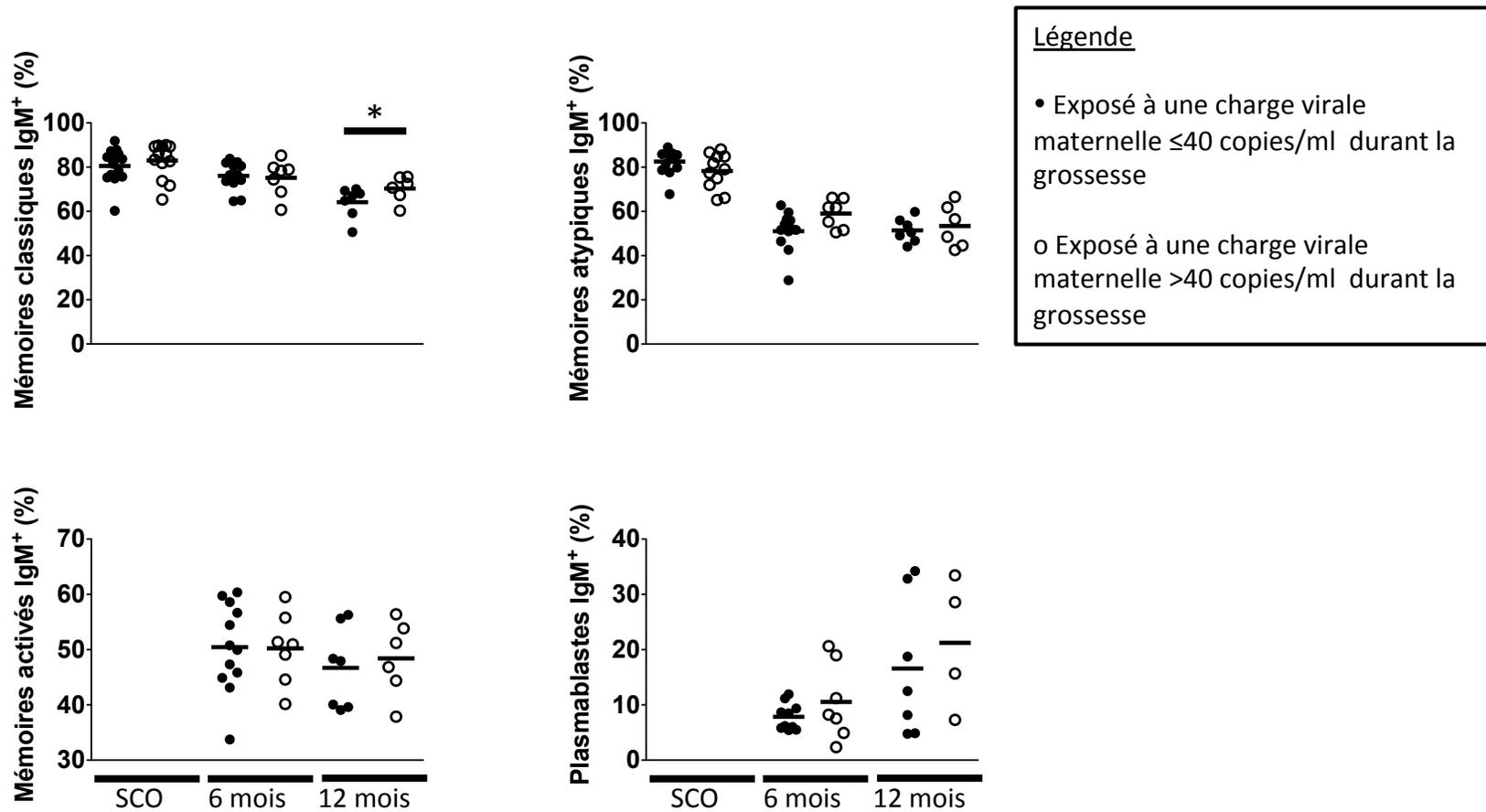


Figure 17. Fréquences des lymphocytes B matures IgM⁺ chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse

Note : L'absence de données dans le sang de cordon pour les lymphocytes B mémoires activés IgM⁺ les plasmablastes IgM⁺ implique que la sous-population mère présentait moins de 500 évènements à la suite de l'acquisition. Ainsi, aucune sous-population lymphocytaire en découlant n'a été considérée valide. La bande noire dans chacune des distributions représente la valeur moyenne des fréquences présentées.

Légende : SCO : Sang de cordon ombilical; * : Valeur P≤0,05

3.2.2 Caractérisation du profil lymphocytaire des enfants ENI en fonction du nadir du compte de CD4 maternel en grossesse

Quand les enfants ENI sont divisés sur la base du compte de CD4 maternel, on observe que ceux issus de mères dont la condition immunitaire était altérée durant la grossesse (compte de CD4 <500 cellules/mm³) présentent une fréquence de plasmablastes significativement plus élevée dans le sang de cordon (valeur $P=0,0458$). Ceci indique une activation prématurée du système immunitaire du nouveau-né et se joint aux observations similaires faites dans le contexte de la stratification présentée ci-haut. Par ailleurs, aucune autre différence statistiquement significative n'a pu être notée entre les deux groupes d'enfants (Fig.18 et Tab. VII).

L'examen des sous-populations matures IgM⁺ montre que les enfants nés de mères dont l'immunité est altérée (compte de CD4 <500 cellules/mm³) ont une fréquence de lymphocytes B mémoires activés fortement supérieure (valeur $P=0,0071$) à 6 mois d'âge. Il faut souligner que l'absence de résultat pour les plasmablastes et les lymphocytes mémoires activés IgM⁺ à la naissance, s'explique par le fait que leur population mère abritait moins de 500 évènements (Fig.19 et Tab VIII).

Tableau VII. Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse

Sous-populations lymphocytaires B	Sang de cordon			6 mois			12 mois		
	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P
Lymphocytes B totaux	Moyenne (%)	10,5400	11,0400	21,0800	20,4300	0,4356	24,3700	23,2900	0,2669
	Valeur minimale (%)	2,9020	4,0710	6,2850	8,5180		12,6000	15,2400	
	Médiane (%)	7,7050	11,0700	19,1800	22,8600		24,0000	19,2700	
	Valeur maximale (%)	27,4000	18,6500	43,1100	28,5700		42,4400	46,1600	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B transitionnels T1	Moyenne (%)	5,8630	5,1660	2,4910	2,7000	0,3304	2,5990	2,6100	0,3654
	Valeur minimale (%)	1,0610	1,1660	0,9219	1,3080		0,5346	1,6900	
	Médiane (%)	5,3020	4,0930	2,0780	2,3010		2,1610	2,5670	
	Valeur maximale (%)	13,0900	12,0000	5,8700	5,5450		6,0810	3,8900	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B transitionnels T2	Moyenne (%)	10,2600	12,0500	7,3050	8,4480	0,2752	7,0100	5,5760	0,4178
	Valeur minimale (%)	3,1700	6,5320	2,0410	2,6190		1,9830	3,9660	
	Médiane (%)	10,5000	12,3700	7,4610	6,9350		5,7360	5,6710	
	Valeur maximale (%)	16,3400	21,7000	11,9600	15,7600		11,9800	7,1710	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B transitionnels totaux	Moyenne (%)	16,1200	17,2200	9,7960	11,1500	0,2592	9,6090	8,1860	0,4726
	Valeur minimale (%)	6,7240	7,6980	3,3020	5,6120		4,1790	6,6380	
	Médiane (%)	16,5200	15,7600	10,0500	11,5000		7,7790	8,4610	
	Valeur maximale (%)	24,8400	25,7900	14,8000	18,2100		18,0600	9,6540	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B naïfs	Moyenne (%)	71,1000	73,0700	69,4000	69,7300	0,2001	66,7300	67,4400	0,3141
	Valeur minimale (%)	56,1100	63,5900	61,5600	43,0800		43,6800	63,2700	
	Médiane (%)	72,6500	75,4200	68,3000	71,6200		71,6900	67,1500	
	Valeur maximale (%)	82,0600	83,0600	78,5400	80,4700		76,3900	73,2800	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney			Mann Whitney		
Plasmablastes	Moyenne (%)	0,1157	0,0701	1,7530	1,1300	0,0912	2,2220	2,5330	0,5000
	Valeur minimale (%)	0,0291	0,0070	0,2604	0,3051		0,3325	0,9356	
	Médiane (%)	0,1097	0,0556	0,6451	1,1010		2,4450	2,4470	
	Valeur maximale (%)	0,2907	0,2204	10,0200	1,7870		3,6070	4,8530	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires classiques	Moyenne (%)	4,3000	4,5740	6,4960	4,7450	0,1167	8,2860	7,0250	0,2669
	Valeur minimale (%)	1,5260	2,4440	2,7750	2,3220		4,2880	4,7430	
	Médiane (%)	3,7620	4,4540	5,8020	3,7030		8,7010	6,5860	
	Valeur maximale (%)	8,1500	8,0120	13,1600	9,3580		12,9100	10,3100	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires activés	Moyenne (%)	0,3415	0,1333	1,3480	1,0000	0,3304	2,1180	1,8360	0,3654
	Valeur minimale (%)	0,0516	0,0722	0,5702	0,4958		0,6366	0,9549	
	Médiane (%)	0,1554	0,1290	0,9905	1,0420		1,8020	1,5460	
	Valeur maximale (%)	3,5630	0,2134	3,6980	1,4570		4,7200	3,5790	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires atypiques	Moyenne (%)	7,0250	5,0420	7,0040	5,7570	0,2251	7,4680	5,7300	0,3141
	Valeur minimale (%)	1,5160	3,0180	1,6530	1,8130		2,5930	2,8910	
	Médiane (%)	5,9330	4,5570	6,8900	4,3850		3,2330	5,2930	
	Valeur maximale (%)	22,3500	9,6180	12,6500	11,7500		21,6800	9,0150	
	Taille de l'échantillon	20	7	10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		

Note : Les fréquences des lymphocytes B totaux sont exprimées comme un % des lymphocytes. Les fréquences des autres sous-populations sont exprimées comme un % dans les lymphocytes B totaux. Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, une discrimination basée sur l'expression d'IgM a été appliquée et les fréquences présentées reflètent celles des sous-populations IgM.

Légende : NA : non applicable; Valeur P soulignée et en gras : différence significative

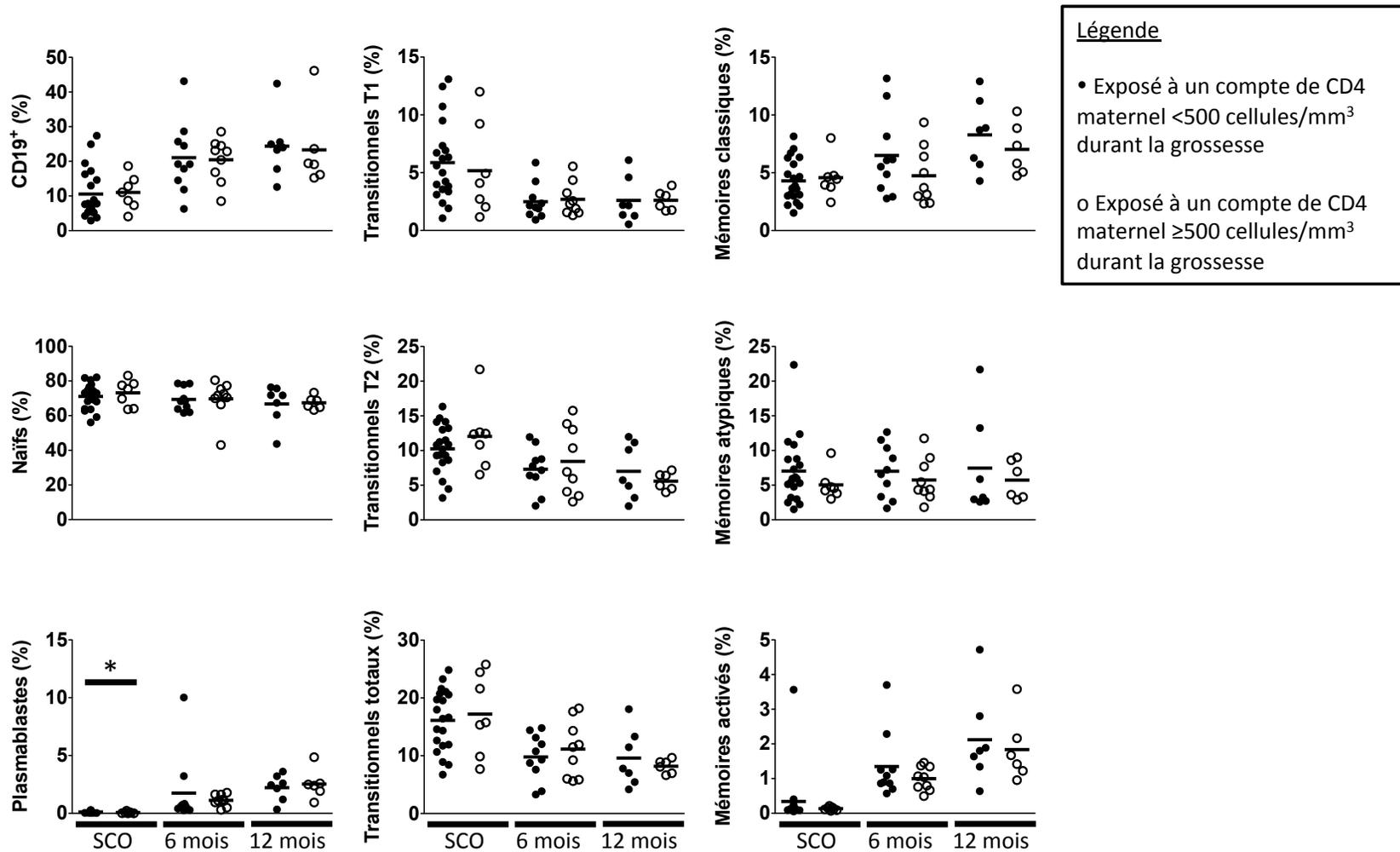


Figure 18. Fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse

Note : Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, une discrimination basée sur l'expression d'IgM a été appliquée et les fréquences présentées reflètent celles des sous-populations IgM. La bande noire dans chacune des distributions représente la valeur moyenne des fréquences présentées.

Légende : SCO : Sang de cordon ombilical; * : Valeur P ≤ 0,05

Tableau VIII. Fréquences des lymphocytes B matures IgM⁺ observés chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse

Sous-populations lymphocytaires B		Sang de cordon			6 mois			12 mois		
		<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P
Plasmablastes	Moyenne (%)	NA	NA	NA	10,2300	7,5250	0,1293	19,5000	17,2700	0,3961
	Valeur minimale (%)	NA	NA		4,9110	2,3440		7,2850	4,7750	
	Médiane (%)	NA	NA		8,2180	7,3190		15,6600	13,4500	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		20,6400	11,9100		33,4500	34,2300	
	Taille de l'échantillon	0	0		9	8		5	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires classiques	Moyenne (%)	81,1700	83,1500	0,4232	77,0000	74,2900	0,2021	69,8300	63,6800	0,0688
	Valeur minimale (%)	60,2700	74,8700		65,0000	60,7000		60,3400	50,6100	
	Médiane (%)	83,2800	83,6600		78,6300	76,4500		70,7400	66,4300	
	Valeur maximale (%)	89,9800	91,8800		85,2300	82,2700		75,6000	70,1100	
	Taille de l'échantillon	20	7		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires activés	Moyenne (%)	NA	NA	NA	54,0900	46,2400	0,0071	49,5500	45,1100	0,1830
	Valeur minimale (%)	NA	NA		44,5900	33,7300		37,8600	39,0800	
	Médiane (%)	NA	NA		53,6000	45,8400		51,2000	43,9900	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		60,3800	56,6800		56,4000	55,6300	
	Taille de l'échantillon	0	0		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires atypiques	Moyenne (%)	80,3400	81,2900	0,3569	56,3900	51,3900	0,2235	52,1000	52,6400	0,3654
	Valeur minimale (%)	65,1600	67,7800		42,6600	28,8300		42,5600	46,7300	
	Médiane (%)	83,2500	82,5500		55,6400	51,9400		48,5400	52,1200	
	Valeur maximale (%)	88,0300	89,0100		66,1800	61,7300		66,5400	59,8300	
	Taille de l'échantillon	18	6		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		

Note : Les fréquences des sous-populations sont exprimées comme un % dans leur sous-population respective non discriminée par rapport à l'IgM.

Légende : NA : non applicable; Valeur P soulignée et en gras : différence significative

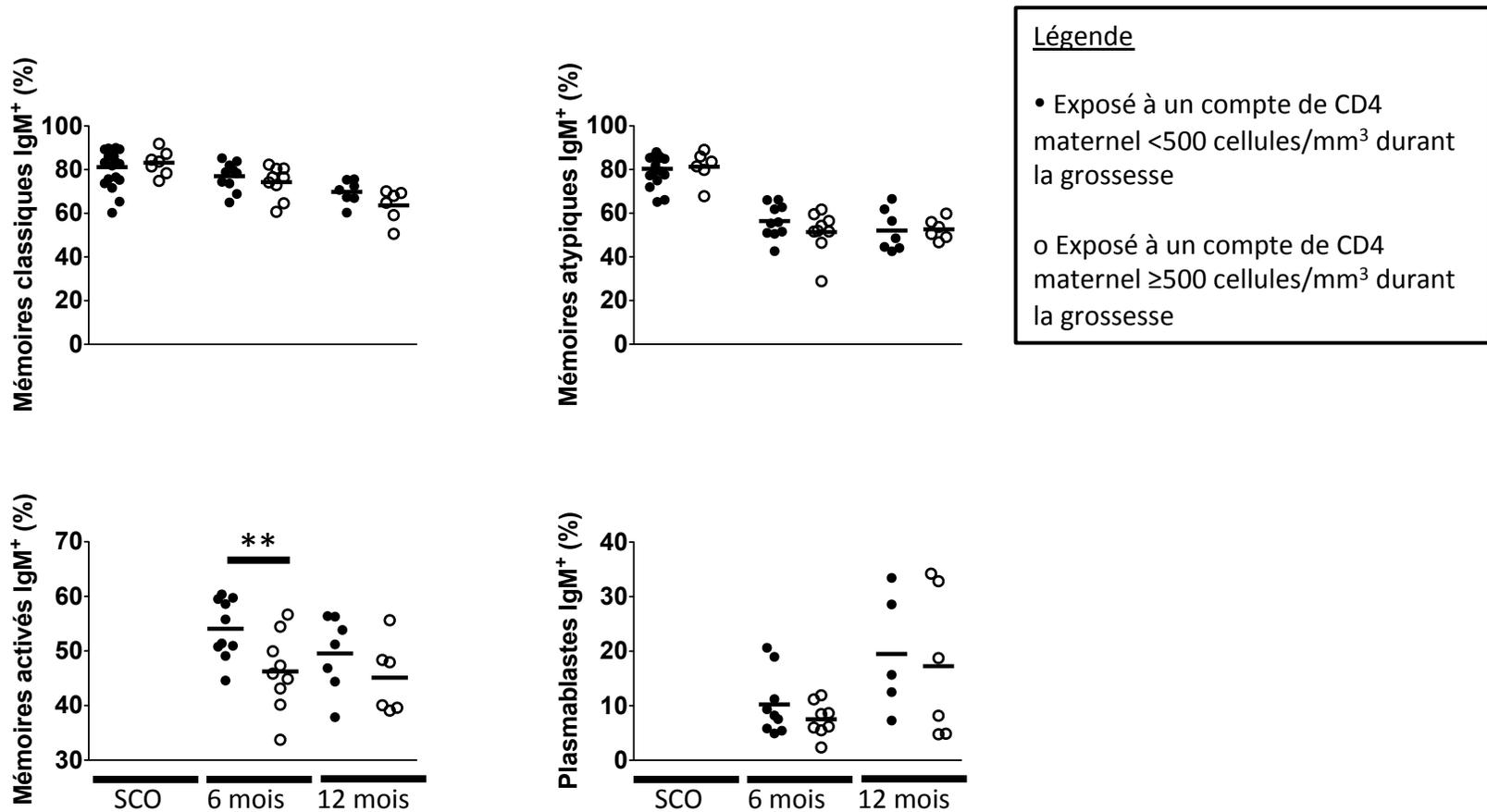


Figure 19. Fréquences des lymphocytes B matures exprimant l'IgM chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse

Note : L'absence de données dans le sang de cordon pour les lymphocytes B mémoires activés IgM⁺ les plasmablastes IgM⁺ implique que la sous-population mère présentait moins de 500 événements à la suite de l'acquisition. Ainsi, aucune sous-population lymphocytaire en découlant n'a été considérée comme valide. La bande noire dans chacune des distributions représente la valeur moyenne des fréquences présentées.

Légende : SCO : Sang de cordon ombilical; ** : Valeur P≤0,001

3.3 Analyse des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos

3.3.1 Spécificité du marquage

Chez l'adulte, l'immunisation contre le tétanos requiert une vaccination de rappel tous les 10 ans ²³⁰. Afin de confirmer la spécificité des interactions entre le TTCF et le RCB, nous avons prélevé un échantillon sanguin d'un adulte sain dont l'immunisation contre le tétanos venait à échéance. Il a ensuite été vacciné et une seconde ponction veineuse au sixième jour post-vaccination a été effectuée, ce qui a permis de comparer les fréquences des sous-populations spécifiques au TTCF avant et après l'immunisation par le biais d'un marquage (Fig.20). Au jour 6 post-vaccination, il était attendu que l'individu présente une fréquence élevée de plasmablastes spécifiques au TTCF puisqu'il s'agit du moment où cette sous-population lymphocytaire spécifique au tétanos quitte les centres germinatifs pour se retrouver dans la circulation sanguine périphérique ²³¹. Une réactivation des lymphocytes B mémoires était également à prévoir.

Comme attendu, l'individu vacciné ne présente des plasmablastes spécifiques au TTCF qu'après l'immunisation. Plus précisément, 9,5659 % des plasmablastes de ce sujet sont spécifiques au TTCF au jour 6 post-vaccination. Il en est d'ailleurs de même pour les lymphocytes B mémoires activés dont la fréquence, nulle avant vaccination, subit un bond de 0,9524 % après la vaccination. L'absence de ces deux sous-populations avant vaccination confirme que les fréquences observées après l'immunisation de rappel sont bien spécifiques au tétanos. La présence de lymphocytes B mémoires spécifiques au TTCF avant vaccination permet de valider que l'individu a déjà été exposé aux antigènes du tétanos par le passé et a été en mesure de développer une immunité durable contre ces antigènes (Fig.20).

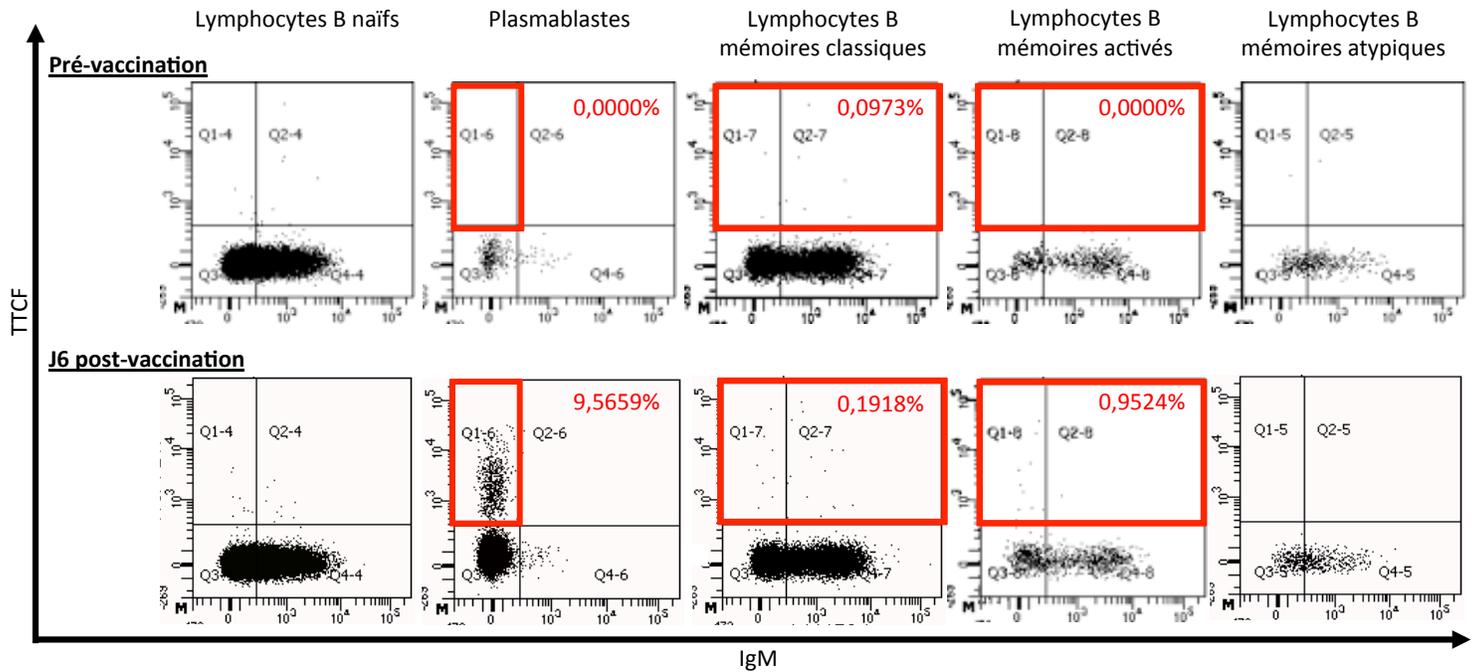


Figure 20. Comparaison des fréquences des lymphocytes B spécifiques au TCF avant et après immunisation contre le tétanos

Note : Les valeurs présentées expriment la fréquence des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au TCF comme un % dans leur sous-population cellulaire non spécifique respective.

Légende : J6 : 6^e jour; TCF : Tetanus toxin C fragment

3.3.2 Fréquences des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos en fonction du zénith de la virémie maternelle en grossesse

Lorsque stratifiés en fonction du zénith de la CV maternelle en grossesse, les deux groupes d'enfants ENI présentent des fréquences similaires pour l'ensemble des sous-populations observées dans leur première année de vie. Il est possible d'observer une diminution de la fréquence des lymphocytes B naïfs entre la naissance et 6 mois pour les deux groupes d'enfants (Fig.21 et Tab.IX). En ce qui concerne les plasmablastes et les lymphocytes B mémoires activés spécifiques au TCF, il n'est pas possible d'observer de fréquences valides puisqu'il y a moins de 500 événements acquis dans leurs sous-populations de plasmablastes mères. Toutefois, à 6 mois et à 12 mois, les plasmablastes et les lymphocytes B mémoires activés sont présents en plus grande proportion, ce qui permet d'observer des sous-populations spécifiques au TCF valides (Fig.21 et Tab.IX). Pour ce qui est des populations

lymphocytaires mémoires classiques et atypiques, elles sont présentes à des fréquences constantes durant toute la première année de vie des enfants ENI (Fig.21 et Tab.IX). Ainsi, peu importe l'exposition présumée aux particules virales, la réponse vaccinale contre le tétanos reste inchangée phénotypiquement et quantitativement parlant.

3.3.3 Fréquences des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos en fonction du nadir du compte de CD4 maternel en grossesse

Tout comme pour la dernière stratification, la classification des enfants en fonction du nadir du compte de CD4 maternel permet d'observer des fréquences similaires entre les deux groupes à l'exception de celle des lymphocytes B naïfs. Effectivement, les enfants issus de mères ayant eu au moins un compte de CD4 en dessous de 500 cellules/mm³ affichent une fréquence significativement plus faible de cette sous-population à 12 mois (valeur P=0,0367). Somme toute, on constate que la fréquence des lymphocytes B naïfs perd en intensité entre la naissance et l'âge de 6 mois (Fig.22 et Tab.X). Quant aux lymphocytes mémoires activés et aux plasmablastes spécifiques au TTCF, il n'est pas possible de rapporter de fréquence puisque leur population mère respective présentait moins de 500 événements à la suite de l'acquisition. En ce qui concerne les fréquences des lymphocytes B mémoires classiques et atypiques, elles sont relativement stables tout au long de la première année de vie.

Tableau IX. Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse

Sous-populations lymphocytaires B		Sang de cordon		Valeur P	6 mois		Valeur P	12 mois		Valeur P
		≤40 copies/ml	>40 copies/ml		≤40 copies/ml	>40 copies/ml		≤40 copies/ml	>40 copies/ml	
Lymphocytes B naïfs	Moyenne (%)	0,0940	0,0976	0,4149	0,0500	0,0573	0,2631	0,0597	0,0578	0,1830
	Valeur minimale (%)	0,0213	0,0292		0,0148	0,0424		0,0333	0,0334	
	Médiane (%)	0,1011	0,0807		0,0467	0,0575		0,0555	0,0371	
	Valeur maximale (%)	0,1378	0,1956		0,0894	0,0734		0,1240	0,1502	
	Taille de l'échantillon	13	12		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		
Plasmablastes	Moyenne (%)	NA	NA	NA	0,0579	0,1117	0,4370	0,0996	0,2096	0,1171
	Valeur minimale (%)	NA	NA		0,0000	0,0000		0,0279	0,0232	
	Médiane (%)	NA	NA		0,0236	0,0000		0,0963	0,1725	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		0,1969	0,4608		0,2332	0,5120	
	Taille de l'échantillon	0	0		10	7		7	6	
	Test statistique choisi	NA			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires classiques	Moyenne (%)	0,1691	0,1921	0,3135	0,1523	0,3755	0,4163	0,1228	0,2183	0,0903
	Valeur minimale (%)	0,0526	0,0000		0,0574	0,0320		0,0520	0,0753	
	Médiane (%)	0,1664	0,1539		0,1352	0,0965		0,0963	0,1725	
	Valeur maximale (%)	0,3165	0,4823		0,3113	1,8570		0,2332	0,5120	
	Taille de l'échantillon	13	12		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires activés	Moyenne (%)	NA	NA	NA	0,1776	0,1406	0,4491	0,0763	0,0980	0,4726
	Valeur minimale (%)	NA	NA		0,0000	0,0000		0,0299	0,0000	
	Médiane (%)	NA	NA		0,1459	0,1392		0,0715	0,0879	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		0,8503	0,4520		0,1279	0,2574	
	Taille de l'échantillon	0	0		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	NA			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires atypiques	Moyenne (%)	0,0611	0,0501	0,3090	0,0486	0,0563	0,4496	0,0672	0,0548	0,5000
	Valeur minimale (%)	0,0000	0,0000		0,0000	0,0266		0,0313	0,0168	
	Médiane (%)	0,0647	0,0492		0,0493	0,0486		0,0450	0,0539	
	Valeur maximale (%)	0,1660	0,1560		0,1126	0,1145		0,1790	0,0962	
	Taille de l'échantillon	13	9		12	7		7	6	
	Test statistique choisi	Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney			Mann Whitney		

Note : Les valeurs présentées expriment la fréquence des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au TTCF comme un % dans leur sous-population cellulaire non spécifique respective. Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, aucune discrimination basée sur l'expression d'IgM n'a été appliquée.

Légende : NA : non applicable

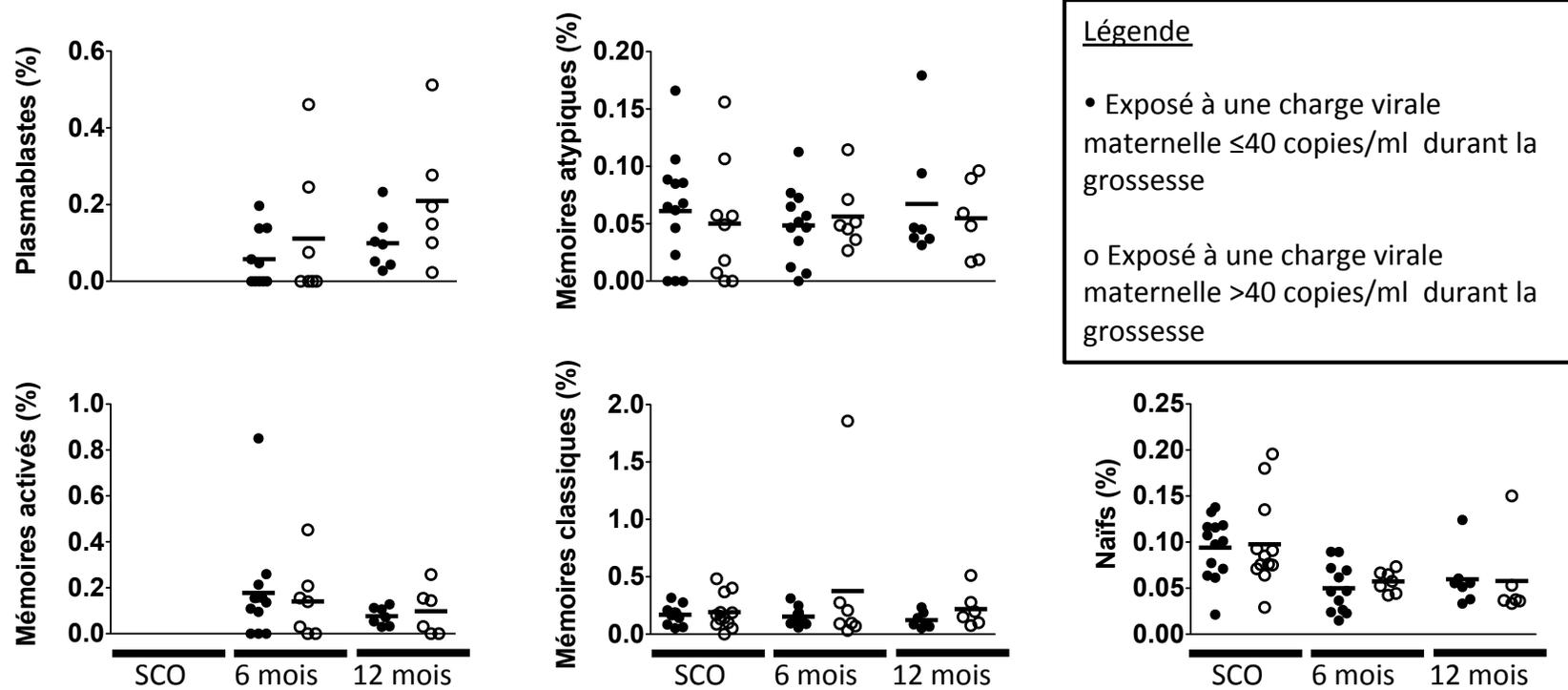


Figure 21. Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TCF7 chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle durant la grossesse

Note : Les valeurs présentées expriment la fréquence des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au TCF7 comme un % dans leur sous-population cellulaire non spécifique respective. Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, aucune discrimination basée sur l'expression d'IgM n'a été appliquée. L'absence de données dans le sang de cordon pour les lymphocytes B mémoires activés et les plasmablastes implique que la sous-population mère présentait moins de 500 événements à la suite de l'acquisition. La bande noire dans chacune des distributions représente la valeur moyenne des fréquences présentées

Légende : SCO : Sang de cordon ombilical.

Tableau X. Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse

Sous-populations lymphocytaires B		Sang de cordon			6 mois			12 mois		
		<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P
Lymphocytes B naïfs	Moyenne (%)	0,0946	0,0985	0,3470	0,0458	0,0604	0,0745	0,0543	0,0642	0,0367
	Valeur minimale (%)	0,0213	0,0615		0,0148	0,0264		0,0333	0,0380	
	Médiane (%)	0,0812	0,1011		0,0456	0,0618		0,0367	0,0556	
	Valeur maximale (%)	0,1956	0,1327		0,0734	0,0894		0,1502	0,1240	
	Taille de l'échantillon	18	7		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		
Plasmablastes	Moyenne (%)	NA	NA	NA	0,1024	0,0550	0,3972	0,1945	0,0989	0,1171
	Valeur minimale (%)	NA	NA		0,0000	0,0000		0,0232	0,0279	
	Médiane (%)	NA	NA		0,0000	0,0236		0,1498	0,0742	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		0,4608	0,1969		0,5120	0,2332	
	Taille de l'échantillon	0	0		9	8		7	6	
	Test statistique choisi	NA			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires classiques	Moyenne (%)	0,1741	0,1958	0,1446	0,3003	0,1614	0,3304	0,1966	0,1323	0,2669
	Valeur minimale (%)	0,0000	0,1415		0,0320	0,0574		0,0660	0,0520	
	Médiane (%)	0,1539	0,1856		0,1189	0,1608		0,1498	0,1185	
	Valeur maximale (%)	0,4823	0,3165		1,8570	0,3113		0,5120	0,2332	
	Taille de l'échantillon	18	7		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires activés	Moyenne (%)	NA	NA	NA	0,1315	0,2000	0,3253	0,0991	0,0714	0,4150
	Valeur minimale (%)	NA	NA		0,0000	0,0000		0,0000	0,0299	
	Médiane (%)	NA	NA		0,1242	0,1554		0,1058	0,0628	
	Valeur maximale (%)	NA	NA		0,4520	0,8503		0,2574	0,1279	
	Taille de l'échantillon	0	0		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	NA			Mann Whitney			Mann Whitney		
Lymphocytes B mémoires atypiques	Moyenne (%)	0,0546	0,0610	0,5000	0,0506	0,0524	0,4510	0,0515	0,0731	0,3141
	Valeur minimale (%)	0,0000	0,0000		0,0066	0,0000		0,0168	0,0368	
	Médiane (%)	0,0568	0,0618		0,0477	0,0517		0,0483	0,0458	
	Valeur maximale (%)	0,1560	0,1660		0,1145	0,1126		0,0962	0,1790	
	Taille de l'échantillon	15	7		10	9		7	6	
	Test statistique choisi	Mann Whitney			Test t pour échantillons indépendants			Mann Whitney		

Note : Les valeurs présentées expriment la fréquence des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au TTCF comme un % dans leur sous-population cellulaire non spécifique respective. Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, aucune discrimination basée sur l'expression d'IgM n'a été appliquée.

Légende : NA : non applicable; Valeur P soulignée et en gras : différence significative

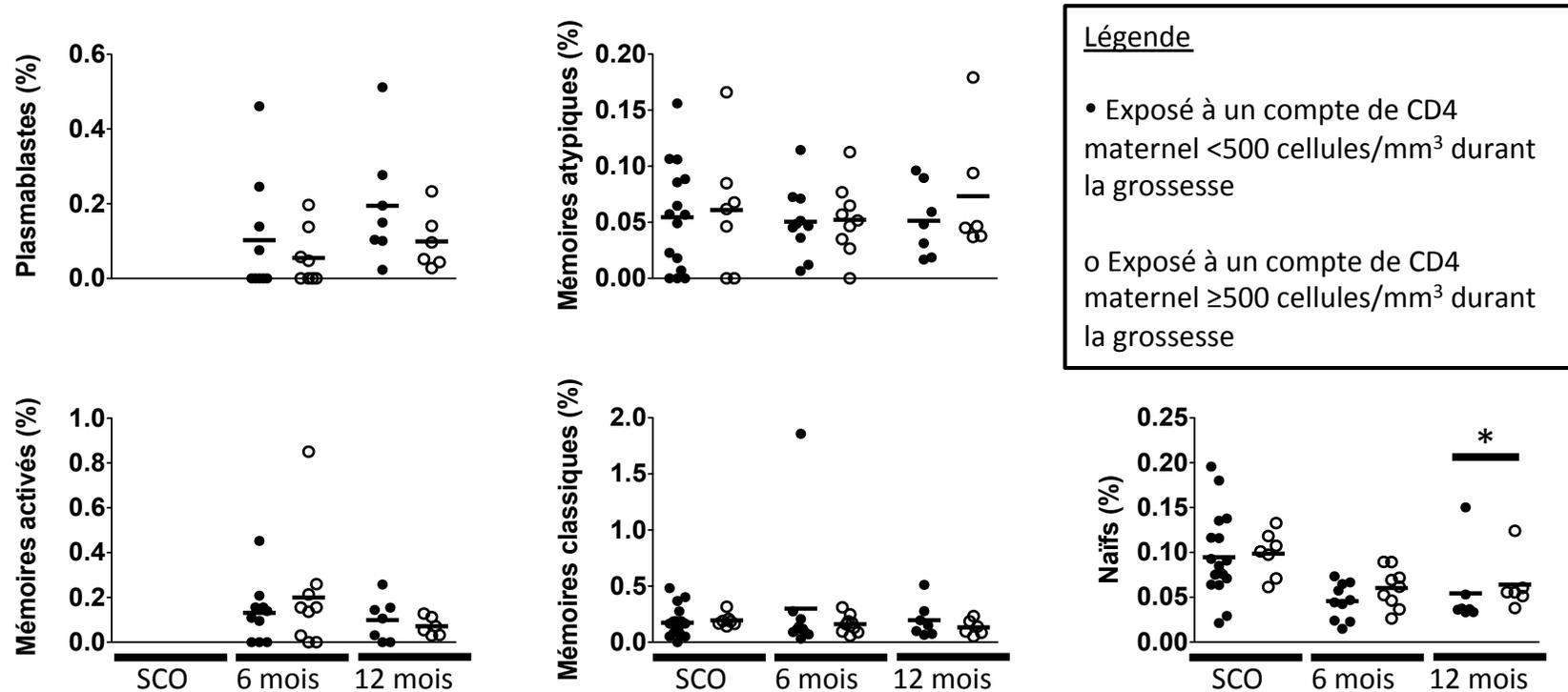


Figure 22. Fréquences des lymphocytes B spécifiques au TCF7 chez les enfants ENI stratifiés en fonction du nadir du compte de CD4 maternel durant la grossesse

Note : Les valeurs présentées expriment la fréquence des sous-populations lymphocytaires B spécifiques au TCF7 comme un % dans leur sous-population cellulaire non spécifique respective. Pour les sous-populations mémoires et pour les plasmablastes, aucune discrimination basée sur l'expression d'IgM n'a été appliquée. L'absence de données dans le sang de cordon pour les lymphocytes B mémoires actifs et les plasmablastes implique que la sous-population mère présentait moins de 500 événements à la suite de l'acquisition. La bande noire dans chacune des distributions représente la valeur moyenne des fréquences présentées

Légende : SCO : Sang de cordon ombilical; * : Valeur $P \leq 0,05$

3.4 Évaluation de la capacité des lymphocytes B mémoires à sécréter des IgG spécifiques au TTCF après stimulation *in vitro*

3.4.1 Validation de la fonctionnalité des réactions et de la spécificité du TTCF en ELISpot

Afin de vérifier la spécificité des spots au TTCF, plusieurs contrôles ont été utilisés. Premièrement, les milieux et les réactifs ont été testés pour assurer qu'ils ne soient pas responsables de la production de spots dans les puits. Pour ce faire, ils ont été ajoutés à des puits ne contenant pas de PBMC, et ce, en suivant la même séquence et les mêmes indications que lors d'une expérimentation avec des PBMC. À aucune reprise, durant les procédures expérimentales, les réactifs et les milieux n'ont causé la formation de spots non spécifiques dans les puits (Fig.23a : TTCF et Anti-IgG humain MT71/145).

Deuxièmement, pour examiner si les PBMC des enfants ENI pouvaient provoquer des spots en absence de TTCF et d'anticorps biotinylé MT78/145 anti-IgG humain, des puits ont été exposés aux PBMC stimulés ainsi qu'à tous les autres réactifs et milieux à l'exception du TTCF et de l'anti-IgG humain MT78/145 (Fig.23b : PBMC stimulés seulement). Les spots présents ont été comptabilisés pour être soustraits au nombre de spots spécifiques au TTCF (Fig.23b : PBMC stimulés + TTCF). Pour la majorité des sujets, il y avait la présence de spots au sein des puits de PBMC stimulés n'ayant pas reçu de TTCF, suggérant une réaction spécifique à la streptavidine ou à d'autres antigènes du cocktail utilisés au cours de l'expérience. D'ailleurs, la reconnaissance de la streptavidine ou de la biotine par les lymphocytes B humains a déjà été rapportée par d'autres groupes^{232, 233}.

Troisièmement, pour éliminer les spots venant de PBMC capables de sécréter des anticorps en absence de stimulation, des puits ont été exposés au TTCF combiné à des PBMC non stimulés par l'IL-2 et le R848 (agoniste des TLR7 et TLR8). Quelques rares enfants ENI

ont présenté des spots pour cette réaction à un très faible niveau (Fig.23b : PBMC non stimulés + TTCF).

Quatrièmement, les PMBC de deux enfants n'ayant pas suivi le programme d'immunisation ont été employés comme contrôle (CTL) négatif. Pour le premier enfant (CTL négatif 1), aucun spot n'a été détecté dans les puits exposés au TTCF (Fig.23c : PBMC stimulés + TTCF) et dans les puits sans TTCF et sans anticorps biotinylé MT78/145 anti-IgG humain (Fig.23c : PBMC stimulés seulement). L'enfant présentait toutefois des spots dans les puits servant à la détection de toutes les IgG sécrétées par les cellules B mémoires (Fig.23c : PBMC stimulés + anti-IgG humain MT78/145). Chez le second enfant (CTL négatif 2), des spots ont été remarqués dans les puits exposés au TTCF (Fig.23d : PBMC stimulés + TTCF). Toutefois, ces derniers provenaient d'une réaction envers d'autres antigènes présents dans les réactifs et les milieux et non pas envers le TTCF. En effet, il y avait le même nombre de spots dans les puits exposés au TTCF que dans ceux ayant reçu ni de TTCF ni d'anticorps biotinylé MT78/145 anti-IgG humain (Fig.23d : PBMC stimulés seulement). Ainsi, on peut affirmer que cet enfant n'avait aucune CFS spécifique au TTCF.

Cinquièmement, pour assurer la fonctionnalité de la réaction ELISpot, deux contrôles positifs ont été utilisés. Le premier consistait à vérifier la présence de spots dans les puits servant à la détection des cellules sécrétant des anticorps IgG peu importe leur spécificité. Dans ce contexte, tous les enfants ENI évalués ont affiché une réaction dans ces puits (Fig.23b : PBMC stimulés + anti-IgG humain MT78/145). Le second contrôle positif était la présence de spots dans les puits exposés au TTCF et aux PBMC d'un adulte sain prélevé 6 semaines après une vaccination de rappel pour le tétanos. Pour l'ensemble des expérimentations, les PBMC stimulés du sujet vacciné ont engendré des spots spécifiques au TTCF (Fig.23e : PBMC stimulés + TTCF).

a) Réaction sans PBMC



TTCF

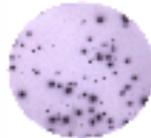


Anti-IgG humain
MT78/145

b) Réaction représentative d'un enfant ENI



PBMC stimulés
+
TTCF



PBMC stimulés
+
anti-IgG humain MT78/145



PBMC non stimulés
+
TTCF



PBMC stimulés
seulement

c) Réaction représentative du CTL négatif 1



PBMC stimulés
+
TTCF



PBMC stimulés
+
anti-IgG humain MT78/145



PBMC non stimulés
+
TTCF



PBMC stimulés
seulement

d) Réaction représentative du CTL négatif



PBMC stimulés
+
TTCF

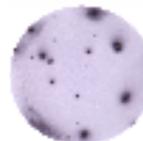


PBMC non stimulés
+
TTCF



PBMC stimulés
seulement

e) Réaction représentative du CTL positif



PBMC stimulés
+
TTCF

Figure 23. Aspect visuel des réactions d'ELISpot pratiquées chez les contrôles et les enfants ENI pour l'énumération des lymphocytes B sécrétant des IgG

Légende : TTCF : Tetanus toxin C fragment; PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

3.4.2 Nombre de lymphocytes B mémoires sécrétant des IgG spécifiques au tétanos en fonction du nadir de la charge virale maternelle en grossesse

Lorsque la stratification en fonction du zénith de la CV maternelle durant la grossesse est appliquée, les enfants ENI ne montrent aucune différence dans la capacité des cellules B mémoires à sécréter des anticorps spécifiques au TTCF durant leur première année de vie, et ce, tant en nombre absolu (valeur P à 6 mois=0,3282; valeur P à 12 mois=0,3839) qu'en fréquence relative (valeur P à 6 mois=0,3756; valeur P à 12 mois=0,3839) (Fig.24a et Tab.XI). La même conclusion est tirée du nombre total de CFS par million de PBMC à 6 mois (valeur P= 0,3356) et à 12 mois (valeur P= 0,4716) (Fig.25a et Tab.XI).

3.4.3 Nombre de lymphocytes B mémoires sécrétant des IgG spécifiques au tétanos en fonction du nadir du compte de CD4 maternel en grossesse

Tout comme sous la stratification précédente, aucune différence n'est visible à l'âge de 6 et 12 mois entre les deux groupes d'enfants ENI au niveau du nombre de cellules B mémoires sécrétant des anticorps spécifiques au TTCF par million de PBMC (valeur P à 6 mois=0,4764; valeur P à 12 mois=0,1570) et au sujet de la fréquence de ces lymphocytes mémoires dans les CFS (valeur P à 6 mois=0,3614; valeur P à 12 mois=0,1570) (Fig.24b et Tab.XI). Il en est de même pour le nombre de CFS totales par million de PBMC à 6 mois de vie (valeur P= 0,1540) et à leur premier anniversaire (valeur p= 0,1762) (Fig.25b et Tab.XI).

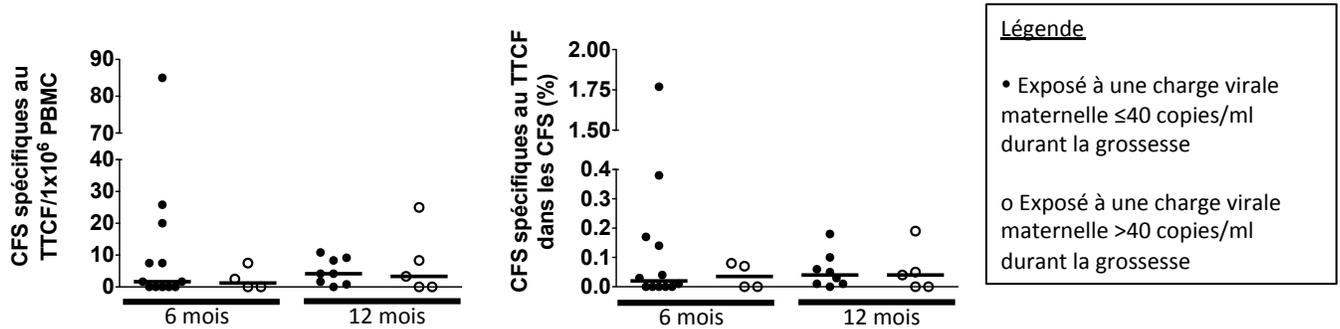
Tableau XI. Nombre absolu et fréquence relative des cellules formant des spots chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle et du nadir du compte de CD4 en grossesse

Cellules formant des spots		6 mois						12 mois					
		Stratification basée sur le zénith de la charge virale maternelle			Stratification basée sur le nadir du compte CD4 maternel			Stratification basée sur le zénith de la charge virale maternelle			Stratification basée sur le nadir du compte CD4 maternel		
		≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P	≤40 copies/ml	>40 copies/ml	Valeur P	<500 cellules/mm ³	≥500 cellules/mm ³	Valeur P
CFS spécifiques au TTCF par million de PBMC	Moyenne	12,43	2,50	0,3282	17,83	6,36	0,4764	4,90	7,33	0,3839	6,11	5,60	0,1570
	Valeur minimale	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		0,00		
	Médiane	1,67	1,25		1,67	1,67		4,17	3,33		1,67	4,17	
	Valeur maximale	85,00	7,50		85,00	25,83		10,83	25,00		25,00	10,83	
	Taille de l'échantillon	12	4		5	11		8	5		6	7	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney			
CFS spécifiques au TTCF dans les CSA	Moyenne (%)	0,21	0,04	0,3756	0,38	0,07	0,3614	0,06	0,06	0,3839	0,05	0,06	0,1570
	Valeur minimale (%)	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		0,01		
	Médiane (%)	0,02	0,04		0,04	0,01		0,04	0,04		0,02	0,05	
	Valeur maximale (%)	1,77	0,08		1,77	0,38		0,18	0,19		0,19	0,18	
	Taille de l'échantillon	12	4		5	11		8	5		6	7	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney			
CFS totales par million de PBMC	Moyenne	9 578,00	7 550,00	0,3356	6 427,00	10 270,00	0,1540	10 140,00	10 000,00	0,4716	9 022,00	11 000,00	0,1762
	Valeur minimale	2 933,00	3 133,00		3 133,00	2 933,00		4 133,00	4 400,00		4 133,00	4 667,00	
	Médiane	7 433,00	8 333,00		4 800,00	9 533,00		9 850,00	8 000,00		8 000,00	10 600,00	
	Valeur maximale	24 470,00	10 400,00		12 270,00	24 470,00		16 130,00	16 400,00		16 400,00	16 130,00	
	Taille de l'échantillon	12	4		5	11		8	5		6	7	
	Test statistique choisi	Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney		Mann Whitney			

Note : Les CFS spécifiques au TTCF ne comprennent que les lymphocytes B mémoires. Les CFS totales englobent les lymphocytes B mémoires ainsi que les plasmablastes.

Légende : CSA : Cellules sécrétrices d'anticorps; CFS : Cellule formant des spots; PBMC : Peripheral blood mononuclear cell; TTCF : Tetanus toxin C fragment

a) Stratification basée sur le zénith de la charge virale maternelle en grossesse



b) Stratification basée sur le nadir du compte CD4 maternel en grossesse

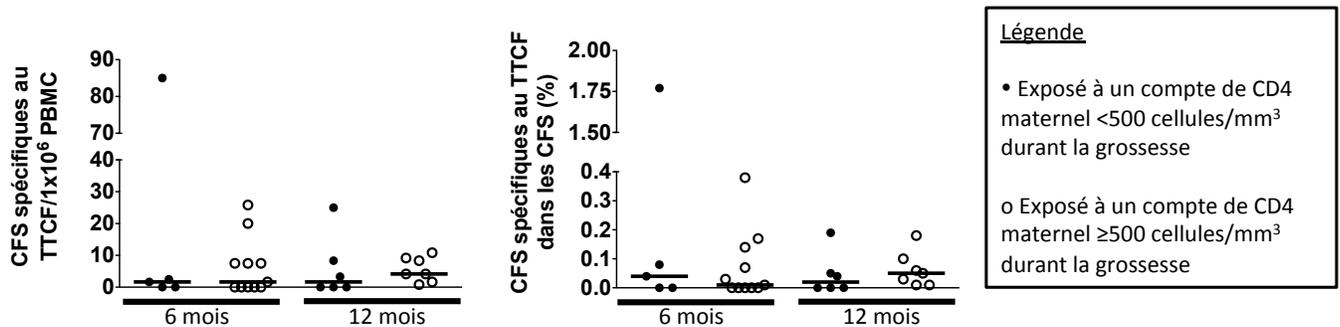
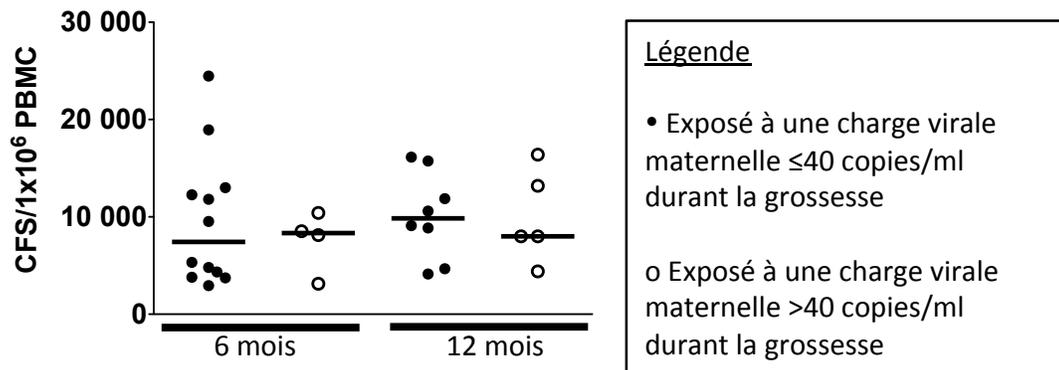


Figure 24. Nombre et fréquence relative des cellules formant des spots spécifiques au TTCF chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle et du nadir du compte de CD4 en grossesse

Note : Les CFS spécifiques au TTCF ne comprennent que les lymphocytes B mémoires. Les CFS totales englobent les lymphocytes B mémoires ainsi que les plasmablastes. La bande noire dans chacune des distributions représente la médiane des données présentées.

Légende : CFS : cellule formant des spots; PBMC : Peripheral blood mononuclear cell; TTCF : Tetanus toxin C fragment

a) Stratification basée sur le zénith de la charge virale maternelle en grossesse



b) Stratification basée sur le nadir du compte CD4 maternel en grossesse

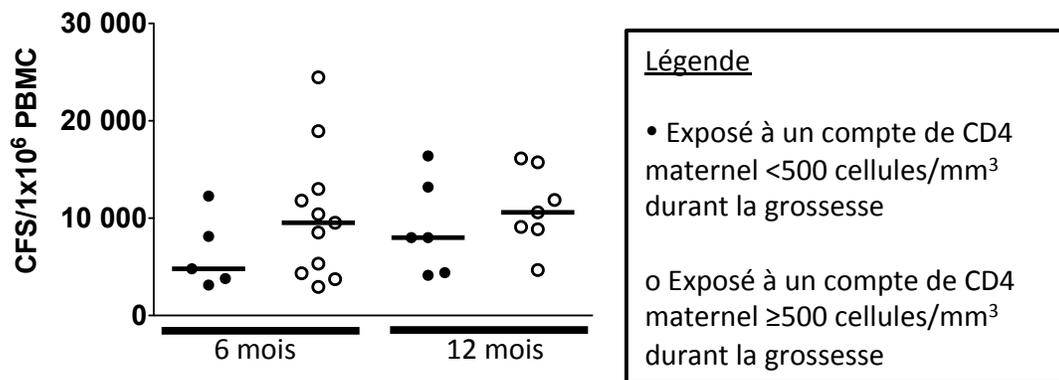


Figure 25. Nombre de cellules formant des spots chez les enfants ENI stratifiés en fonction du zénith de la charge virale maternelle et du nadir du compte de CD4 en grossesse

Note : Les CFS totales englobent les lymphocytes B mémoires ainsi que les plasmablastes. La bande noire dans chacune des distributions représente la médiane des fréquences présentées.

Légende : CFS : Cellule formant des spots; PBMC : Peripheral blood mononuclear cell.

3.4.4 Analyse de la corrélation des valeurs de cytométrie et d'ELISpot

Afin d'évaluer la capacité d'activation et de sécrétion d'IgG spécifiques au TTCF des lymphocytes B mémoires $\text{IgM}^- \text{TTCF}^+$ observés en cytométrie, un test de Spearman a été entrepris. Selon les résultats de ce test, le nombre de lymphocytes B mémoires $\text{IgM}^- \text{TTCF}^+$ par million de lymphocytes corrèle significativement de manière positive, bien que modérée, avec le nombre de CFS spécifiques au TTCF (R de Spearman = 0,4591 et valeur $P= 0,0061$) (Fig.26a : Tout âge considéré). Cette association modérée est surtout due aux valeurs obtenues à 12 mois de vie. En effet, lorsque les mêmes analyses sont effectuées en divisant les données selon l'âge des enfants, il est remarqué que la corrélation est très forte à 6 mois (R de Spearman = 0,7352 et valeur $P= 0,0006$), mais qu'elle est inexistante à 12 mois (R de Spearman = 0,0111 et valeur $P= 0,4857$) (Fig.26b : 6 mois d'âge et Fig.26c : 12 mois d'âge). Rappelons que pour comparer les données obtenues en cytométrie avec celles issues des ELISpot, il a été nécessaire d'exprimer le nombre de cellules B mémoires $\text{IgM}^- \text{TTCF}^+$ par million de lymphocytes et non pas de PBMC, ce qui engendre une divergence dans la nature des valeurs comparées.

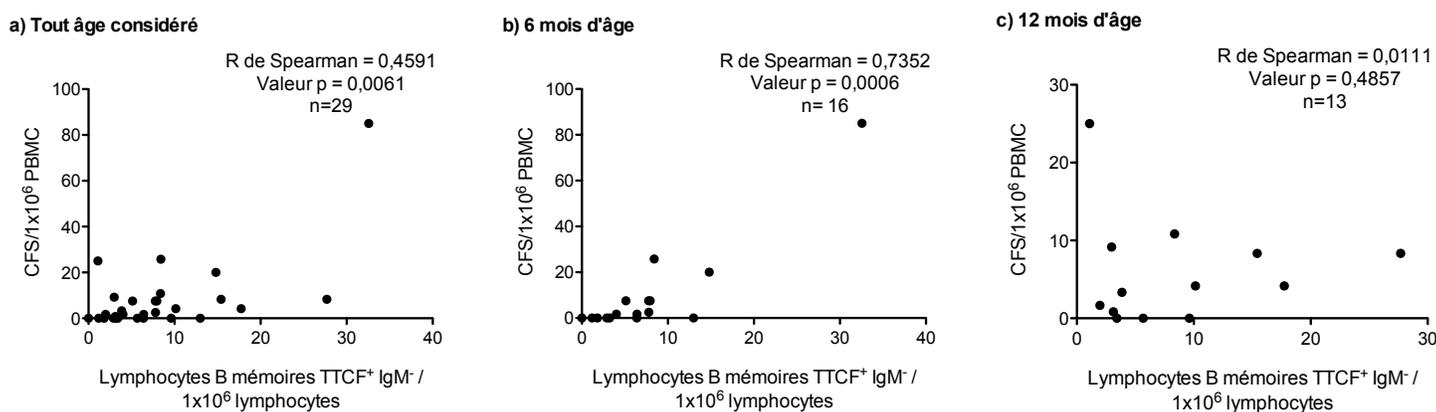


Figure 26. Corrélation des lymphocytes B mémoires $\text{IgM}^- \text{TTCF}^+$ et du nombre de cellules formant des spots spécifiques au TTCF

Légende : CFS : Cellule formant des spots; TTCF : Tetanus toxin C fragment

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Évaluation du profil lymphocytaire B

La majorité des fréquences des sous-populations lymphocytaires B chez les enfants ENI ne montrait pas de trait distinctif en fonction de la sévérité des paramètres maternels. Toutefois, une activation précoce du compartiment était notable chez ceux qui avaient été exposés à une CV détectable (>40 copies/ml) (valeur $P= 0,0449$) (Fig.16 et Tab.V) et à une immunité lymphocytaire T $CD4^+$ altérée en grossesse (<500 cellules/mm³) (valeur $P= 0,0458$) (Fig.18 et Tab.VII). Cette activation se manifestait par une différenciation plus soutenue des lymphocytes B naïfs en plasmablastes. Considérant que les enfants ENI exhibent a) une stimulation du compartiment lymphocytaire T ^{188, 189, 195, 196}, b) une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique au VIH ^{146, 195} et c) une polarisation immunitaire vers un profil Th1 dans leur sang de cordon ^{99, 146}, il est concevable que l'infection maternelle et l'environnement pro-inflammatoire placentaire ^{99, 100} modulent cette activation humorale. La proximité temporelle de cette observation avec la période anténatale et la capacité du VIH à infecter les trophoblastes²³⁴ appuient fortement l'idée que les enfants sont confrontés *in utero* aux particules virales ou aux produits protéiques du VIH ainsi qu'au débalancement immunitaire subi par leur mère. Puisque le développement du système immunitaire débute très tôt au cours du premier trimestre gestationnel (revu dans²³⁵⁻²³⁷) et qu'au sein de notre étude, les virémies maternelles détectables ont surtout été détectées en début de grossesse, le compartiment lymphocytaire B pourrait facilement être à la merci des effets de la réplication virale chez la mère.

Par ailleurs, nous avons pu établir une corrélation négative entre le compte de CD4 et la CV maternels en grossesse chez les femmes ayant eu au moins un compte de CD4 inférieur à 500 cellules/mm³ durant cette période (R de Spearman=-0,4137 et valeur $P=0,0075$). Ce résultat implique qu'en plus d'avoir une immunité cellulaire sous-optimale, ces femmes ont généralement moins bien contrôlé leur virémie et progressent dans la maladie. Il se peut qu'elles aient été plus enclines à souffrir d'échecs virologiques ou qu'elles aient reçu le

diagnostic de l'infection au VIH dans une fenêtre de temps rapprochée à la grossesse. Dans les deux cas, leur enfant risquait d'être exposé à une CV détectable *in utero*. La pertinence du compte de CD4 maternel dans le présent contexte est qu'une immunité lymphocytaire T CD4⁺ déprimée ou une infection au VIH plus avancée chez les PVVIH est associée avec une plus grande susceptibilité aux infections opportunistes^{62, 184-186}. Ces infections pourraient activer les défenses immunitaires maternelles et engendrer un débalancement inflammatoire ou des défauts dans l'intégrité placentaire et ses fonctions se soldant en une exposition accrue aux particules virales ainsi qu'aux agents pathogènes opportunistes. D'ailleurs, les chorioamniotites ainsi que d'autres défauts placentaires ont été associés avec la transmission du VIH²³⁸ (revu dans²³⁹). Il faut toutefois noter qu'aucune observation n'a été effectuée quant aux infections opportunistes dont auraient pu souffrir les mères des enfants ENI participant à notre étude durant la grossesse. De même, nous n'avons pas recueilli de données sur l'état de leur placenta.

Outre l'effet direct des particules virales, un milieu placentaire pro-inflammatoire et l'inflammation chronique chez la mère causée par à l'infection au VIH pourraient être à l'origine d'une activation précoce du compartiment lymphocytaire B. Bien que peu de travaux aient été effectués sur la capacité de transfert des cytokines à travers la barrière placentaire, il est convenable de penser que les enfants ENI puissent être affectés par un tel environnement inflammatoire. De plus, lorsque la femme enceinte connaît une infection intra-utérine ou une inflammation intra-amniotique, il est fréquent que le nouveau-né développe un syndrome de réponse inflammatoire fœtale (SRIF) (revu dans^{240, 241}). Ce dernier consiste en le déploiement d'une réponse immunitaire systémique chez le fœtus caractérisée, en outre, par un taux élevé d'IL-6²⁴⁰ (revu dans^{240, 241}). Il serait certes surprenant que tous les nouveau-nés exposés à une CV détectable ou à un faible compte de CD4 maternel *in utero* aient subi un SRIF. Or, il est concevable que ces nouveau-nés aient exhibé certains paramètres inflammatoires similaires à ceux associés à cette pathologie néonatale. Si tel est le cas ou si l'inflammation maternelle est notable, il pourrait être pertinent d'étudier le profil de cytokines dans leur sang de cordon et de combiner cette analyse avec celle de l'état placentaire. Parmi les biomarqueurs d'intérêt associés à l'inflammation et à la différenciation lymphocytaire B, l'IL-6 pourrait expliquer une

fréquence plus élevée de plasmablastes à la naissance. Cette protéine est un facteur d'inflammation aigüe et chronique produit en réponse à une infection ou à des dommages tissulaires (revu dans^{242, 243}). Elle se trouve d'ailleurs augmentée dans l'infection au VIH (revu dans²⁴⁴). L'IL-6 participe à l'induction de la production de plusieurs protéines de phase aigüe comme la protéine C réactive (CRP, *C-reactive protein*) (revu dans²⁴³) et elle constitue un facteur de stimulation important dans la différenciation des lymphocytes B en plasmablastes et en plasmocytes^{245, 246} en agissant sur l'activation de la voie de signalisation STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) qui résulte en une hausse de l'expression d'un gène crucial dans la prolifération et la différenciation lymphocytaire, soit *PRDM1* (*PR domain zinc finger protein 1*) (revu dans²⁴⁵). Ainsi, un niveau élevé d'IL-6 pourrait partiellement expliquer l'activation du compartiment cellulaire B. À noter qu'à ce jour, encore peu d'études ont étudié explicitement l'inflammation chez les enfants ENI. Toutefois, certaines ont rapporté qu'il n'y avait pas de différence dans le niveau d'IL-6 entre les enfants ENI et non exposés^{247, 248}. Puisque ces études ne comparent pas les enfants ENI entre eux, il reste pertinent de tester l'IL-6 et de voir les relations que cette cytokine pourrait avoir avec les perturbations de la fréquence des plasmablastes.

Par ailleurs, l'IL-21 semble être, à priori, un facteur clé à examiner chez les enfants ENI en raison de sa relation avec l'IL-6 et ses multiples rôles au sein des lymphocytes B. En effet, sa production se voit induite au sein des cellules T CD4⁺ auxiliaires folliculaires (acteurs importants dans la stimulation et la différenciation des lymphocytes B en CSA) en réponse à l'IL-6. Cette cytokine agit sur les cellules B en promouvant, en outre, la progression des lymphocytes B vers un profil de CSA par l'induction de la voie STAT3 tout comme le fait l'IL-6²⁴⁹. L'IL-21 est capable d'agir tant sur les lymphocytes B naïfs que sur les populations plus expérimentées²⁵⁰.

Le phénomène d'activation du compartiment cellulaire B est une caractéristique partagée avec les PVVIH chez qui une virémie détectable est associée avec une expansion de plasmablastes²⁵¹. Cette hausse dans l'abondance de cette population cellulaire ne leur

permettrait toutefois pas de mieux se défendre contre le VIH, mais découlerait plutôt d'une réponse immunitaire non spécifique envers la réplication active du virus²⁵².

Il faut toutefois rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats, entre autres en raison de leur signification statistique s'approchant des limites. Il se pourrait qu'en ayant un échantillon plus large d'enfants, ces disparités disparaissent. Notons également que pour l'ensemble des résultats présentés au sein de ce mémoire, aucun ajustement de la valeur p n'a été effectué pour tenir compte des comparaisons multiples. Cela mène à une probabilité plus élevée d'obtenir des différences significatives qui ne sont dues qu'au hasard. Ce point sera d'ailleurs discuté à la section 4.3.1. Également, en comparant avec ce qui est retrouvé dans la littérature, il s'avère que tous les enfants ENI ont un pourcentage inférieur de plasmablastes à la valeur pédiatrique de référence^{253, 254}. Cette divergence pourrait venir du fait que nous avons identifié les plasmablastes par l'expression de CD27 et l'absence de CD20 et de CD21 à leur surface cellulaire. Les travaux auxquels nous faisons référence ont plutôt opté pour les marqueurs CD24 et CD38.

En ce qui concerne la fréquence des lymphocytes B CD19⁺, elle est, à la naissance, statistiquement plus élevée chez les enfants ayant fait face à une virémie indétectable durant toute la grossesse (médiane= 11,93 % vs 6,25 % et valeur P= 0,0174). En absence d'un groupe contrôle, la stratégie utilisée dans notre étude ne nous permet pas de déterminer lequel des deux groupes présente une valeur atypique. Il est en de même lorsque nos données sont comparées avec celles de la littérature. En effet, bien que tous expriment la fréquence des lymphocytes B CD19⁺ sous forme de médiane et qu'elle corresponde au pourcentage dans les lymphocytes, il y a une variation relativement importante selon la méthode expérimentale et les outils techniques employés. Par exemple, alors que Duchamp *et al.* indiquent que 6,5 % des lymphocytes sont des cellules B CD19⁺ chez les enfants de moins d'un mois²⁵⁵, Piatosa *et al.* rapportent plutôt des fréquences de 10,9 % dans la première semaine de vie et de 19,9 % entre l'âge de 8 jours et de 2 mois²⁵⁴.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans le cadre de notre étude ne concordent pas tout à fait avec les observations effectuées par Kakkar *et al.* qui révèlent que les enfants exposés à une CV maternelle au-delà de 1000 copies/ml à l'accouchement avaient un pourcentage supérieur de lymphocytes B CD19⁺¹⁹³. La discordance entre les valeurs rapportées par Kakkar *et al.* et celles issues de notre étude peut être en grande partie expliquée par la différence d'époque dans laquelle se situe l'étude. Alors que nos travaux se sont basés sur une cohorte récente d'enfants ENI impliquant à la fois une efficacité augmentée des TAHA, des procédures obstétricales et des soins mères-enfants, ceux de Kakkar *et al.* sont rétrospectifs. Cela suppose des TAR moins optimaux pour le contrôle de l'infection maternelle, et des politiques de santé moins bien développées pour la gestion des grossesses chez la clientèle vivant avec le VIH. Cela se voit d'ailleurs dans leur nombre de femmes avec une virémie détectable à l'accouchement. Également, plusieurs différences techniques et analytiques sont notables entre l'étude de Kakkar *et al.* et la nôtre : a) la divergence des stratégies de marquage cellulaire et d'analyse, b) la disparité dans la classification des enfants ENI et c) la CV considérée pour la stratification. Alors que nous avons travaillé avec le zénith en grossesse, Kakkar *et al.* ont plutôt opté pour la virémie à l'accouchement. De plus, ils divisent les enfants ENI en trois groupes selon qu'ils soient exposés à une CV de moins de 50 copies/ml, entre 50 et 1000 copies/ml ou de plus de 1000 copies/ml. Il n'était pas possible pour nous de procéder ainsi en raison du nombre restreint d'enfants ENI. De plus, la majorité des femmes avaient une virémie indétectable à l'accouchement.

Malgré l'incapacité d'établir quel groupe d'enfants présente une fréquence particulière de lymphocytes B CD19⁺, et en dépit de l'incompatibilité de nos données et de celles de Kakkar *et al.*, il est possible d'émettre certaines idées sur l'origine de cette observation. D'une part, si l'on considère que les enfants exposés à une virémie détectable *in utero* ont une fréquence amoindrie de lymphocyte B CD19⁺, on pourrait penser qu'une plus forte exposition au VIH engendrerait un épuisement du compartiment lymphocytaire B, ce qui entrainerait un défaut de prolifération. L'expression du *Fc receptor-like protein 4* (FcRL4), qui peut être induite par la gp120²⁵⁶, serait une preuve convaincante de l'épuisement cellulaire. D'ailleurs, chez les individus qui sont séropositifs pour le VIH, il y a une augmentation de l'expression de

ce marqueur^{251, 256, 257}. Dans une même optique, l'observation d'un déclin de la présence de CD21 serait aussi pertinente pour valider cet état de défaillance d'autant plus que ce symptôme est associé à plusieurs maladies chroniques dont le VIH^{251, 258-260}. Puisque nous avons utilisé ce marqueur dans notre stratégie de phénotypage, il serait intéressant de comparer son niveau d'expression chez les deux groupes d'enfants par le biais de la moyenne de l'intensité de fluorescence. Par ailleurs, une corrélation a été établie, chez les PVVIH, entre la dégénérescence de l'état du récepteur du *B-cell activating factor* (BAFF) nommé BR3 et la perte de la capacité de survie des lymphocytes B^{260, 261}. Même chez les enfants séropositifs, il existe une plus grande proportion cellulaire exprimant faiblement ce récepteur²⁶¹. L'étude de l'expression de BR3 pourrait donc être d'un intérêt certain.

D'autre part, il se pourrait que les enfants exposés à une virémie détectable souffrent d'une plus faible productivité hématopoïétique par la moelle osseuse. L'origine cette anomalie pourrait être en lien avec la nature du régime d'ARV pris par les mères ayant une CV détectable en grossesse. De nombreuses équipes ont d'ailleurs fait une association entre les TAR et les perturbations des paramètres hématologiques des enfants ENI¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Cependant, aucune d'entre elles n'a observé d'effet considérable sur le compartiment lymphocytaire B. A priori, une enquête plus poussée sur les relations entre l'abondance de ces cellules et le type d'ARV utilisé par la mère en grossesse apparaît pertinente. Outre le possible impact des ARV, l'inflammation pourrait être le facteur clé de l'altération de la lymphopoïèse chez les enfants ENI. En effet, en condition d'infection et d'inflammation, il y a une réorientation de l'hématopoïèse vers la myélopoïèse aux dépens de la lymphopoïèse B (revu dans²⁶²). Le TNF- α se montre d'ailleurs particulièrement important dans l'inhibition de la lymphopoïèse B et la prolifération cellulaire B en agissant sur l'axe du CXCL12/CXCR4 (revu dans²⁶²). Considérant que les trophoblastes issus du placenta des mères infectées par le VIH sont plus portés à sécréter du TNF- α (revu dans⁹⁸) et que les femmes enceintes VIH⁺ affichent des concentrations plus élevées de cette cytokine dans l'environnement placentaire^{99, 100}, il s'avère probable que le TNF- α soit impliquée dans la variation des fréquences de lymphocytes B CD19⁺ chez les nouveau-nés ENI.

Également, les facteurs microbiens tels que les LPS peuvent altérer le destin des progéniteurs hématopoïétiques en se liant à leurs TLR, ce qui résulte en une induction de la voie de la myélopoïèse²⁶³. Ainsi si une infection intra-utérine est survenue durant la gestation des enfants exposés à une CV détectable en grossesse, il est concevable que la fréquence affaiblie de cellules B CD19⁺ soit la conséquence d'une déviation plus accentuée de l'hématopoïèse vers la myélopoïèse. Bien que cette réorientation de l'hématopoïèse pourrait expliquer notre résultat, il est à noter que plusieurs études ont rapporté que les enfants ENI avaient des paramètres hématologiques altérés aux dépens de plusieurs cellules issues de la myélopoïèse¹⁴⁷⁻¹⁵⁰, ce qui est conflictuel avec cette hypothèse.

En ce qui concerne les lymphocytes B expérimentés IgM⁺, les résultats ont révélé des différences significatives chez des lymphocytes B mémoires classiques à 6 mois sous la division basée sur la virémie maternelle (valeur P=0,0367) (Fig.17 et Tab.VI) de même que chez des lymphocytes B mémoires activés à 12 mois sous la stratification établie sur le compte de CD4 maternel (valeur P=0,0071) (Fig.19 et Tab.VIII). Dans le premier cas, la proportion est plus élevée chez les enfants exposés à une CV maternelle détectable, ce qui va à l'opposé des conclusions de Nduati *et al.* En effet, ces derniers ont associé l'exposition au VIH avec une dévaluation de la fréquence des lymphocytes B mémoires classiques IgM⁺²¹¹. D'ailleurs, on aurait pensé qu'une exposition prononcée aux particules virales aurait rapproché davantage le profil lymphocytaire B des enfants ENI à celui observé chez les PVVIH. Ce n'est toutefois pas le cas puisque ces dernières connaissent une perte de leur immunité humorale mémoire²⁶⁴, plus particulièrement au niveau des lymphocytes IgM⁺ tant chez l'adulte²⁶⁵ que chez l'enfant²⁶⁶. Du côté des lymphocytes B mémoires activés IgM⁺, la fréquence était augmentée chez les enfants nés de mère avec une immunité lymphocytaire T CD4⁺ altérée (<500 cellules/mm³). Normalement, l'inverse aurait été attendu si l'on se fie à la relation positive qu'ont établie D'Orsogna *et al.* entre le compte de CD4 d'une PVVIH et la fréquence cellulaire B IgM⁺²⁶⁷. Ainsi, il n'est pas possible de faire de rapprochement entre l'état immunitaire des enfants ENI et l'infection au VIH par rapport aux lymphocytes B mémoires n'ayant pas effectué de commutation de classe.

D'un autre point de vue, il est envisageable que ces enfants connaissent tout simplement des altérations dans le processus de commutation de classe, ce qui expliquerait la plus grande fréquence des populations IgM⁺. D'ailleurs, un lien peut être établi entre la défaillance de ce mécanisme de différenciation et l'action de la protéine Nef. Premièrement, il est connu que Nef peut se retrouver dans le milieu extracellulaire via une relâche par les cellules infectées. En fait, dans le sérum des personnes infectées, il peut y avoir une concentration de Nef allant de 1 à 10 ng/ml ²⁶⁸. Deuxièmement, il a été démontré par Qiao *et al.* que Nef pouvait s'incorporer, *in vivo*, dans les cellules B IgD⁺ au niveau de la membrane, dans le cytoplasme et parfois même dans le noyau ²⁶⁹. Le même phénomène peut se voir *in vitro* sans nécessiter une concentration élevée de la protéine (1 ng/ml). Troisièmement, par Qiao *et al.* ont également présenté qu'en présence de Nef, il y avait une inhibition de l'induction T-dépendante du class-switching par CD40L et IL-4²⁶⁹. Nef empêche le class-switching vers IgA, IgE et IgG qui sont des isotypes plus efficaces pour la neutralisation virale que l'IgD ²⁷⁰, ce qui favorise l'évasion immunitaire du VIH²⁷¹. Finalement, il a été démontré par Singh *et al.*, que, chez le rat, Nef peut traverser la barrière placentaire en provoquant des brèches dans celle-ci ²⁷². Considérant ces informations, il serait possible que les enfants issus de mères ayant eu une CV plus élevée en grossesse aient été exposés à Nef de manière plus intime et que cela ait eu un impact sur le mécanisme de commutation de classe en absence d'infection. De plus, puisque nous avons pu établir une corrélation négative entre le compte de CD4 et la CV maternels en grossesse chez les femmes ayant eu au moins un compte de CD4 inférieur à 500 cellules/mm³, nous pouvons supposer que les perturbations dans la commutation de classe perçues sous la stratification basée sur le compte de CD4 maternel peuvent également s'expliquer par l'action de Nef sur les lymphocytes B. Ce qui échappe toutefois à cette hypothèse est le fait que la différence est perçue assez tardivement par rapport à l'exposition présumée et qu'il faudrait probablement que des doses assez élevées de cette protéine se retrouvent dans l'organisme du fœtus pour engendrer une altération distinguable du processus de maturation canonique des lymphocytes B.

Dans un autre ordre d'idées, bien qu'aucune différence significative ne soit distinguable entre les différents groupes d'enfants ENI, tous expriment une plus forte

fréquence de lymphocytes B mémoires atypiques que ce qui est retrouvé dans la littérature. En effet, dans leur 1^{re} année de vie, le compartiment B CD19⁺ est composé à moins de 3,9 %²⁵³⁻²⁵⁵ de lymphocytes B mémoires atypiques, alors que la médiane moyenne des enfants ENI à l'étude dans notre projet était à plus de 5 %. Notons que cette fraction cellulaire est augmentée chez les PVVIH^{273, 274} et qu'elle est caractérisée par l'expression de signes d'épuisement induits par la réplication virale²⁵¹. Cette observation pourrait appuyer le fait que les enfants ENI soient affectés par l'infection maternelle.

4.2 Analyse de la réponse vaccinale contre le tétanos

Le développement des différentes sous-populations lymphocytaires B spécifiques au tétanos ne connaît pas de plus grandes perturbations selon que l'enfant ait été ou non exposé à une CV détectable *in utero* (Fig.21 et Tab.IX). Cette conclusion est certes très rassurante du point de vue clinique, puisqu'elle implique que la virémie maternelle n'entache pas la capacité des enfants ENI à ériger une réponse vaccinale qui induit une immunité à long terme.

En se basant sur la classification en fonction du nadir du compte de CD4 maternel, seule une distinction au niveau de la fréquence des lymphocytes B naïfs est notable à 12 mois (Fig.22, Tab.X). En absence d'un groupe d'enfants non exposés au VIH, de déterminer l'orientation de la différence, c'est-à-dire établir quels enfants présentent un pourcentage singulier, est impraticable. Malgré tout, il est intéressant de constater que la perturbation de cette fréquence est restreinte aux clones lymphocytaires B naïfs spécifiques au TTCF ou, du moins, qu'elle est de trop faible ampleur pour avoir des répercussions sur la population totale de lymphocytes B naïfs, puisqu'aucune altération n'est remarquée dans cette fraction. Également, il est important de souligner qu'en dépit de cette différence dans le compartiment naïf, tous les enfants ENI sont en mesure d'élaborer une immunité mature expérimentée face au tétanos en réponse à la vaccination qui est similaire. Ces observations vont d'ailleurs dans le même sens que celles effectuées sous la stratification basée sur le zénith de la CV maternelle en grossesse.

À la lumière de nos observations, il reste encore difficile de mettre en évidence le mécanisme biologique menant à la perturbation de la population lymphocytaire naïve spécifique au tétanos. Afin d'y parvenir, il serait d'abord bénéfique d'augmenter la taille du groupe d'enfants de 12 mois impliqués dans cette analyse. D'inclure des expériences basées sur un autre antigène pourrait également nous éclairer sur la réelle association entre le phénomène perçu et la nature de l'antigène. Autrement, à la vue de nos résultats, certains mécanismes biologiques nous paraissent potentiellement moins probables que d'autres pour expliquer la différence de fréquence des lymphocytes B naïfs spécifiques au TTCF entre les deux groupes d'enfants. Dans un premier temps, il y a peu de risque que les enfants nés de mères ayant eu un compte de CD4 d'au moins 500 cellules/mm³ en durant toute la grossesse aient un handicap dans la maturation cellulaire induite par la vaccination. Si c'était le cas, il y aurait des répercussions sur la fréquence des populations matures expérimentée, ce qui ne se voit pas dans la situation actuelle. Même si l'on considère qu'étant ténu, l'effet pourrait être dilué dans ces populations et donc non perçu ailleurs, l'altération de la maturation pourrait se voir dans les populations lymphocytaires non spécifiques au tétanos. Or, il n'en est pas ainsi puisqu'aucune différence statistiquement significative n'est remarquée dans les diverses populations de lymphocytes B expérimentés IgM⁻ étudiées. Également, un handicap dans le développement de fractions cellulaires matures expérimentées serait visible bien plus tôt qu'à 12 mois puisque le programme de vaccination québécois débute à 2 mois de vie (Tab.III). Pourtant, on ne note aucune distinction statistiquement significative à 6 mois entre les deux groupes. Dans un contexte où le processus de maturation serait réellement biaisé chez les lymphocytes naïfs spécifiques au tétanos, on pourrait considérer que certains clones ont une réponse altérée face à l'IL-10 et l'IL-21 qui promeuvent plusieurs processus de différenciation chez les lymphocytes B naïfs²⁷⁵.

Dans un deuxième temps, il est peu probable que la différence dans la fréquence de la population lymphocytaire B naïve spécifique au tétanos découle d'un processus hématopoïétique déprimé. Certes, une production diminuée de lymphocytes B par les organes lymphoïdes primaires pourrait expliquer partiellement une plus faible fréquence de lymphocytes B naïfs chez les enfants exposés à une immunité lymphocytaire T CD4⁺

maternelle de moins de 500 cellules/mm³. Or, cette hypothèse ne s'accorde pas avec l'absence de perturbations dans les lymphocytes B naïfs totaux et avec le délai entre la naissance et l'apparition de la déficience à 12 mois. Au contraire, il aurait été plus probable de voir un ralentissement de l'hématopoïèse dans un intervalle plus rapproché à la période anténatale, puisque certains TAR engendrent des altérations hématologiques chez l'enfant ENI¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. En ce sens, il serait intéressant d'examiner les liens entre la faible fréquence de lymphocytes B naïfs, la nature des ARV pris par les mères qui ont eu une immunité lymphocytaire T CD4⁺ déficiente en grossesse ainsi que la durée et le nombre de changements de médication. Toutefois, même si les TAR détiennent une partie de l'explication, il est difficile de comprendre pourquoi les lymphocytes B naïfs totaux ne seraient pas significativement affectés et pourquoi il y aurait un délai si important entre l'effet des ARV *in utero* et le développement du compartiment lymphocytaire B.

Dans un dernier temps, la différence de fréquence pourrait émaner d'un défaut dans la survie des lymphocytes B naïfs chez les enfants exposés à un compte de CD4 sous la normale. D'une part, on pourrait penser qu'une immunité lymphocytaire T CD4⁺ non optimale en grossesse engendre chez l'enfant un changement phénotypique dans la population naïve menant à une apoptose plus rapide. D'ailleurs, il a déjà été rapporté que les cellules B des enfants ENI étaient plus disposées à entrer en apoptose¹⁹⁰. Cela pourrait être dû à des interactions sous-optimales entre cette population et les acteurs impliqués dans leur maintien homéostatique (lymphocytes T CD4⁺, cellules dendritiques, etc.). D'ailleurs, des dérèglements dans le compartiment cellulaire T CD4⁺^{79, 146, 188, 195} et dendritique²⁷⁶ des enfants ENI ont été rapportés, ce qui pourrait se répercuter sur l'environnement des organes lymphoïdes secondaires. Également, le phénomène pourrait être dû à une présence réduite de la cytokine BAFF qui est essentielle à la survie lymphocytaire B en périphérie²⁷⁷. Cependant, l'hypothèse voulant qu'il y ait un défaut dans la survie des lymphocytes B naïfs ne justifie pas pourquoi le phénomène serait restreint aux lymphocytes B naïfs qui ont une spécificité ciblée contre le tétanos ou pourquoi le dérèglement survient si tardivement.

En ce qui concerne la présence de lymphocytes B mémoires spécifiques au tétanos dans le sang de cordon, il semble, a priori, être très peu probable que les enfants ENI aient été exposés *in utero* aux antigènes de *Clostridium tetani*, et donc que toutes les mères aient contracté le tétanos dans une période rapprochée à la grossesse. En fait, plusieurs éléments peuvent expliquer la présence inattendue de ces lymphocytes expérimentés. Premièrement, il est très important de souligner que, dans le sang de cordon, l'expression de CD27 n'indique pas la présence de lymphocytes B mémoires²⁷⁸. Combiné à l'IgM, le CD27 se voit, en réalité, à la surface des lymphocytes B1^{278, 279}. Originellement identifiées chez l'hôte murin, ces cellules B1 ont été associées tant à une activité de protection contre divers pathogènes microbiens qu'à une réactivité auto-immune (revu dans²⁸⁰). Chez l'humain, l'identification d'une population cellulaire similaire à celle retrouvée chez la souris a d'abord été faite dans le contexte de désordres immunitaires (revu dans²⁸¹). Semblablement à celles chez l'hôte murin, les cellules B1 humaines sont capables d'induire une stimulation lymphocytaire T soutenue et de sécréter spontanément des IgM²⁷⁸. Ces derniers sont définis comme étant des anticorps naturels qui permettent de soutenir un répertoire d'anticorps dirigés contre des pathogènes microbiens sans exposition préalable aux antigènes pour lesquels ils sont spécifiques (revu dans²⁸¹). Les lymphocytes B1 se distinguent de la population mémoire par leur expression de CD43 à leur surface^{278, 282}. Malheureusement, comme ce marqueur n'a pas été inclus dans notre stratégie de marquage, il ne fait donc aucun doute que nous n'ayons pas réussi à distinguer les lymphocytes B1 des lymphocytes B expérimentés dans les divers échantillons de PBMC des enfants ENI durant leur première année de vie. Nous pouvons donc supposer que la présence de lymphocytes B « mémoires » spécifiques au tétanos relève plutôt de l'existence de cellules B1 au sein du sang de cordon. D'ailleurs, une forte proportion des lymphocytes B mémoires dans le sang de cordon exprime l'IgM (Tab.V et VII).

Deuxièmement, notre stratégie ne permet pas de différencier les lymphocytes spécifiques aux réactifs constituant les oligomères des cellules spécifiques au TTCF. Du coup, il se peut que les fréquences observées soient issues de cellules spécifiques à la streptavidine et au fluorochrome PE. Il en sera d'ailleurs question à la section 4.3.4.

Troisièmement, il a été rapporté, dans la littérature, qu'il pouvait y avoir une immunisation transplacentaire contre le tétanos chez le fœtus lorsque la mère était vaccinée durant la gestation. Il en résultait une concentration sérique détectable d'IgM spécifiques au tétanos à la naissance²⁸³. Bien qu'il serait surprenant que toutes les femmes se soient fait vacciner durant la grossesse, ces résultats suggèrent que les fœtus sont en mesure d'établir une réponse contre le tétanos en absence de centres germinatifs. On peut donc supposer qu'il y ait une très forte proportion de lymphocytes B mémoires n'ayant pas fait de commutation de classe dans cette sous-population.

Quatrièmement, lors du prélèvement du sang de cordon ombilical, il se peut qu'il y ait eu contamination de l'échantillon avec le sang maternel et que cette contamination ait permis le transfert de certains lymphocytes B expérimentés et spécifiques. Il est toutefois improbable que l'ensemble des échantillons de sang de cordon ait subi un tel transfert de l'immunité humorale maternelle considérant la faible fréquence de cette population lymphocytaire B.

Finalement, bien qu'une vérification de la spécificité des oligomères du TTCF ait été effectuée chez un individu adulte avant qu'il ne reçoive une dose de rappel du vaccin contre le tétanos, nous ne pouvons pas écarter hors de tout doute qu'il puisse y avoir une réactivité croisée de certains anticorps de surfaces polyclonaux avec le TTCF d'autant plus que le compartiment cellulaire B dans le sang de cordon n'est pas à un stade avancé de maturation. Ce phénomène de réactivité croisée consiste en la capacité d'un anticorps à réagir à un antigène distinct de celui auquel il est originellement spécifique en raison d'une homologie de séquence élevée entre les deux antigènes. Par exemple, il a été remarqué, chez les enfants, à la suite de la vaccination contre le pneumocoque de type 6B, qu'il y avait génération d'anticorps capables de réagir contre le sérotype 6A²⁸⁴. De même, il existe une réactivité croisée des anticorps spécifiques au tétanos avec les neurotoxines botuliques²⁸⁵.

Ainsi, malgré la présence d'une altération chez les lymphocytes B naïfs, nos résultats suggèrent que la sévérité des paramètres maternels n'a pas d'effet marqué sur la capacité

d'acquérir de l'expérience à travers la première année de vie et de générer une mémoire immunologique à la suite de la vaccination. D'ailleurs, dans l'ensemble, les constituants cellulaires de cette mémoire immunitaire sont capables de réagir à une stimulation et de soutenir une sécrétion d'anticorps dirigés contre le tétanos. Il existe, en effet, une corrélation positive entre le nombre de lymphocytes B mémoires spécifiques au TTCF observés en cytométrie et le nombre de CFS spécifiques au même antigène, ce qui indique que les CFS observées en ELISpot sont reliées aux données acquises en cytométrie par rapport au compartiment mémoire spécifique au tétanos (Fig.26a). Cette association est cependant perdue à 12 mois de vie, ce qui pourrait être causé par la présence plus marquée de certaines données extrêmes retrouvées à cet âge. En effet, considérant le faible nombre d'échantillons contribuant à l'analyse de corrélation, l'importante dispersion des données et l'aptitude considérable des lymphocytes B mémoires spécifiques au tétanos des enfants ENI à sécréter des anticorps à 6 mois (Fig.26b), il est fort probable que l'absence de corrélation à 12 mois n'ait pas une signification biologique, mais qu'elle ne reflète que les limites techniques et expérimentales du projet (Fig.26c). Ainsi, avant de suggérer que la capacité à soutenir dans le temps une réponse mémoire fonctionnelle contre le tétanos est amputée chez les enfants ENI, il serait important d'augmenter la taille du groupe à l'étude. Par ailleurs, s'il y a confirmation d'une perte du nombre de lymphocytes B mémoires capables de déployer une réponse humorale expérimentée, il serait pertinent de vérifier la relation entre cette perte et la concentration d'anticorps sécrétés par les cellules B mémoires. Comme la majorité des études soutiennent que les enfants ENI répondent adéquatement au vaccin contre le tétanos^{208, 211} (revu dans^{79, 192}), il se pourrait que, même avec un nombre plus restreint d'acteurs humoraux, ils soient capables d'atteindre des concentrations protectrices d'anticorps. Pour le vérifier, il suffirait d'examiner, par le biais d'un ELISA, la teneur en anticorps spécifiques au TTCF du surnageant de culture à la suite d'une stimulation. L'analyse de la taille des spots retrouvés en ELISpot pourrait également remplir le même objectif.

4.3 Limitations de l'étude

4.3.1 Analyse statistique des données

Dans le cadre de cette étude, il a été décidé de procéder à l'analyse statistique sans faire d'ajustement de la valeur p malgré les comparaisons multiples. Un seuil de signification de 0,05 a donc été retenu pour chacune des comparaisons entre les différents groupes d'enfants ENI. Cette décision implique cependant qu'il y a globalement plus que le 5 % de probabilité habituelle que les différences statistiquement significatives présentées ne soient dues qu'au hasard. Effectivement, quand de nombreux tests statistiques sont effectués au sein d'une même analyse sans qu'aucune correction pour comparaisons multiples ne soit appliquée, il y a une inflation de la probabilité de générer des erreurs de types I, soit des faux positifs, qui répond à l'équation de la Figure 27²⁸⁶.

$$X = 100(1.00 - 0,95^N)$$

Où

N= nombre de tests indépendants exécutés

Figure 27. Probabilité d'obtenir une comparaison avec une valeur p significative en fonction du nombre de tests indépendants effectués

À l'inverse, une analyse statistique ajustée pour de multiples comparaisons peut, en outre, induire des erreurs de type II, soit de faux négatifs, en raison des paramètres stricts qu'elle applique. Ainsi, il est souvent nécessaire d'avoir un plus grand nombre de sujets au sein de l'étude (revu dans²⁸⁷), ce qui n'était malheureusement pas possible dans le contexte de notre projet. Il a donc été préféré de mener l'étude sans faire d'ajustement à la valeur p, mais de toujours bien soutenir que les résultats présentés nécessitent d'être interprétés avec prudence. D'ailleurs, comme il en sera question dans les prochaines sections et en perspective, plusieurs aspects du projet requièrent d'être examinés plus profondément et de manière plus exhaustive pour que le portrait de l'immunité humorale des enfants ENI soit bien détaillé et compris en terme de capacité fonctionnelle et de constitution.

4.3.2 Classification des enfants ENI

Les méthodes de stratification des enfants ENI utilisée dans ce projet (zénith de la CV maternelle et nadir du compte de CD4 de la mère) n'ont permis que d'avoir un portrait rudimentaire et imprécis de l'impact des paramètres maternels en grossesse sur le développement de leur compartiment lymphocytaire B. En effet, ces types de classification restreignent l'attention qui devrait être accordée au moment gestationnel des expositions présumées les plus sévères ainsi qu'à la durée et à l'intensité de ces dernières. D'une part, sachant que la transmission verticale du VIH *in utero* prend principalement place dans les quatre dernières semaines de gestation¹⁰⁷, stratifier les enfants selon le trimestre du zénith de la CV maternelle en grossesse pourrait permettre d'établir la période critique durant laquelle les paramètres maternels pourraient influencer le développement du compartiment cellulaire B. D'autre part, dans l'étude actuelle, tous les enfants ENI exposés à une virémie détectable ou à un compte de CD4 inférieur à 500 cellules/mm³ étaient regroupés ensemble, peu importe l'intensité de l'infection ou des altérations immunitaires. Ceci implique, par exemple, qu'un enfant issu d'une mère ayant eu une virémie de 56 copies/ml à une reprise durant la grossesse était dans la même division qu'un enfant né d'une mère ayant eu une CV de 5 000 copies/ml pendant tout le 1^{er} trimestre. Le fait de procéder ainsi dilue d'éventuelles perturbations du compartiment lymphocytaire B qui auraient pu être mieux caractérisées sous une stratification plus raffinée.

Bien que les classifications employées présentent des lacunes, il aurait été difficile de procéder autrement. D'abord, plusieurs femmes avaient des dossiers médicaux incomplets en raison d'un suivi obstétrical ou d'un diagnostic d'infection au VIH tardif ou encore d'une adhésion limitée aux services médicaux. Ainsi, les données sur la CV et sur le compte de CD4 n'étaient pas disponibles pour tous les trimestres pour plusieurs femmes incluses dans l'étude. Cela contraignait notre capacité, par exemple, à stratifier les enfants selon leur exposition à la virémie maternelle au premier trimestre de grossesse. De ce fait, une exclusion de plusieurs enfants à l'analyse aurait été nécessaire pour y parvenir. À titre indicatif, sur les 68 grossesses incluses dans le projet, des données sur la santé maternelle et l'infection au VIH sont manquantes à au moins un trimestre dans 15 cas. Ensuite, bien que le dernier trimestre et

l'accouchement pourraient représenter une fenêtre de temps charnière pour l'exposition du bambin au virus, la quasi-totalité des femmes avait une virémie indétectable durant cette période. En fait, seules 2 femmes avaient une CV détectable à la naissance de leur nouveau-né. De plus, à la lumière des données disponibles, il n'y a que cinq femmes qui ont eu des virémies détectables au cours du troisième trimestre, et celles-ci étaient toutes en dessous de 200 copies/ml. Du coup, il était impossible de comparer les caractéristiques du compartiment lymphocytaire B et de la réponse vaccinale des enfants ENI en se basant sur les données maternelles au troisième trimestre et à la naissance de l'enfant. Somme toute, il est très rassurant de savoir que l'infection au VIH chez la très grande majorité des femmes était bien contrôlée durant la grossesse et qu'il s'agit d'une priorité pour le personnel médical travaillant auprès de cette clientèle. Finalement, même si les informations maternelles avaient été disponibles pour tous les segments de la grossesse, une division des enfants ENI en plus de deux groupes aurait affecté la puissance statistique de notre analyse. En effet, plusieurs expériences ont été réalisées sur un nombre trop restreint d'enfants pour avoir la possibilité de stratifier les résultats de manière plus minutieuse. La solution la plus simple serait de recruter davantage d'enfants.

4.3.3 Comparaison des enfants ENI avec un groupe témoin

L'objectif du projet était de vérifier si l'intensité des paramètres maternels rattachés à l'infection par le VIH avait un effet sur l'immunité de l'enfant, d'où l'intérêt de comparer les enfants ENI entre eux. Toutefois, une telle démarche ne permet pas de déterminer si les fréquences des sous-populations lymphocytaires B et si la capacité du compartiment mémoire à sécréter des anticorps sont similaires à ce qui est observé dans la population pédiatrique générale. Pour être en mesure de vérifier s'il y a des anomalies caractéristiques de l'exposition au VIH ou à l'immunité altérée de la mère, il serait nécessaire d'inclure un groupe témoin non exposé au VIH. Or, s'il n'y a pas de trace de ces enfants au sein de cette étude, ce n'est pas faute d'avoir essayé. Les approbations éthiques ont été effectuées et le recrutement a été lancé bien que tardivement. Cependant, comme nous souhaitions effectuer un suivi longitudinal d'un an, les enfants devaient revenir à 6 et 12 mois pour des prélèvements sanguins. Or, en

absence de problème de santé, il était assez difficile de convaincre les parents de faire subir à leur nourrisson des ponctions veineuses exclusivement à des fins de recherche. En rétrospective, il aurait été plus réaliste de recruter des enfants différents pour les prélèvements du sang de cordon et pour les échantillons à 6 et 12 mois. Le recrutement à ces deux âges aurait pu se faire auprès de la clientèle devant subir une chirurgie d'un jour à l'hôpital et ne souffrant d'aucune morbidité particulière ou d'anomalie génétique ayant des conséquences sur le profil immunitaire.

Bien évidemment, il est faisable de se baser sur les résultats d'autres études pour faire un parallèle entre les données obtenues grâce à ce projet et ce qui est retrouvé chez les enfants non exposés et chez ceux qui vivent avec le VIH. Cette stratégie présente toutefois une faiblesse méthodologique dont on ne peut faire fi : l'hétérogénéité des méthodes d'immunophénotypage^{288, 289}. En effet, les fréquences obtenues en phénotypage sont influencées par les marqueurs choisis pour caractériser les différentes populations cellulaires, par le clone duquel découlent les anticorps libellés (variation dans les épitopes ciblés par les anticorps), la configuration et la nature des instruments d'analyse employés ainsi que la stratégie d'analyse hiérarchique²⁸⁹. Alors que nous ciblons l'IgM pour identifier les lymphocytes naïfs et les populations matures n'ayant pas fait la commutation de classe, certains exploitent l'expression d'IgD^{14, 253}. Dans plusieurs travaux, les auteurs visent l'expression de CD38 pour définir les lymphocytes immatures et les plasmocytes/plasmablastes^{8, 211, 253}, alors que nous n'avons pas accordé d'attention à l'expression de ce marqueur au sein de nos échantillons. Autrement dit, l'absence de lignes directrices standardisées pour le phénotypage des cellules en cytométrie engendre des limitations dans la possibilité d'utiliser des études distinctes pour comparer les fréquences des diverses sous-populations cellulaires humaines^{288, 289}.

4.3.4 Technique de détection des lymphocytes B spécifiques à un antigène

Afin d'identifier les populations rares de lymphocytes B spécifiques au TTCF, nous avons utilisé des oligomères de TTCF formés par le biais de l'interaction de l'antigène

biotinylé avec la streptavidine couplée au fluorochrome PE. Cette méthode mène à une meilleure détection des lymphocytes B spécifiques au tétanos, puisqu'elle augmente l'avidité entre l'anticorps et l'antigène^{220, 221}. Toutefois, elle a comme désavantage d'engendrer des interactions non désirables des RCB avec la streptavidine et le fluorochrome PE^{232, 233, 290}. Dans notre stratégie de détection, ces interactions sont indissociables des liaisons spécifiques au TTCF, ce qui nous expose potentiellement à un biais dans la lecture des fréquences cellulaires. Les tests de spécificité du TTCF (Fig.20) ne nous auraient pas permis de déceler ces interactions indésirables des oligomères avec les lymphocytes B, car le sujet sélectionné pour mener ces expérimentations n'était pas naïf à l'immunisation contre le tétanos. Ainsi, nous nous attendions à trouver quelques lymphocytes B mémoires classiques spécifiques au tétanos dans les cellules B de ces contrôles. D'ailleurs, il est envisageable que ces interactions indésirables soient l'une des causes de la détection de lymphocytes mémoires classiques spécifiques au tétanos dans le sang de cordon des enfants ENI (voir section 4.2).

Pour éviter une telle situation, il aurait été nécessaire de procéder à un double marquage des populations spécifiques au TTCF. Cette technique consiste à utiliser, en plus des oligomères fluorescents, un anticorps couplé à un autre fluorochrome étant spécifique à l'antigène d'intérêt. Pour le TTCF, il aurait été possible de purifier les anticorps sécrétés de l'hybridome SA13 déjà utilisé comme contrôle positif au sein de nos expériences et de coupler ces anticorps au fluorochrome de notre choix avec une trousse commerciale d'étiquetage des anticorps. En procédant ainsi, une cellule bel et bien spécifique pour l'antigène d'intérêt aurait été positive pour les deux fluorochromes : celui de l'oligomère et celui de l'anticorps dirigé contre l'antigène. Plusieurs équipes se sont basées sur le double marquage pour identifier des populations rares^{291, 292}.

L'adoption d'un tel changement de procédure en cours de projet aurait toutefois été assez complexe. Effectivement, les trousse d'étiquetage des anticorps ne permettent pas de choisir n'importe quel fluorochrome et considérant les nombreuses couleurs déjà en place dans la stratégie de phénotypage, il aurait fallu faire des modifications majeures au niveau du choix

des réactifs utilisés. Ceci aurait mis en péril la compatibilité des résultats amassés par Catherine Gravel au cours de sa maîtrise avec ceux découlant de la nouvelle stratégie de phénotypage. Dans l'optique d'appliquer un changement moins invasif quoiqu'imparfait, nous aurions pu faire plusieurs marquages lymphocytaires B chez des sujets témoins et d'incuber les cellules avec la streptavidine couplée à PE uniquement plutôt qu'avec les oligomères de TTCF. De cette manière, nous aurions pu déterminer une fréquence moyenne des lymphocytes B spécifiques à la streptavidine et au PE et ainsi soustraire cette fréquence à celles obtenues lors des marquages avec les oligomères de TTCF chez les enfants ENI.

4.3.5 Validité statistique des sous-populations rares spécifiques au TTCF

Franz *et al.*, qui ont mis au point la technique utilisée dans notre projet, ont établi que les lymphocytes B spécifiques au TTCF représentaient entre 0,0016 % et 0,0113 % des lymphocytes B CD19⁺²²⁰. Il s'agit donc d'une population assez rare de cellules dans le compartiment B, ce qui implique que pour avoir un faible coefficient de variation et un intervalle de confiance adéquat, il est nécessaire d'acquérir énormément d'évènements en cytométrie. Par exemple, sous la distribution statistique de Poisson, pour avoir un coefficient de variation de 5 % avec une fréquence de 0,01 % de lymphocytes B spécifiques au TTCF, il faudrait acquérir au moins 4 millions de lymphocytes B CD19⁺ ^{293, 294}. Puisque nous travaillons avec des échantillons pédiatriques, le nombre de PBMC isolés ne permettait pas d'atteindre de telles valeurs. C'est pour cette raison que nous avons établi qu'une population cellulaire spécifique au TTCF était valide lorsque la population mère dont elle découle contenait au moins 500 évènements comme il a été mentionné à la section 2.7.1. Cette méthode implique donc que le coefficient de variation était parfois très élevé et que la détection des évènements n'a pas toujours une valeur statistiquement significative.

4.4 Perspectives

4.4.1 Évaluation de la réponse vaccinale contre d'autres pathogènes

Bien qu'une réponse sérique satisfaisante chez les enfants ENI a été notée contre *S. pneumoniae*²⁰², elle semble être variables selon le sérotype de la bactérie²⁰⁷. À ce jour, peu de groupes se sont penchés sur la persistance de la fonctionnalité des lymphocytes B mémoires spécifiques au pneumocoque chez les enfants ENI malgré leur plus grande susceptibilité aux infections causées par ce pathogène¹⁷². Nduati *et al.* ont toutefois rapporté que les enfants ENI ne présentaient pas de particularité préoccupante dans la sécrétion d'IgG spécifiques aux agents pathogènes du tétanos et de la diphtérie ainsi qu'au pneumocoque à la suite d'une stimulation des lymphocytes B mémoires²¹¹. Malgré tout, il serait intéressant de documenter davantage la ténacité de la fonctionnalité des lymphocytes B mémoires de ces enfants jusqu'à l'âge scolaire dans le contexte de l'immunisation contre les différents agents pathogènes infantiles. L'évaluation et la comparaison de l'efficacité de l'immunité humorale de longue durée induite par les différents types de vaccins (atténués, conjugués, inactivés, sous-unitaire, etc.) pourrait mener à une meilleure compréhension de la morbidité accentuée des enfants ENI face à différents pathogènes. Comme il a été effectué dans notre étude, il serait important de mettre en relation le nombre de lymphocytes B spécifiques à un antigène et retrouvés en périphérie avec le nombre de ces cellules B mémoires capables d'engager une réponse à la suite de l'exposition à cet antigène. Ceci amènerait à déterminer si les lymphocytes B mémoires des enfants ENI contribuent tous équitablement à la réponse secondaire contre un antigène ou si seule une fraction du compartiment réagit fortement à la menace.

4.4.2 Détermination de la présence d'une réponse humorale contre des composantes antigéniques du VIH

Il a déjà été rapporté que le compartiment lymphocytaire T des enfants ENI comprenait des cellules spécifiques à différents antigènes du VIH^{195, 295-297}, ce qui suggère une véritable exposition du fœtus au virus. Ces lymphocytes T spécifiques au VIH sont rapidement perdus après la naissance probablement en raison de l'absence de contact répété avec les antigènes

viraux ¹⁹⁵. Il y a cependant très peu de documentations sur ce phénomène au sein du profil lymphocytaire B. Moussa *et al.* ont toutefois rapporté que les enfants ENI étant allaités produisent des anticorps spécifiques au VIH au niveau de la muqueuse intestinale ²⁹⁸. Il serait donc intéressant de vérifier la présence d'une telle spécificité au sein de ces cellules, de la quantifier en cytométrie et d'évaluer l'efficacité de ces cellules à sécréter des anticorps à la suite d'une stimulation. Ceci aurait pu permettre d'établir des relations entre l'importance des populations cellulaires B spécifiques au VIH et la CV maternelle durant la grossesse et peut-être de mieux comprendre la spécificité de la population augmentée de plasmablastes chez les enfants exposés à une virémie plus élevée durant la gestation. Dans cette optique, des expériences ont été initiées au cours de ce projet. Malheureusement, en raison des problèmes rencontrés avec les anticorps couplés de BD, il n'a pas été possible de mener à bien toutes les mises au point nécessaires à l'application du protocole sur les échantillons des enfants ENI (Annexe I).

4.4.3 Expression de marqueurs d'activation et d'épuisement dans le compartiment lymphocytaire B

Chez les PVVIH, plusieurs sous-populations lymphocytaires B connaissent une déplétion alors que d'autres subissent une expansion selon le stade de l'infection et la prise d'ARV. Comme il a été mentionné plus tôt, des études ont rapporté l'expression de marqueurs d'activation et d'épuisement qui affectent la fonctionnalité, la prolifération et l'ontogénie des lymphocytes B ^{251, 257}. Parmi les marqueurs d'épuisement, le récepteur inhibiteur FcRL4 affecte fortement la capacité proliférative des lymphocytes B mémoires atypiques^{256, 257} de pair avec le SIGLEC6 ²⁵⁷. D'ailleurs, Jelacic *et al.* ont démontré que la gp120 peut se lier au récepteur $\alpha 4\beta 7$ des cellules B naïves et qu'elle est responsable de l'induction de l'expression du récepteur inhibiteur FcRL4 ²⁵⁶. D'autres marqueurs associés à un effet inhibiteur ont également été mis en évidence, dont le CD85j, le CD22, le CD85k, le LAIR-1 et le CD72 ²⁵¹. Quant à l'activation des lymphocytes B, l'hypergammaglobulinémie a été soulignée par plusieurs équipes ²⁹⁹⁻³⁰². En dehors de cette anomalie, une expression plus importante du CD70 ³⁰², du CD80³⁰³ et du CD86 est caractéristiques des lymphocytes B chez les PVVIH

(revu dans³⁰⁴). Cette hyperactivation pourrait provenir des cascades de cytokines associées à l'infection au VIH (revu dans³⁰⁴).

Face à ces observations chez l'adulte, on pourrait proposer qu'une exposition aux particules virales *in utero* et au profil pro-inflammatoire utérin puisse causer des conséquences similaires sur le profil cellulaire B des enfants ENI. Il serait donc pertinent de mener des analyses phénotypiques se concentrant sur les marqueurs d'épuisement, plus particulièrement le FcRL4 et par le fait même enquêter sur la cinétique d'activation du compartiment lymphocytaire B du nouveau-né ENI. Une attention particulière à la capacité proliférative des cellules B devrait être prioritaire en raison de l'impact que provoque l'expression des marqueurs d'épuisement sur cette propriété cellulaire.

4.4.4 Évaluation des marqueurs d'inflammation chez l'enfant ENI et de l'environnement placentaire

Comme discuté plus tôt, l'inflammation pourrait affecter le profil lymphocytaire B des enfants ENI. Celle-ci pourrait découler tant du milieu placentaire altéré, de l'inflammation chronique chez la mère causée par l'infection au VIH que d'une inflammation fœtale systémique modérée montrant des similarités avec le SRIF. Puisque cet aspect n'a pas été évalué jusqu'à présent dans l'étude et que le plasma a été collecté pour l'ensemble des enfants ENI à leur naissance ainsi qu'à 6 et 12 mois de vie, nous pourrions vérifier la présence de certains marqueurs d'inflammation et de différenciation cellulaire B. En ce qui concerne le SRIF, il a été noté que l'IL-6, l'IL-8 et l'IL- β 1 étaient augmentées dans le sang de cordon²⁴⁰. L'étude de ces cytokines dans le sang de cordon pourrait permettre d'établir si les enfants ENI connaissent une pathologie plus légère, mais similaire au SRIF. Dans le cadre de la différenciation lymphocytaire B en CSA, l'IL-6 apparaît encore comme étant un facteur clé^{245, 246}. En plus de cette cytokine, l'IL-21^{249, 250}, l'IL-10, l'IL-12 et l'IL-2 sont également des promoteurs de CSA²⁴⁵. Par ailleurs, d'autres molécules pourraient mieux caractériser la présence d'inflammation chez les ENI. Parmi celles-ci, notons le TNF- α qui, comme

mentionné plus tôt, a un effet antiprolifératif sur les lymphocytes B et affecte le développement précoce de ces cellules en altérant l'axe CXCL12/CXCR4 (revu dans²⁶²).

Pour évaluer ces différentes cytokines, il serait possible de procéder par dosage immunologique multiparamétrique de type Luminex ou Bio-Plex qui permet la quantification de plusieurs protéines au sein d'un même test. La vérification de l'état placentaire par le biais des analyses en pathologie permettrait de voir si certains placentas avaient certaines anomalies au niveau de leur intégrité et s'ils affichaient des signes d'inflammation. Ainsi, nous aurions la chance d'établir un portrait plus précis des conditions de gestation des enfants ENI.

Chapitre 5 : Conclusion

Par le présent projet, nous avons pu fournir un portrait détaillé de la fréquence d'un nombre exhaustif de sous-populations lymphocytaires B retrouvées chez les enfants ENI dans leur 1^{re} année de vie. Malgré cette analyse poussée et le risque accru de morbidité et la mortalité chez les enfants ENI en bas âge, la sévérité de la condition maternelle relative à l'infection au VIH ne semble pas être la prémisse d'une altération importante du développement de ce compartiment lymphocytaire. Toutefois, les enfants étant issus de mères avec une infection au VIH moins bien contrôlée et avec une altération de leur immunité lymphocytaire T CD4⁺ en grossesse affichent une activation plus prononcée du compartiment lymphocytaire B caractérisé par une abondance relative élevée de plasmablastes à la naissance. Ce phénomène pourrait être la conséquence du milieu pro-inflammatoire placentaire, de la réplication virale active et de l'exposition plus prononcée à des agents pathogènes durant le développement précoce de l'immunité humorale. Ces mêmes éléments pourraient également affecter la fréquence de lymphocytes B CD19⁺ des nouveau-nés exposés à une CV détectable *in utero*. Heureusement, dès l'âge de 6 mois, il n'y a plus de trace de telles modifications dans le profil cellulaire B, mais des différences au niveau de la commutation de classe sont apparentes chez les populations B matures expérimentées.

Quant à l'étude de la réponse vaccinale contre le tétanos chez les enfants ENI, notre étude est, à l'heure actuelle, la première à avoir combiné la détection *ex vivo* des populations cellulaires B spécifiques au tétanos à l'aide d'oligomères fluorescents du TTCF et l'évaluation de la capacité des lymphocytes B mémoires à sécréter des IgG spécifiques contre cet antigène. Ces travaux ont, d'une part, permis de conclure que la réponse vaccinale contre le tétanos ne révèle aucun problème considérable relativement aux paramètres maternels, ce qui est très encourageant. D'autre part, nous avons pu démontrer que le compartiment mémoire étudié par immunophénotypage était capable de déployer une réponse humorale spécifique au TTCF à la suite d'une stimulation.

De manière à obtenir un portrait encore plus complet de leur immunité humorale, l'étude des marqueurs d'épuisement, de la réponse vaccinale contre d'autres pathogènes et de la présence d'une immunité humorale dirigée contre le VIH serait pertinente. De plus, l'addition d'un groupe d'enfants non exposés au VIH serait fort utile pour se prononcer sur la normalité des fréquences cellulaires observée et pour valider que la capacité des lymphocytes B mémoires à être activés et à s'engager dans une réponse humorale efficace correspondant à ce qui est observé dans la population pédiatrique générale.

Bibliographie

1. Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in Immunology*. 2008;20(4):207-12.
2. Bakhuraysah MM, Siatskas C, Petratos S. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it a clinical reality? *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:12.
3. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Review*. 2010;234(1):45-54.
4. Early P, Huang H, Davis M, Calama K, Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell*. 1980;19(4):981-92.
5. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(3):195-205.
6. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:541-70.
7. Magklara A, Lomvardas S. Stochastic gene expression in mammals: lessons from olfaction. *Trends in Cell Biology*. 2013;23(9):449-56.
8. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005;105(11):4390-8.
9. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ, et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*. 2010;115(3):519-29.
10. Agrawal S, Smith SA, Tangye SG, Sewell WA. Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clinical & Experimental Immunology*. 2013;174(1):53-9.
11. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*. 2009;182(10):5982-93.

12. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008;127(1):14-25.
13. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(8):633-43.
14. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol*. 2012;3:302.
15. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(3):137-48.
16. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(3):149-59.
17. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520.
18. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
19. Nutt SL, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 2007;26(6):715-25.
20. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(3):160-71.
21. Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, Busse CE, Wardemann H, Quake SR. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nature Biotechnology*. 2014;32(2):158-68.
22. World Health Organization. HIV/AIDS: Fact sheet [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2017 [modifié le juillet 2017; cité le 20 juillet 2017]. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>
23. World Health Organization. Data and statistics [En ligne]. Genève: World health Organization; 2016 [modifié le 15 juin 2016; cité le 18 juillet 2017]. Disponible: <http://www.who.int/hiv/data/en/>
24. UNAIDS. Prevention gap report [En ligne]. Suisse: UNAIDS; 2016 [modifié le 11 juillet 2016; cité le 19 juillet 2017]. Disponible: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/prevention-gap>

25. WHO, UNAIDS. AIDS epidemic update 2009 [En ligne]. Genève: WHO, UNAIDS; 2009 [modifié le novembre 2009; cité le juin 2014]. Disponible: http://data.unaids.org/pub/report/2009/jc1700_epi_update_2009_en.pdf
26. UNAIDS. UNAIDS Data 2017 [En ligne]. Suisse: UNAIDS; 2017 [modifié le 20 juillet 2017; cité le 20 juillet 2017]. Disponible: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/20170720_Data_book_2017
27. Public Health Agency of Canada. Summary: Measuring Canada's Progress on the 90-90-90 HIV Targets [En ligne]. Canada: Public Health Agency of Canada; 2016 [modifié le 12 avril 2017; cité le 20 juillet 2017]. Disponible: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/summary-measuring-canada-progress-90-90-90-hiv-targets.html>
28. World Health Organization. Progress Report 2016: prevent HIV, test and treat all: WHO support for country impact. Suisse: World Health Organization, 2016. Contrat No.: WHO/HIV/2016.24.
29. Public Health Agency of Canada. Summary: Estimates of HIV incidence, prevalence and proportion undiagnosed in Canada, 2014 [En ligne]. Canada: Government of Canada; 2015 [modifié le 27 novembre 2015; cité le 19 juillet 2017]. Disponible: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/summary-estimates-hiv-incidence-prevalence-proportion-undiagnosed-canada-2014.html>
30. Challacombe L. The epidemiology of HIV in Canada [En ligne]. Canada: Canadian AIDS Treatment Information Exchange; 2017 [cité le 19 juillet 2017]. Disponible: http://www.catie.ca/en/fact-sheets/epidemiology/epidemiology-hiv-canada#footnote1_crjm6st
31. Canadian Institutes of Health Research. CIHR HIV/AIDS Research Initiative: Strategic plan (2015-2020) [En ligne]. Canada: Canadian Institutes of Health Research; 2015 [modifié le 27 août 2015; cité le 20 juillet 2017]. Disponible: <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/49302.html>
32. Agence de la santé publique du Canada. Rapport d'étape sur le VIH/sida et les populations distinctes : Personnes vivant avec le VIH/sida [En ligne]. Canada: Agence de la santé publique du Canada; 2015 [modifié le 14 janvier 2015; cité le 20 juillet 2017]. Disponible: <http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/publication/ps-pd/people-personnes/chapter-chapitre-2-fra.php>

33. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(4):279-90.
34. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2010;46(1):5-14.
35. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*. 2005;34(4):233-44.
36. Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(12):877-83.
37. Mayr LM, Zolla-Pazner S. Antibodies Targeting the Envelope of HIV-1. *Microbiology Spectrum*. 2015;3(1):AID-0025-2014.
38. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422(6929):307-12.
39. Kumar R, Tuen M, Liu J, Nadas A, Pan R, Kong X, et al. Elicitation of broadly reactive antibodies against glycan-modulated neutralizing V3 epitopes of HIV-1 by immune complex vaccines. *Vaccine*. 2013;31(46):5413-21.
40. West AP, Jr., Scharf L, Scheid JF, Klein F, Bjorkman PJ, Nussenzweig MC. Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. *Cell*. 2014;156(4):633-48.
41. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*. 2014;384(9939):258-71.
42. Kandathil AJ, Sugawara S, Balagopal A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology*. 2016;13(1):86.
43. Schwartz C, Bouchat S, Marban C, Gautier V, Van Lint C, Rohr O, et al. On the way to find a cure: Purging latent HIV-1 reservoirs. *Biochemical Pharmacology*. 2017.
44. Jr RTD, Bhat N, Yoder C, Chun T-W, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(26):15109-14.
45. Orkin C, Llibre JM, Gallien S, Antinori A, Behrens G, Carr A. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor-reducing strategies in HIV treatment: assessing the evidence. *HIV Medicine*. 2017.

46. Gunthard HF, Saag MS, Benson CA, del Rio C, Eron JJ, Gallant JE, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Journal of the American Medical Association*. 2016;316(2):191-210.
47. Wilson EM, Sereti I. Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunological Reviews*. 2013;254(1):343-54.
48. Tinago W, Cotter AG, Caroline A S, Macken A, Kavanagh E, Brady JJ, et al. Predictors of longitudinal change in bone mineral density in a cohort of HIV-positive and negative subjects. *AIDS*. 2017;31(5):643-52.
49. Escota GV, Mondy K, Bush T, Conley L, Brooks JT, Onen N, et al. High Prevalence of Low Bone Mineral Density and Substantial Bone Loss over 4 Years Among HIV-Infected Persons in the Era of Modern Antiretroviral Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2016;32(1):59-67.
50. Grund B, Peng G, Gibert CL, Hoy JF, Isaksson RL, Shlay JC, et al. Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density. *AIDS*. 2009;23(12):1519-29.
51. Mallon PW. Impact of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on coronary heart disease. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2014;15(Suppl 1):S21-S9.
52. Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy I, Groups DADS. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS*. 2008;22(14):F17-24.
53. Brennan A, Evans D, Maskew M, Naicker S, Ive P, Sanne I, et al. Relationship between renal dysfunction, nephrotoxicity and death among HIV adults on tenofovir. *AIDS*. 2011;25(13):1603-9.
54. Tanuma J, Jiamsakul A, Makane A, Avihingsanon A, Ng OT, Kiertiburanakul S, et al. Renal Dysfunction during Tenofovir Use in a Regional Cohort of HIV-Infected Individuals in the Asia-Pacific. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161562.
55. Feeney ER, Mallon PWG. HIV and HAART-Associated Dyslipidemia. *Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2011;5:49-63.
56. Parkes-Ratanshi R, Katende D, Levin J, Wakeham K, Heiner G, Kamali A, et al. Development of Severe Anemia and Changes in Hemoglobin in a Cohort of HIV-Infected Ugandan Adults Receiving Zidovudine-, Stavudine-, and Tenofovir-Containing Antiretroviral

Regimens. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*. 2015;14(5):455-62.

57. Ssali F, Stöhr W, Munderi P, Reid A, Walker AS, Gibb DM, et al. Prevalence, incidence and predictors of severe anaemia with zidovudine-containing regimens in African adults with HIV infection within the DART trial. *Antiviral Therapy*. 2006;11(6):741-9.

58. Bunupuradah T, Kariminia A, Chan KC, Ramautarsing R, Huy BV, Han N, et al. Incidence and predictors of severe anemia in Asian HIV-infected children using first-line antiretroviral therapy. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(10):e806-10.

59. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *Journal of Virology*. 2009;83(8):3719-33.

60. Schacker T, Collier CA, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Annals of Internal Medicine*. 1996;125(4):257-64.

61. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine*. 1998;339(1):33-9.

62. Centers for Disease Control and Prevention. Opportunistic Infections [En ligne]. États-Unis: Centers for Disease Control and Prevention; 2017 [modifié le 30 mai 2017; cité le 26 juillet 2017]. Disponible: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html>

63. Bruchfeld J, Correia-Neves M, Kallenius G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(7):a017871.

64. Sonnenberg P, Glynn JR, Fielding K, Murray J, Godfrey-Faussett P, Shearer S. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(2):150-8.

65. World Health Organization. HIV/AIDS [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2017 [modifié le Novembre 2017; cité le 15 décembre 2017]. Disponible: <http://www.who.int/features/qa/71/en/>

66. World Health Organization. Tuberculosis and HIV [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2017 [modifié le 2017; cité le 15 décembre 2017]. Disponible: http://www.who.int/hiv/topics/tb/about_tb/en/

67. Kwan CK, Ernst JD. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):351-76.
68. Adhikari M. Tuberculosis and tuberculosis/HIV co-infection in pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009;14(4):234-40.
69. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in Genetics.* 2010;26(3):119-31.
70. Walker BD. Elite Control of HIV Infection: Implications for Vaccines and Treatments. *Topics in HIV Medicine.* 2007;15(4):134-6.
71. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard Cc, Meyer L, et al. HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1–Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication. *Clinical Infectious Disease.* 2005;41(7):1053-6.
72. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS.* 2009;23(9):1163-9.
73. Gonzalo-Gil E, Ikediobi U, Sutton RE. Mechanisms of Virologic Control and Clinical Characteristics of HIV+ Elite/Viremic Controllers. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 2017;90(2):245-9.
74. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *Journal of Infectious Diseases.* 2009;200(11):1714-23.
75. Olson AD, Guiguet M, Zangerle R, Gill J, Perez-Hoyos S, Lodi S, et al. Evaluation of Rapid Progressors in HIV Infection as an Extreme Phenotype. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome.* 2014;67(1):15-21.
76. Blankson JN. Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses? *Antiviral Research.* 2010;85(1):295-302.
77. Arab K, Spence AR, Czuzoj-Shulman N, Abenhaim HA. Pregnancy outcomes in HIV-positive women: a retrospective cohort study. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2017;295(3):599-606.

78. Sebitloane HM, Moodley D. The impact of highly active antiretroviral therapy on obstetric conditions: A review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2017;210:126-31.
79. Pfeifer C, Bunders MJ. Maternal HIV infection alters the immune balance in the mother and fetus; implications for pregnancy outcome and infant health. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(2):138-45.
80. Xiao PL, Zhou YB, Chen Y, Yang MX, Song XX, Shi Y, et al. Association between maternal HIV infection and low birth weight and prematurity: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2015;15:246.
81. Lopez M, Figueras F, Coll O, Gonce A, Hernandez S, Lonca M, et al. Inflammatory Markers Related to Microbial Translocation Among HIV-Infected Pregnant Women: A Risk Factor of Preterm Delivery. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;213(3):343-50.
82. Sibiude J, Warszawski J, Tubiana R, Dollfus C, Faye A, Rouzioux C, et al. Premature delivery in HIV-infected women starting protease inhibitor therapy during pregnancy: role of the ritonavir boost? *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(9):1348-60.
83. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, Tookey PA. Antiretroviral therapy and premature delivery in diagnosed HIV-infected women in the United Kingdom and Ireland. *AIDS*. 2007;21(8):1019-26.
84. Raghupathy R, Al-Azemi M, Azizieh F. Intrauterine growth restriction: cytokine profiles of trophoblast antigen-stimulated maternal lymphocytes. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:734865.
85. Mehta S, Manji KP, Young AM, Brown ER, Chasela C, Taha TE, et al. Nutritional indicators of adverse pregnancy outcomes and mother-to-child transmission of HIV among HIV-infected women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87(6):1639-49.
86. Haider BA, Olofin I, Wang M, Spiegelman D, Ezzati M, Fawzi WW, et al. Anaemia, prenatal iron use, and risk of adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*. 2013;346:f3443.
87. Ehrenberg HM, Dierker L, Milluzzi C, Mercer BM. Low maternal weight, failure to thrive in pregnancy, and adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003;189(6):1726-30.

88. Volberding PA, Levine AM, Dieterich D, Mildvan D, Mitsuyasu R, Michael Saag for the Anemia in HIV Working Group. Anemia in HIV Infection: Clinical Impact and Evidence-Based Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(10):1454-63.
89. Sansone M, Sarno L, Saccone G, Berghella V, Maruotti GM, Migliucci A, et al. Risk of Preeclampsia in Human Immunodeficiency Virus-Infected Pregnant Women. *Obstetrics & Gynecology*. 2016;127(6):1027-32.
90. Sebitloane HM, Moodley J, Sartorius B. Associations between HIV, highly active anti-retroviral therapy, and hypertensive disorders of pregnancy among maternal deaths in South Africa 2011-2013. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2017;136(2):195-9.
91. Kalumba VM, Moodley J, Naidoo TD. Is the prevalence of pre-eclampsia affected by HIV/AIDS? A retrospective case-control study. *Cardiovascular Journal of Africa*. 2013;24(2):24-7.
92. Mattar R, Amed AM, Lindsey PC, Sass N, Daher S. Preeclampsia and HIV infection. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004;117(2):240-1.
93. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2000;85(1):9-18.
94. Berger A. Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they? *British Medical Journal*. 2000;321(7258):424.
95. Fiore S, Newell ML, Trabattoni D, Thorne C, Gray L, Savasi V, et al. Antiretroviral therapy-associated modulation of Th1 and Th2 immune responses in HIV-infected pregnant women. *Journal of Reproductive Immunology*. 2006;70(1-2):143-50.
96. Shivakoti R, Gupta A, Ray JC, Uprety P, Gupte N, Bhosale R, et al. Soluble CD14: An Independent Biomarker for the Risk of Mother-to-Child Transmission of HIV in a Setting of Preexposure and Postexposure Antiretroviral Prophylaxis. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;213(5):762-5.
97. Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M, Davila L, Okazaki T, et al. Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;60(3):264-73.

98. Abu-Raya B, Smolen KK, Willems F, Kollmann TR, Marchant A. Transfer of Maternal Antimicrobial Immunity to HIV-Exposed Uninfected Newborns. *Front Immunol.* 2016;7:338.
99. Borges-Almeida E, Milanez HM, Vilela MMS, Cunha FG, Abramczuk BM, Reis-Alves SC, et al. The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infect Dis.* 2011;11:38.
100. Faye A, Pornprasert S, Mary JY, Dolcini G, Derrien M, Barre-Sinoussi F, et al. Characterization of the main placental cytokine profiles from HIV-1-infected pregnant women treated with anti-retroviral drugs in France. *Clinical & Experimental Immunology.* 2007;149(3):430-9.
101. World Health Organization. Tuberculosis in Women [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2015 [modifié le Novembre 2015; cité le 15 décembre 2017]. Disponible: http://www.who.int/tb/publications/tb_women_factsheet_251013.pdf
102. Salazar-Austin N, Hoffmann J, Cohn S, Mashabela F, Waja Z, Lala S, et al. Poor Obstetric and Infant Outcomes in HIV-Infected Pregnant Women with Tuberculosis in South Africa: The Tshepiso Study. *Clinical Infectious Diseases.* 2017.
103. Bekker A, Schaaf HS, Draper HR, Kriel M, Hesselning AC. Tuberculosis Disease during Pregnancy and Treatment Outcomes in HIV-Infected and Uninfected Women at a Referral Hospital in Cape Town. *PLoS One.* 2016;11(11):e0164249.
104. UNAIDS. 2015 progress report on the global plan towards the elimination of new HIV infections among children and keeping their mothers alive [En ligne]. Suisse: UNAIDS; 2015 [modifié le 25 novembre 2015; cité le 28 juillet 2017]. Disponible: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/JC2774_2015ProgressReport_GlobalPlan
105. World Health Organization. Global health sector strategy on HIV, 2016-2021 [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2016 [modifié le Juin 2016; cité le 28 juillet 2017]. Disponible: <http://www.who.int/hiv/strategy2016-2021/ghss-hiv/en/>
106. World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2013 [modifié le 30 juin 2013; cité le 28 juillet 2017]. Disponible: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/download/en/>

107. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(11):726-32.
108. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, Vincenzi Id, Saba J, Hoff E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *Journal of American Medical Association*. 2000;283(9):1175-82.
109. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, et al. Maternal Levels of Plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA and the Risk of Perinatal Transmission. *The New England journal of medicine*. 1999;341(6):394-402.
110. Tubiana R, Le Chenadec J, Rouzioux C, Mandelbrot L, Hamrene K, Dollfus C, et al. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clinical Infectious Disease*. 2010;50(4):585-96.
111. Bhoopat L, Khunamornpong S, Sirivatanapa P, Rithaporn T, Lerdsrimongkol P, Thorner PS, et al. Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Modern Pathology*. 2005;18(10):1357-64.
112. Kourtis AP, Bulterys M, Nesheim SR, Lee FK. Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *Journal of the american medical association*. 2001;285(6):709-12.
113. Anigilaje EA, Dabit OJ, Olutola A, Ageda B, Aderibigbe SA. HIV-free survival according to the early infant-feeding practices; a retrospective study in an anti-retroviral therapy programme in Makurdi, Nigeria. *BMC Infect Dis*. 2015;15:132.
114. Iliff PJ, Piwoz EG, Tavengwa NV, Zunguza CD, Marinda ET, Nathoo KJ, et al. Early exclusive breastfeeding reduces the risk of postnatal HIV-1 transmission and increases HIV-free survival. *AIDS*. 2005;19(7):699-708.
115. Patel D, Bland R, Coovadia H, Rollins N, Coutsooudis A, Newell ML. Breastfeeding, HIV status and weights in South African children: a comparison of HIV-exposed and unexposed children. *AIDS*. 2010;24(3):437-45.
116. Slogrove AL, Goetghebuer T, Cotton MF, Singer J, Bettinger JA. Pattern of Infectious Morbidity in HIV-Exposed Uninfected Infants and Children. *Front Immunol*. 2016;7:164.

117. Townsend CL, Byrne L, Cortina-Borja M, Thorne C, de Ruiter A, Lyall H, et al. Earlier initiation of ART and further decline in mother-to-child HIV transmission rates, 2000-2011. *AIDS*. 2014;28(7):1049-57.
118. Hoffman RM, Black V, Technau K, van der Merwe KJ, Currier J, Coovadia A, et al. Effects of highly active antiretroviral therapy duration and regimen on risk for mother-to-child transmission of HIV in Johannesburg, South Africa. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 2010;54(1):35-41.
119. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *The New England journal of medicine*. 1994;331(18):1173-80.
120. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, Ruiter Ad, Lyall H, Tookey PA. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland. *AIDS*. 2008;22(8):973-81.
121. Forbes JC, Alimenti AM, Singer J, Brophy JC, Bitnun A, Samson LM, et al. A national review of vertical HIV transmission. *AIDS*. 2012;26(6):757-63.
122. European Collaborative Study. Mother-to-Child Transmission of HIV Infection in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(3):458-65.
123. World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: Recommendations for a public health approach [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2016 [modifié le Juin 2016; cité le 30 juillet 2017]; Seconde édition:[Disponible: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/>]
124. Money D, Tulloch K, Boucoiran I, Caddy S, Yudin MH, Allen V, et al. Guidelines for the Care of Pregnant Women Living With HIV and Interventions to Reduce Perinatal Transmission: Executive Summary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 2014;36(8):721-34.
125. United States Department of Health and Human Services. Intrapartum Care: Transmission and Mode of Delivery [En ligne]. États-Unis: United States Department of Health and Human Services; 2016 [modifié le 26 octobre 2016; cité le 31 juillet 2017]. Disponible: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/3/perinatal-guidelines/182/transmission-and-mode-of-delivery>

126. Fiore S, Newell M, Thorne C, European HIV in Obstetrics Group. Higher rates of postpartum complications in HIV infected than in uninfected women irrespective of mode of delivery. *AIDS*. 2004;18(6):933-8.
127. Kourtis AP, Ellington S, Pazol K, Flowers L, Haddad L, Jamieson DJ. Complications of cesarean deliveries among HIV-infected women in the United States. *AIDS*. 2014;28(17):2609-18.
128. Marcollet A, Goffinet F, Firtion G, Pannier E, Bret TL, Brival M-L, et al. Differences in postpartum morbidity in women who are infected with the human immunodeficiency virus after elective cesarean delivery, emergency cesarean delivery, or vaginal delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002;186(4):784-9.
129. Read J, Tuomala R, Kpamegan E, Zorrilla C, Landesman S, Brown G, et al. Mode of delivery and postpartum morbidity among HIV-infected women: the women and infants transmission study. *Journal of acquired Immune deficiency syndromes*. 2001;26(3):236-45.
130. Bitnun A, Brophy J, Samson L, Alimenti A, Kakkar F, Lamarre V, et al. Prevention of vertical HIV transmission and management of the HIV-exposed infant in Canada in 2014. *Canadian Journal of Infectious disease and Medical Microbiology*. 2014;25(2):75-7.
131. Centers for Disease Control and Prevention. Diseases and Conditions [En ligne]. États-Unis: Centers for Disease Control and Prevention; 2017 [modifié le 18 novembre 2016; cité le 31 juillet 2017]. Disponible: <https://www.cdc.gov/breastfeeding/disease/index.htm>
132. United States Department of Health and Human Services. Preventing Mother-to-Child Transmission of HIV [En ligne]. États-Unis: United States Department of Health and Human Services; 2017 [modifié le 16 mai 2017; cité le 31 juillet 2017]. Disponible: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/20/50/preventing-mother-to-child-transmission-of-hiv>
133. United States Department of Health and Human Services. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States [En ligne]. États-Unis: United States Department of Health and Human Services; 2016 [modifié le 26 octobre 2016; cité le 31 juillet 2017]. Disponible: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/3/perinatal-guidelines/0/#>

134. Shapiro RL, Lockman S. Mortality among HIV-exposed infants: the first and final frontier. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;50(3):445-7.
135. Kalk E, Schubert P, Bettinger JA, Cotton MF, Esser M, Slogrove A, et al. Placental pathology in HIV infection at term: a comparison with HIV-uninfected women. *Tropical Medicine & International Health*. 2017;22(5):604-13.
136. Mofenson LM. Antiretroviral Therapy and Adverse Pregnancy Outcome: The Elephant in the Room? *Journal of Infectious Disease*. 2016;213(7):1051-4.
137. Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret B, Firtion G, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *The Lancet*. 1999;354(9184):1084-9.
138. Jao J, Abrams EJ. Metabolic complications of in utero maternal HIV and antiretroviral exposure in HIV-exposed infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2014;33(7):734-40.
139. Kohler JJ, Lewis W. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2007;48(3-4):166-72.
140. Cote HC, Raboud J, Bitnun A, Alimenti A, Money DM, Maan E, et al. Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2008;198(6):851-9.
141. Ross AC, Leong T, Avery A, Castillo-Duran M, Bonilla H, Lebrecht D, et al. Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Medicine*. 2012;13(2):98-106.
142. Moren C, Noguera-Julian A, Garrabou G, Rovira N, Catalan M, Bano M, et al. Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies. *AIDS*. 2015;29(1):5-12.
143. Aldrovandi GM, Chu C, Shearer WT, Li D, Walter J, Thompson B, et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women. *Pediatrics*. 2009;124(6):e1189-97.
144. Noguera-Julian A, Moren C, Rovira N, Garrabou G, Catalan M, Sanchez E, et al. Decreased Mitochondrial Function Among Healthy Infants Exposed to Antiretrovirals During Gestation, Delivery and the Neonatal Period. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2015;34(12):1349-54.

145. Jitratkosol MH, Sattha B, Maan EJ, Gadawski I, Harrigan PR, Forbes JC, et al. Blood mitochondrial DNA mutations in HIV-infected women and their infants exposed to HAART during pregnancy. *AIDS*. 2012;26(6):675-83.
146. Afran L, Garcia Knight M, Nduati E, Urban BC, Heyderman RS, Rowland-Jones SL. HIV-exposed uninfected children: a growing population with a vulnerable immune system? *Clinical & Experimental Immunology*. 2014;176(1):11-22.
147. Pacheco S, McIntosh K, Lu M, Mofenson L, Diaz C, Foca M, et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: an analysis of the women and infants transmission study. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(8):1089-97.
148. Feiterna-Sperling C, Weizsaecker K, Bühner C, Casteleyn S, Loui A, Schmitz T, et al. Hematologic Effects of Maternal Antiretroviral Therapy and Transmission Prophylaxis in HIV-1–Exposed Uninfected Newborn Infants. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 2007;45(1):43-51.
149. Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyaux C, Blanche S, Enquete Perinatale Francaise Study G. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS*. 2003;17(14):2053-61.
150. El Beitune P, Duarte G. Antiretroviral agents during pregnancy: consequences on hematologic parameters in HIV-exposed, uninfected newborn infant. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2006;128(1-2):59-63.
151. World Health Organization. Strategic approaches to the prevention of HIV infection in infants [En ligne]. World Health Organization; 2003 [modifié le 1 septembre 2003; cité le 1 août 2017]. Disponible: <http://www.who.int/hiv/pub/mtct/strategic/en/>
152. Brennan AT, Bonawitz R, Gill CJ, Thea DM, Kleinman M, Useem J, et al. A meta-analysis assessing all-cause mortality in HIV-exposed uninfected compared with HIV-unexposed uninfected infants and children. *AIDS*. 2016;30(15):2351-60.
153. Landes M, van Lettow M, Chan AK, Mayuni I, Schouten EJ, Bedell RA. Mortality and health outcomes of HIV-exposed and unexposed children in a PMTCT cohort in Malawi. *PLoS One*. 2012;7(10):e47337.
154. Shapiro RL, Lockman S, Kim S, Smeaton L, Rahkola JT, Thior I, et al. Infant morbidity, mortality, and breast milk immunologic profiles among breast-feeding HIV-

infected and HIV-uninfected women in Botswana. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(4):562-9.

155. Ades V, Mwesigwa J, Natureeba P, Clark TD, Plenty A, Charlebois E, et al. Neonatal mortality in HIV-exposed infants born to women receiving combination antiretroviral therapy in Rural Uganda. *J Trop Pediatr*. 2013;59(6):441-6.

156. Arikawa S, Rollins N, Newell ML, Becquet R. Mortality risk and associated factors in HIV-exposed, uninfected children. *Tropical Medicine & International Health*. 2016;21(6):720-34.

157. Arikawa S, Rollins N, Jourdain G, Humphrey J, Kourtis A, Hoffman I, et al. Contribution of maternal ART for life and breastfeeding to 24-month survival in HIV-exposed uninfected children: an individual pooled analysis of African and Asian studies. 9th International AIDS Society Conference on HIV Science; 23 juillet 2017; Paris: International AIDS Society; 2017.

158. Marinda E, Humphrey JH, Iliff PJ, Mutasa K, Nathoo KJ, Piwoz EG, et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007;26(6):519-26.

159. Newell M-L, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *The Lancet*. 2004;364(9441):1236-43.

160. Heresi GP, Caceres E, Atkins JT, Reuben J, Doyle M. *Pneumocystis Carinii* Pneumonia in Infants Who Were Exposed to Human Immunodeficiency Virus but Were Not Infected: An Exception to the AIDS Surveillance Case Definition. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25(3):739-40.

161. McNally LM, Jeena PM, Gajee K, Thula SA, Sturm AW, Cassol S, et al. Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. *The Lancet*. 2007;369(9571):1440-51.

162. Slogrove AL, Cotton MF, Esser MM. Severe infections in HIV-exposed uninfected infants: clinical evidence of immunodeficiency. *J Trop Pediatr*. 2010;56(2):75-81.

163. Taron-Brocard C, Le Chenadec J, Faye A, Dollfus C, Goetghebuer T, Gajdos V, et al. Increased risk of serious bacterial infections due to maternal immunosuppression in HIV-

exposed uninfected infants in a European country. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(9):1332-45.

164. Dauby N, Chamekh M, Melin P, Slogrove AL, Goetghebuer T. Increased Risk of Group B Streptococcus Invasive Infection in HIV-Exposed but Uninfected Infants: A Review of the Evidence and Possible Mechanisms. *Front Immunol*. 2016;7:505.

165. Adler C, Haelterman E, Barlow P, Marchant A, Levy J, Goetghebuer T. Severe Infections in HIV-Exposed Uninfected Infants Born in a European Country. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135375.

166. Epalza C, Goetghebuer T, Hainaut M, Prayez F, Barlow P, Dediste A, et al. High incidence of invasive group B streptococcal infections in HIV-exposed uninfected infants. *Pediatrics*. 2010;126(3):e631-8.

167. Cutland CL, Schrag SJ, Thigpen MC, Velaphi SC, Wadula J, Adrian PV, et al. Increased risk for group B Streptococcus sepsis in young infants exposed to HIV, Soweto, South Africa, 2004-2008(1). *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(4):638-45.

168. El Beitune P, Duarte G, Maffei CM, Quintana SM, De Sa Rosa ESAC, Nogueira AA. Group B Streptococcus carriers among HIV-1 infected pregnant women: prevalence and risk factors. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2006;128(1-2):54-8.

169. Oluwafunmilola RB, Atinuke OO, Olorunwa FA, Babalola AA, Anthony OO, Olabisi ML, et al. Group B streptococcus colonization and HIV in pregnancy: A cohort study in Nigeria. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*. 2017;10(1):91-7.

170. Gray KJ, Kafulafula G, Matemba M, Kamdolozi M, Membe G, French N. Group B Streptococcus and HIV infection in pregnant women, Malawi, 2008-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(10):1932-5.

171. Cools P, van de Wijgert J, Jespers V, Crucitti T, Sanders EJ, Verstraelen H, et al. Role of HIV exposure and infection in relation to neonatal GBS disease and rectovaginal GBS carriage: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):13820.

172. von Mollendorf C, von Gottberg A, Tempia S, Meiring S, de Gouveia L, Quan V, et al. Increased risk for and mortality from invasive pneumococcal disease in HIV-exposed but uninfected infants aged <1 year in South Africa, 2009-2013. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(9):1346-56.

173. Mussi-Pinhata MM, Freimanis L, Yamamoto AY, Korelitz J, Pinto JA, Cruz ML, et al. Infectious disease morbidity among young HIV-1-exposed but uninfected infants in Latin American and Caribbean countries: the National Institute of Child Health and Human Development International Site Development Initiative Perinatal Study. *Pediatrics*. 2007;119(3):e694-704.
174. World Health Organization. Density of physicians (total number per 1000 population, latest available year) [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2017 [modifié le 4 août 2017; cité le 4 août 2017]. Disponible: http://www.who.int/gho/health_workforce/physicians_density/en/
175. World Health Organization. Use of improved sanitation facilities [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2017 [modifié le 2015; cité le 4 août 2017]. Disponible: http://www.who.int/gho/mdg/environmental_sustainability/sanitation/en/
176. World Health Organization. Care seeking for pneumonia [En ligne]. Suisse: World Health Organization; 2017 [modifié le 2015; cité le 4 août 2017]. Disponible: http://www.who.int/gho/child_health/prevention/pneumonia_text/en/
177. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*. 2015;385(9966):430-40.
178. Le Doare K, Taylor S, Allen L, Gorringer A, Heath PT, Kampmann B, et al. Placental transfer of anti-group B Streptococcus immunoglobulin G antibody subclasses from HIV-infected and uninfected women to their uninfected infants. *AIDS*. 2016;30(3):471-5.
179. Zinkernagel RM. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *The New England journal of medicine*. 2001;345(18):1331-5.
180. Ruperez M, Gonzalez R, Maculve S, Quinto L, Lopez-Varela E, Augusto O, et al. Maternal HIV infection is an important health determinant in non-HIV-infected infants. *AIDS*. 2017;31(11):1545-53.
181. Mofenson LM. Editorial commentary: New challenges in the elimination of pediatric HIV infection: the expanding population of HIV-exposed but uninfected children. *Clinical Infectious Disease*. 2015;60(9):1357-60.
182. Koyanagi A, Humphrey JH, Ntozini R, Nathoo K, Moulton LH, Iliff P, et al. Morbidity among human immunodeficiency virus-exposed but uninfected, human immunodeficiency

virus-infected, and human immunodeficiency virus-unexposed infants in Zimbabwe before availability of highly active antiretroviral therapy. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2011;30(1):45-51.

183. Kuhn L, Kasonde P, Sinkala M, Kankasa C, Semrau K, Scott N, et al. Does severity of HIV disease in HIV-infected mothers affect mortality and morbidity among their uninfected infants? *Clinical Infectious Disease*. 2005;41(11):1654-61.

184. Ghate M, Deshpande S, Tripathy S, Nene M, Gedam P, Godbole S, et al. Incidence of common opportunistic infections in HIV-infected individuals in Pune, India: analysis by stages of immunosuppression represented by CD4 counts. *International Journal of Infectious Diseases*. 2009;13(1):e1-8.

185. Damtie D, Yismaw G, Woldeyohannes D, Anagaw B. Common opportunistic infections and their CD4 cell correlates among HIV-infected patients attending at antiretroviral therapy clinic of Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*. 2013;6:534.

186. Moges NA. Prevalence of Opportunistic Infections and Associated Factors among HIV Positive Patients taking Anti-Retroviral Therapy in DebreMarkos Referral Hospital, Northwest Ethiopia. *Journal of AIDS & Clinical Research*. 2014;05(05).

187. Sugandhi N, Rodrigues J, Kim M, Ahmed S, Amzel A, Tolle M, et al. HIV-exposed infants: rethinking care for a lifelong condition. *AIDS*. 2013;27 Suppl 2:S187-95.

188. Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, Clark DR, Sørensen TU, Dreves A-M, et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood*. 2001;98(2):398-404.

189. Longwe H, Phiri KS, Mbeye NM, Gondwe T, Jambo KC, Mandala WL. Proportions of CD4+, CD8+ and B cell subsets are not affected by exposure to HIV or to Cotrimoxazole prophylaxis in Malawian HIV-uninfected but exposed children. *BMC Immunology*. 2015;16:50.

190. Miyamoto M, Pessoa SD, Ono E, Machado DM, Salomao R, Succi RC, et al. Low CD4+ T-cell levels and B-cell apoptosis in vertically HIV-exposed noninfected children and adolescents. *J Trop Pediatr*. 2010;56(6):427-32.

191. Bundersa M, Thorne C, Newell ML, European Collaborative Study. Maternal and infant factors and lymphocyte, CD4 and CD8 cell counts in uninfected children of HIV-1-infected mothers. *AIDS*. 2005;19(10):1071-9.
192. Abu-Raya B, Kollmann TR, Marchant A, MacGillivray DM. The Immune System of HIV-Exposed Uninfected Infants. *Front Immunol*. 2016;7:383.
193. Kakkar F, Lamarre V, Ducruet T, Boucher M, Valois S, Soudeyns H, et al. Impact of maternal HIV-1 viremia on lymphocyte subsets among HIV-exposed uninfected infants: protective mechanism or immunodeficiency. *BMC Infect Dis*. 2014;14:236.
194. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1808-17.
195. Clerici M, Saresella M, Colombo F, Fossati S, Sala N, Bricalli D, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood*. 2000;96(12):3866-71.
196. Romano MF, Buffolano W, Bisogni R, Russo R, Liuzzi R, Bunders M, et al. Increased CD154 expression in uninfected infants born to HIV-positive mothers exposed to antiretroviral prophylaxis. *Viral immunology*. 2006;19(3):363-72.
197. Bunders MJ, van Hamme JL, Jansen MH, Boer K, Kootstra NA, Kuijpers TW. Fetal exposure to HIV-1 alters chemokine receptor expression by CD4+T cells and increases susceptibility to HIV-1. *Scientific Reports*. 2014;4:6690.
198. Farquhar C, Nduati R, Haigwood N, Sutton W, Mbori-Ngacha D, Richardson B, et al. High maternal HIV-1 viral load during pregnancy is associated with reduced placental transfer of measles IgG antibody. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 2005;40(4):494-7.
199. Scott S, Moss WJ, Cousens S, Beeler JA, Audet SA, Mugala N, et al. The influence of HIV-1 exposure and infection on levels of passively acquired antibodies to measles virus in Zambian infants. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(11):1417-24.
200. Cumberland P, Shulman CE, Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(4):550-7.

201. Simani OE, Izu A, Violari A, Cotton MF, van Niekerk N, Adrian PV, et al. Effect of HIV-1 exposure and antiretroviral treatment strategies in HIV-infected children on immunogenicity of vaccines during infancy. *AIDS*. 2014;28(4):531-41.
202. Jones CE, Naidoo S, De Beer C, Esser M, Kampmann B, Hesselning AC. Maternal HIV Infection and Antibody Responses Against Vaccine-Preventable Diseases in Uninfected Infants. *Journal of American Medical Association*. 2011;305(6):576-84.
203. Reikie BA, Naidoo S, Ruck CE, Slogrove AL, de Beer C, la Grange H, et al. Antibody responses to vaccination among South African HIV-exposed and unexposed uninfected infants during the first 2 years of life. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013;20(1):33-8.
204. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:985646.
205. Dangor Z, Kwatra G, Izu A, Adrian P, van Niekerk N, Cutland CL, et al. HIV-1 Is Associated With Lower Group B Streptococcus Capsular and Surface-Protein IgG Antibody Levels and Reduced Transplacental Antibody Transfer in Pregnant Women. *Journal of Infectious Diseases*. 2015;212(3):453-62.
206. Capolunghi F, Rosado MM, Sinibaldi M, Aranburu A, Carsetti R. Why do we need IgM memory B cells? *Immunology Letters*. 2013;152(2):114-20.
207. Madhi SA, Izu A, Violari A, Cotton MF, Panchia R, Dobbels E, et al. Immunogenicity following the first and second doses of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected and -uninfected infants. *Vaccine*. 2013;31(5):777-83.
208. Abramczuk BM, Mazzola TN, Moreno YM, Zorzeto TQ, Quintilio W, Wolf PS, et al. Impaired humoral response to vaccines among HIV-exposed uninfected infants. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011;18(9):1406-9.
209. Sanz-Ramos M, Manno D, Kapambwe M, Ndumba I, Musonda KG, Bates M, et al. Reduced Poliovirus vaccine neutralising-antibody titres in infants with maternal HIV-exposure. *Vaccine*. 2013;31(16):2042-9.
210. Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 Maintains Tolerance in Anergic B Cells. *Journal of experimental medicine*. 2000;191(5):883-9.

211. Nduati EW, Nkumama IN, Gambo FK, Muema DM, Knight MG, Hassan AS, et al. HIV-Exposed Uninfected Infants Show Robust Memory B-Cell Responses in Spite of a Delayed Accumulation of Memory B Cells: an Observational Study in the First 2 Years of Life. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016;23(7):576-85.
212. Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, Sasaki T, et al. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol*. 2003;4(10):1016-22.
213. Economides A, Schmid I, Anisman-Posner DJ, Plaeger S, Bryson YJ, Uittenbogaart CH. Apoptosis in cord blood T lymphocytes from infants of human immunodeficiency virus-infected mothers. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998;5(2):230-4.
214. Powis KM, Smeaton L, Hughes MD, Tumbare EA, Souda S, Jao J, et al. In-utero triple antiretroviral exposure associated with decreased growth among HIV-exposed uninfected infants in Botswana. *AIDS*. 2016;30(2):211-20.
215. Claudio CC, Patin RV, Palchetti CZ, Machado DM, Succi RC, Oliveira FL. Nutritional status and metabolic disorders in HIV-exposed uninfected prepubertal children. *Nutrition*. 2013;29(7-8):1020-3.
216. Jao J, Kirmse B, Yu C, Qiu Y, Powis K, Nshom E, et al. Lower Preprandial Insulin and Altered Fuel Use in HIV/Antiretroviral-Exposed Infants in Cameroon. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015;100(9):3260-9.
217. Kerr SJ, Puthanakit T, Vibol U, Aурpibul L, Vonthanak S, Kosalaraksa P, et al. Neurodevelopmental outcomes in HIV-exposed-uninfected children versus those not exposed to HIV. *AIDS Care*. 2014;26(11):1327-35.
218. Le Doare K, Bland R, Newell ML. Neurodevelopment in children born to HIV-infected mothers by infection and treatment status. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1326-44.
219. Gouvernement du Québec. Programme québécois d'immunisation [En ligne]. Gouvernement du Québec; 2017 [cité le 9 juillet 2017]. Disponible: <http://sante.gouv.qc.ca/programmes-et-mesures-daide/programme-quebecois-d-immunisation/>
220. Franz B, May KF, Jr., Dranoff G, Wucherpfennig K. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. *Blood*. 2011;118(2):348-57.
221. Leisner C, Loeth N, Lamberth K, Justesen S, Sylvester-Hvid C, Schmidt EG, et al. One-pot, mix-and-read peptide-MHC tetramers. *PLoS One*. 2008;3(2):e1678.

222. Gravel C. Construction du plasmide pET41-BirA. Anomalies immunitaires chez les enfants exposés au VIH mais non infectés. Papyrus: Université de Montréal; 2015. p. 38.
223. Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *European Journal of Immunology*. 2009;39(5):1260-70.
224. R. Ortiz de Montellano P, David Sk, Ator MA, Tew D. Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoporphyrin IX. *Biochemistry*. 1988;27(15):5470-6.
225. Brill AS, Weinryb I. Reactions of Horseradish Peroxidase with Azide. Evidence for a Methionine Residue at the Active Site. *Biochemistry*. 1967;6(11):3528-35.
226. Richardson TC, Chapman DV, Heyderman E. Immunoperoxidase techniques: the deleterious effect of sodium azide on the activity of peroxidase conjugates. *Journal of Clinical Pathology*. 1983;36(4):411-4.
227. Scholzen A, Nahrendorf W, Langhorne J, Sauerwein RW. Expansion of IgG+ B-cells during mitogen stimulation for memory B-cell ELISpot analysis is influenced by size and composition of the B-cell pool. *PLoS One*. 2014;9(7):e102885.
228. Z. Moodie, L. Price, C. Gouttefangeas, A. Mander, S. Janetzki, M. Löwer, et al. Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010;59(10):1489-501.
229. BioLegend. Tandem Dyes [En ligne]. États-Unis: Biolegend; 2017 [modifié le août 2017; cité le 28 août 2017].
230. Gouvernement du Québec. Tétanos [En ligne]. Canada: Gouvernement du Québec; 2017 [modifié le 25 juillet 2017; cité le 14 août 2017]. Disponible: <http://sante.gouv.qc.ca/problemes-de-sante/tetanos/>
231. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105(4):1614-21.
232. Moody MA, Haynes BF. Antigen-specific B cell detection reagents: use and quality control. *Cytometry A*. 2008;73(11):1086-92.

233. Taylor JJ, Martinez RJ, Titcombe PJ, Barsness LO, Thomas SR, Zhang N, et al. Deletion and anergy of polyclonal B cells specific for ubiquitous membrane-bound self-antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(11):2065-77.
234. David FJE, Autran B, Tran HC, Menu E, Raphael M, Debre P, et al. Human trophoblast cells express CD4 and are permissive for productive infection with HIV-1. *Clinical & Experimental Immunology*. 1992;88(1):10-6.
235. Tavian M, Peault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *International Journal of Developmental Biology*. 2005;49(2-3):243-50.
236. Clapp DW. Developmental regulation of the immune system. *Seminars in Perinatology*. 2006;30(2):69-72.
237. Zasada M, Kwinta P, Durlak W, Bik-Multanowski M, Madetko-Talowska A, Pietrzyk JJ. Development and maturation of the immune system in preterm neonates: results from a whole genome expression study. *Biomed Research International*. 2014;2014:498318.
238. Schwartz D, Sungkarat S, Shaffer N, Laosakkitiboran J, Supapol W, Charoenpanich P, et al. Placental abnormalities associated with human immunodeficiency virus type 1 infection and perinatal transmission in Bangkok, Thailand. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;182(6):1652-7.
239. Ocheke AN, Agaba PA, Imade GE, Silas OA, Ajetunmobi OI, Echejoh G, et al. Chorioamnionitis in pregnancy: a comparative study of HIV-positive and HIV-negative parturients. *International Journal of STD & AIDS*. 2016;27(4):296-304.
240. Mestan K, Yu Y, Thorsen P, Skogstrand K, Matoba N, Liu X, et al. Cord blood biomarkers of the fetal inflammatory response. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2009;22(5):379-87.
241. GOTSCH F, ROMERO R, KUSANOVIC JP, MAZAKI-TOVI S, PINELES BL, EREZ O, et al. The Fetal Inflammatory Response Syndrome. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2007;50(3):652-83.
242. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. 2006;8(Suppl 2):S3.
243. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.

244. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annual Review of Medicine*. 2011;62:141-55.
245. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*. 2009;114(25):5173-81.
246. Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood*. 2001;97(6):1817-22.
247. Prendergast AJ, Chasekwa B, Rukobo S, Govha M, Mutasa K, Ntozini R, et al. Intestinal Damage and Inflammatory Biomarkers in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Exposed and HIV-Infected Zimbabwean Infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;216(6):651-61.
248. Miyamoto M, Gouvea A, Ono E, Succi RCM, Pahwa S, Moraes-Pinto MI. Immune development in HIV-exposed uninfected children born to HIV-infected women. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2017;59:e30.
249. Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, Blom B, Spits H. IL-6 triggers IL-21 production by human CD4⁺ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. *Immunology & Cell Biology*. 2012;90(8):802-11.
250. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;175(12):7867-79.
251. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(8):1797-805.
252. Buckner CM, Moir S, Ho J, Wang W, Posada JG, Kardava L, et al. Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *Journal of Virology*. 2013;87(10):5800-11.
253. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;162(2):271-9.

254. Piatosa B, Wolska-Kusnierz B, Pac M, Siewiera K, Galkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*. 2010;78(6):372-81.
255. Duchamp M, Sterlin D, Diabate A, Uring-Lambert B, Guerin-El Khourouj V, Le Mauff B, et al. B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2014;2(3):131-40.
256. Jelcic K, Cimbro R, Nawaz F, Huang da W, Zheng X, Yang J, et al. The HIV-1 envelope protein gp120 impairs B cell proliferation by inducing TGF-beta1 production and FcRL4 expression. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1256-65.
257. Kardava L, Moir S, Wang W, Ho J, Buckner CM, Posada JG, et al. Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2614-24.
258. Sciaranghella G, Tong N, Mahan AE, Suscovich TJ, Alter G. Decoupling activation and exhaustion of B cells in spontaneous controllers of HIV infection. *AIDS*. 2013;27(2):175-80.
259. Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, et al. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10362-7.
260. Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, Miller NJ, et al. Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *Journal of Experimental Medicine*. 2004;200(5):587-99.
261. Muema DM, Macharia GN, Hassan AS, Mwaringa SM, Fegan GW, Berkley JA, et al. Control of Viremia Enables Acquisition of Resting Memory B Cells with Age and Normalization of Activated B Cell Phenotypes in HIV-Infected Children. *J Immunol*. 2015.
262. Cain D, Kondo M, Chen H, Kelsoe G. Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *Journal of Investivestigative Dermatology*. 2009;129(2):266-77.
263. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, et al. Toll-Like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity*. 2006;24(6):801-12.

264. De Milito A, Mörch C, Sönnnerborg A, Chiodi F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS*. 2001;15(8):957-64.
265. Hart M, Steel A, Clark SA, Moyle G, Nelson M, Henderson DC, et al. Loss of Discrete Memory B Cell Subsets Is Associated with Impaired Immunization Responses in HIV-1 Infection and May Be a Risk Factor for Invasive Pneumococcal Disease. *The Journal of Immunology*. 2007;178(12):8212-20.
266. Jacobsen MC, Thiebaut R, Fisher C, Sefe D, Clapson M, Klein N, et al. Pediatric human immunodeficiency virus infection and circulating IgD⁺ memory B cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2008;198(4):481-5.
267. D'Orsogna LJ, Krueger RG, McKinnon EJ, French MA. Circulating memory B-cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antiretroviral therapy. *AIDS*. 2007;21(13):1747-52.
268. Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4⁺ T cells. *FEBS Letters*. 1996;393(1):93-6.
269. Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A, Cerutti A. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol*. 2006;7(3):302-10.
270. Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(9):706-13.
271. Xu W, Santini PA, Sullivan JS, He B, Shan M, Ball SC, et al. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol*. 2009;10(9):1008-17.
272. Singh P, Agnihotri SK, Tewari MC, Kumar S, Sachdev M, Tripathi RK. HIV-1 Nef breaches placental barrier in rat model. *PLoS One*. 2012;7(12):e51518.
273. Pensieroso S, Galli L, Nozza S, Ruffin N, Castagna A, Tambussi G, et al. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *AIDS*. 2013;27(8):1209-17.
274. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, et al. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*. 2010;116(25):5571-9.

275. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(12):2739-53.
276. Velilla PA, Montoya CJ, Hoyos A, Moreno ME, Chougnet C, Rugeles MT. Effect of intrauterine HIV-1 exposure on the frequency and function of uninfected newborns' dendritic cells. *Clinical Immunology*. 2008;126(3):243-50.
277. Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Current opinion in immunology*. 2005;17(3):282-9.
278. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(1):67-80.
279. Scheeren FA, Nagasawa M, Weijer K, Cupedo T, Kirberg J, Legrand N, et al. T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(9):2033-42.
280. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(1):34-46.
281. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1285:97-114.
282. Griffin DO, Rothstein TL. Human b1 cell frequency: isolation and analysis of human b1 cells. *Front Immunol*. 2012;3:122.
283. Gill 3rd TJ, Repetti CF, Metlay LA, Rabin BS, Taylor FH, Thompson DS, et al. Transplacental Immunization of the Human Fetus to Tetanus by Immunization of the Mother. *Journal of Clinical Investigation*. 1983;72(3):987-96.
284. Väkeväinen M, Eklund C, Eskola J, Käyhty H. Cross-Reactivity of Antibodies to Type 6B and 6A Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, Evoked by Pneumococcal Conjugate Vaccines, in Infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;184(6):789-93.
285. Dolimbek BZ, Jankovic J, Atassi Mz. Cross reaction of tetanus and botulinum neurotoxins A and B and the boosting effect of botulinum neurotoxins A and B on a primary anti-tetanus antibody response. *Immunological Investigations*. 2002;31(3-4):247-62.
286. GraphPad Software. Key concepts: multiple comparisons [En ligne]. États-Unis: GraphPad Software; 2017 [modifié le 2007; cité le 11 décembre 2017]. Disponible:

https://www.graphpad.com/guides/prism/5/user-guide/prism5help.html?stat_howto_1wayanova.htm

287. Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Medical Research Methodology*. 2002;2:8.
288. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(3):191-200.
289. Hasan M, Beitz B, Rouilly V, Libri V, Urrutia A, Duffy D, et al. Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clinical Immunology*. 2015;157(2):261-76.
290. Hayakawa K, Ishii R, Yamasaki K, Kishimoto T, Hardy RR. Isolation of high-affinity memory B cells: phycoerythrin as a probe for antigen-binding cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(5):1379-83.
291. Weiss GE, Ndungu FM, McKittrick N, Li S, Kimani D, Crompton PD, et al. High efficiency human memory B cell assay and its application to studying *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in natural infections. *Journal of Immunological Methods*. 2012;375(1-2):68-74.
292. Townsend SE, Goodnow C, Cornall RJ. Single epitope multiple staining to detect ultralow frequency B cells. *Journal of Immunology Methods*. 2001;249(1-2):137-46.
293. Hedley BD, Keeney M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013;35(3):344-50.
294. Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *Journal of Oncology*. 2010;2010:426218.
295. Cheynier R, Langlade-Demoyen P, Marescot M-R, Blanche S, Blondin G, Wain-Hobson S, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1 infected mothers. *European Journal of Immunology*. 1992;22(9):2211-7.
296. Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, Gotch F, Ariyoshi K, Hallam N, et al. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet*. 1993;341(8849):860-1.

297. De Maria A, Cirillo C, Moreta L. Occurrence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T cell activity in apparently uninfected children born to HIV-1-infected mothers. *Journal of Infectious Diseases*. 1994;170(5):1296-9.
298. Moussa S, Jenabian MA, Gody JC, Leal J, Gresenguet G, Le Faou A, et al. Adaptive HIV-specific B cell-derived humoral immune defenses of the intestinal mucosa in children exposed to HIV via breast-feeding. *PLoS One*. 2013;8(5):e63408.
299. Kelow J, Hobusch G, Gross W. Predominance of the IgG1 subclass in the hypergammaglobulinemia observed in pre-AIDS and AIDS. *Cancer detection and prevention*. 1988;12(1-6):211-6.
300. Lane H, Masur H, Edgar L, Whalen G, Rook A, Fauci A. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England journal of medicine*. 1983;309(8):453-8.
301. Shearer WT, Easley KA, Goldfarb J, Rosenblatt HM, Jenson HB, Kovacs A, et al. Prospective 5-year study of peripheral blood CD4+, CD8+, and CD19+/CD20+ lymphocytes and serum Igs in children born to HIV-1+ women. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;106(3):559-66.
302. De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M, et al. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood*. 2004;103(6):2180-6.
303. Malaspina A, Moir S, Kottlil S, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, et al. Deleterious Effect of HIV-1 Plasma Viremia on B Cell Costimulatory Function. *The Journal of Immunology*. 2003;170(12):5965-72.
304. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(4):235-45.
305. Doria-Rose NA, Klein RM, Manion MM, O'Dell S, Phogat A, Chakrabarti B, et al. Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *Journal of Virology*. 2009;83(1):188-99.
306. Mohanram V, Demberg T, Tuero I, Vargas-Inchaustegui D, Pavlakis GN, Felber BK, et al. Improved flow-based method for HIV/SIV envelope-specific memory B-cell evaluation in rhesus macaques. *Journal of Immunological Methods*. 2014;412:78-84.

307. Iyengar S, Schwartz DH, Hildreth JEK. T Cell-Tropic HIV gp120 Mediates CD4 and CD8 Cell Chemotaxis through CXCR4 Independent of CD4: Implications for HIV Pathogenesis. *The Journal of Immunology*. 1999;162(10):6263-7.

Annexe I : Mise au point détection de lymphocytes B spécifiques à la gp120 par cytométrie en flux

L'antigène utilisé pour détecter les cellules B spécifiques au VIH était la gp120 gracieusement fournie par l'équipe du Dr Andrés Finzi (Centre de recherche du CHUM, Montréal, QC). Cette gp120 de 80 kDa a comme particularité d'avoir les régions V1, V2, V3 et V5 tronquées et remplacées par des séquences de glycine et de sérine et de favoriser la détection des anticorps reconnaissant sa forme liée au CD4.

Avec cet antigène en mains, il a d'abord été nécessaire de le biotinyler afin que le même principe expérimental d'oligomérisation et de marquage utilisé avec le TTCF puisse être appliqué. Pour ce faire, la trousse de réaction biotine-protéine ligase Bir-A (Avidity, Aurora, CO) a été employée. Toutefois, lors des tests d'oligomérisation, il était impossible d'obtenir autre chose que des dimères. Il a été supposé que le phénomène était dû à de l'encombrement stérique. De ce fait, l'idée de produire des oligomères a été mise de côté et le marquage avec la gp120 s'est plutôt effectué en exposant les cellules aux monomères biotinylés pendant 30 min avant de faire des lavages pour éliminer toute gp120 non liée et d'ajouter la streptavidine couplée à PE pour une autre incubation de 30 min. En attendant une titration plus raffinée, 50 ng de monomères de gp120 étaient ajoutés par million de cellules, comme il a été suggéré par Dr Finzi.

Ensuite, pour restreindre le bruit de fond et la perte des oligomères de gp120 due à leur liaison avec le CD4 lors des marquages, un enrichissement par sélection négative des lymphocytes B a été employé. Lors de l'optimisation, nous avons comparé l'efficacité d'isolation des trousse EasySep (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC), MagniSort 2^e génération (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) et Macs Miltenyi 2^e génération (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). Bien que certaines arrivaient à atteindre une purification au-delà de 95 %, aucune ne permettait une récupération assez importante des cellules B pour que le protocole soit adopté auprès des échantillons des enfants ENI.

Similairement à d'autres équipes travaillant sur la détection des cellules B spécifiques pour le VIH, nous avons opté pour l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction de la protéine virale avec le CD4^{305, 306}. L'anticorps monoclonal anti-CD4 humain Sim.4, qui a été obtenu par le biais de la Division AIDS, NIAIDS, NIH du programme NIH AIDS Reagent et qui a été rendu disponible par le Dr James Hildreth, a été sélectionné. Cet anticorps se lie au même épitope que l'anticorps Leu3, soit un épitope impliqué dans la liaison de la gp120 au récepteur CD4³⁰⁷. Pour valider sa capacité à restreindre les interactions entre les oligomères de gp120 et le CD4, l'anticorps SIM.4 a été titré sur des cellules CEMNKr qui sont une lignée T-lymphoblastoïde humain. Il a été possible de déterminer qu'une utilisation de l'anticorps Sim.4 à un ratio de 1 :3 permettait d'inhiber adéquatement la liaison de la gp120 au récepteur CD4. Malheureusement, lorsque les expériences ont été répliquées sur les PBMC, les problèmes de découplage des anticorps anti-CD20 humain APC-H7 et anti-CD21 humain PE-Cy7 n'ont pas permis d'obtenir des résultats adéquats pour continuer l'optimisation.

Si les expériences venaient à reprendre sur les échantillons des enfants ENI de la cohorte, il serait intéressant de valider la titration de l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain Sim.4, d'établir la courbe de titration relative à la concentration de la gp120 à utiliser d'examiner la spécificité du marquage sur des sujets non exposés au VIH et de déterminer la fréquence normale des lymphocytes B spécifiques contre la gp120 chez des individus non exposés. De plus, Dr Finzi nous avait fourni des anticorps anti-gp120 non conjugués qui auraient permis de mettre au point un double marquage comme il a été discuté précédemment.