

Université de Montréal

**Anomalies immunitaires chez les enfants  
exposés au VIH mais non infectés**

par

Catherine GRAVEL

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Décembre 2015

© Catherine Gravel, 2015

## Résumé

La thérapie antirétrovirale prévient la transmission mère-enfant du VIH dans plus de 98% des cas lorsqu'administrée pendant la grossesse, le travail et au nouveau-né. L'accessibilité à la thérapie antirétrovirale dans près de 70% des 1,5 millions cas de grossesses VIH+ dans le monde mène à la naissance de plus d'un million d'enfants exposés non infectés chaque année. Le nombre d'enfants exposés non infectés est à la hausse ainsi que les préoccupations concernant leur santé. En effet, plusieurs groupes ont signalé une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez les enfants exposés non infectés. L'analyse des données rétrospectives de 705 enfants exposés non infectés de la cohorte mère-enfant du CMIS a révélé qu'à 2 mois d'âge, les enfants nés de mères ayant une charge virale supérieure à 1,000 copies d'ARN / ml avaient une fréquence de lymphocytes B significativement plus élevés par rapport aux enfants exposés non infectés nés de mères ayant une charge virale indétectable. L'objectif de cette étude est de caractériser ces anomalies.

Les lymphocytes, provenant du sang de cordon ombilical et de sang veineux obtenu à 6 et 12 mois d'âge, ont été phénotypés par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs CD3 / CD10 / CD14 / CD16 / CD19 / CD20 / CD21 / CD27 / IgM pour les lymphocytes B et CD4 / CD8 / CD3 / CCR7 / CD45RA pour les lymphocytes T. De plus, afin d'étudier les capacités fonctionnelles des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>, la réponse antigène-spécifique au vaccin antitétanique a été mesurée par marquage avec des tétramères fluorescents de fragment C du toxoïde tétanique.

Nos travaux ont mis en évidence des différences statistiquement significatives entre les enfants exposés non-infectés (ENI) nés de mères avec une charge virale détectable comparativement à ceux nés de mères avec une charge virale indétectable. À la naissance, les enfants ENI nés de mères avec une charge virale détectable avaient significativement moins de lymphocytes B totaux, plus de lymphocytes B mémoires classiques, activés, plasmablastes et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires centrales. À 6 mois, ils avaient significativement plus de lymphocytes B naïfs et significativement moins de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires. À 12 mois d'âge, ils avaient significativement plus de lymphocytes B et T CD8<sup>+</sup> totaux; significativement moins de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux et leurs lymphocytes T affichaient un

profil significativement plus activé (plus de cellules mémoires). L'analyse de la réponse antigène-spécifique a révélé une fréquence plus élevée de lymphocytes B mémoires IgM<sup>+</sup> suggérant que les enfants nés de mères avec une virémie détectable ont plus de mal à établir une mémoire immunitaire efficace face au vaccin antitétanique.

Nos données suggèrent qu'il y a exposition durant le premier trimestre de grossesse à la virémie maternelle et que cette exposition impacte le système immunitaire en développement du fœtus. Les mécanismes sous-jacents causant ces anomalies doivent encore être élucidés et l'épuisement du compartiment T à la naissance et à 6 mois reste à être investigué. Dans un pays industrialisé où l'accès aux soins est facilité, ces anomalies ont des conséquences modérées mais dans des pays à faible et moyen revenu, les conséquences peuvent être beaucoup plus tragiques voir fatales.

**Mots-clés** : VIH, enfants ENI, anomalies immunitaires, CD4, CD8, CD19

## **Abstract**

Antiretroviral therapy prevents mother to child transmission of HIV in 98% of cases when administered during pregnancy, labor and to the newborn. The availability of antiretroviral therapy for nearly 70% of the 1.5 million HIV<sup>+</sup> pregnancies in the world leads to the birth of more than one million HIV-exposed uninfected children yearly. The number of HIV-exposed uninfected children is on the rise along with concerns about their health. Indeed, several groups reported an increase in morbidity and mortality in HIV-exposed uninfected children. Preliminary analysis of retrospective data of 705 HIV-exposed uninfected children from the Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) Mother-Child Cohort (CHU Sainte-Justine) revealed that at 2 months of age, children born to mothers with viral load greater than 1,000 RNA copies / ml had a significantly higher frequency of B cells compared to HIV-exposed uninfected children born to mothers with an undetectable viral load. The objective of this study is to characterize these anomalies.

Lymphocytes from the umbilical cord blood and venous blood obtained at 6 and 12 months of age, were phenotyped by flow cytometry using markers CD3 / CD10 / CD14 / CD16 / CD19 / CD20 / CD21 / CD27 / IgM for B cells and CD4 / CD8 / CD3 / CCR7 / CD45RA for T cells. Moreover, to study the functional capabilities of CD19<sup>+</sup> B-cell, antigen-specific response to the tetanus vaccine was measured by flow cytometry with fluorescent tetramers of tetanus toxoid C fragment.

Our work has demonstrated statistically significant differences between ENI born to mothers with detectable viral load compared with those born to mothers with an undetectable viral load. At birth, they had significantly fewer total B cells, more classical memory B cells, activated memory B cells, plasmablasts and central memory CD8<sup>+</sup> T cells. At 6 months of age, they had significantly more naive B cells and significantly fewer effector memory CD8<sup>+</sup> T cells. At 12 months of age, they had significantly more total B cell and CD8<sup>+</sup> T cells, fewer total CD4<sup>+</sup> T cells and those T cells showed an activated profile (more memory cells). The analysis of antigen-specific response revealed a higher frequency of IgM<sup>+</sup> memory B cells

suggesting that children born to mothers with detectable viremia have a harder time establishing an effective immune memory against the tetanus vaccine.

Our data suggest that there is exposure during the first trimester of pregnancy to maternal viremia and that this exposure affects the developing immune system of the foetus. The underlying mechanisms causing these abnormalities have yet to be elucidated and exhaustion of the T compartment at birth and six months remains to be investigated. In industrialized countries where access to care is facilitated, these anomalies have moderate consequences, but in low- and middle-income countries, the consequences can be much more tragic.

**Keywords** : HIV, HEU children, immunological anomalies, CD4, CD8, CD19

# Table des matières

Abstract .....	iv
Table des matières .....	vi
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements .....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
Le système immunitaire adaptatif .....	1
Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	1
Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	3
L'activation et différenciation des lymphocytes T mémoires .....	3
Les lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> .....	6
Le virus de l'immunodéficience humaine .....	11
Brève description du virus .....	11
Brève description de l'infection .....	11
L'effet du VIH sur les lymphocytes.....	14
Le VIH et la grossesse.....	16
La transmission verticale du VIH .....	16
La santé des enfants exposés non infectés .....	18
Hypothèses et objectifs.....	22
Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....	23
Sujet à l'étude.....	23
Vaccination des enfants.....	23
Traitement des échantillons.....	26
Production d'oligomères de toxoïde tétanique .....	26
Construction du vecteur pET41-BirA .....	26
Clonage et purification des vecteurs pET15a-TTCF et pET41-BirA.....	27
Production de TTCF.....	27
Essai d'oligomérisation.....	29
Analyses par cytométrie en flux .....	29
Décongélation des CMSP .....	29
Marquage des CMSP .....	30

Marquage avec le TTCF.....	30
Phénotypage des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	30
Analyse des données .....	33
Chapitre 3 : Résultats.....	34
Production d'oligomères de TTCF .....	34
Analyses par cytométrie en flux .....	42
Analyse phénotypique des lymphocytes T.....	42
Analyses phénotypiques des lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> .....	48
Analyses de la réponse antigène-spécifique.....	53
Chapitre 4 : Discussion .....	58
Analyse des populations lymphocytaires chez les ENI.....	58
Analyse de la réponse antigène-spécifique.....	61
Avenues futures.....	66
Limitations de l'étude.....	67
Chapitre 5 : Conclusion .....	71
Bibliographie .....	i
Communications.....	x
Annexe 1 : Compilation des données.....	xi

## Liste des tableaux

Tableau. 1 : Caractéristiques cliniques et sociodémographiques maternelles et des nouveau-nés. ....	24
Tableau. 2 : Spécification des complexes anticorps-fluorochromes utilisés pour le phénotypage des lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> et l'analyse de la réponse TTCF-spécifique.....	31
Tableau 3 : Spécification des complexes anticorps-fluorochromes utilisés pour le phénotypage des lymphocytes T. ....	32
Tableau 4 : Phénotypes des sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et lymphocytes T CD8 <sup>++</sup> selon les marqueurs CD45RA et CCR7. ....	43
Tableau 5 : Phénotypes des sous-populations de lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> selon les marqueurs CD10, CD27, CD20 et CD21.....	49
Tableau 6 : Phénotypes des sous-populations de lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> TTCF spécifiques selon l'expression de l'immunoglobuline M (IgM). ....	54
Tableau 7 : Fréquences non-stratifiées des sous-populations lymphocytaires présentes chez les ENI à la naissance et à 6 et 12 mois d'âge. ....	xi
Tableau 8 : Fréquences des sous-populations lymphocytaires chez les ENI à la naissance, 6 et 12 mois, stratifiées selon la charge virale maternelle. ....	xii

## Liste des figures

<b>Fig. 1</b> : Différenciation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	2
<b>Fig. 2</b> : Modèles de différenciation des lymphocytes T mémoires.....	5
<b>Fig. 3</b> : Structure des différentes immunoglobulines.....	7
<b>Fig. 4</b> : Le développement des lymphocytes B.....	10
<b>Fig. 5</b> : Cycle de réplication du VIH et cibles thérapeutiques des antirétroviraux.....	13
<b>Fig. 6</b> : Apparition de 3 nouvelles sous-populations de lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> chez les PVVIH.....	15
<b>Fig. 7</b> : Nombre de grossesses VIH+ dans les pays à faible et moyen revenu et pourcentage d'entre elles recevant un traitement ARV entre 2005 et 2013.....	17
<b>Fig. 8</b> : Programme de vaccination infantile du Québec <sup>145</sup> .....	25
<b>Fig. 9</b> : Schéma de la structure des neurotoxines clostridiennes .....	35
<b>Fig. 10</b> : Construction du plasmide pET41-BirA.....	38
<b>Fig. 11</b> : Électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplification par PCR de BirA et de la digestion du plasmide pET41 (a)+.....	39
<b>Fig. 12</b> : Optimisation initiale de l'induction du TTCF.....	39
<b>Fig. 13</b> : Optimisation de l'induction du TTCF et de la biotine ligase BirA.....	40
<b>Fig. 14</b> : SDS-PAGE contrôlant la purification du TTCF par chromatographie sur colonne d'affinité NiNTA.....	41
<b>Fig. 15</b> : Essai de biotinylation par retard sur gel.....	41
<b>Fig. 16</b> : Stratégie de sélection des sous-populations de lymphocytes T.....	44
<b>Fig. 17</b> : Contrôle FMO « fluorescent minus one » du marquage des lymphocytes T.....	45
<b>Fig. 18</b> : Fréquences des sous-populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.....	47
<b>Fig. 19</b> : Stratégie de sélection pour le phénotypage des populations de lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> .....	50
<b>Fig. 20</b> : Contrôles FMO du marquage des lymphocytes B.....	51
<b>Fig. 21</b> : Fréquences des sous-populations de lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.....	52
<b>Fig. 22</b> : Stratégies de sélection des lymphocytes B CD19 <sup>+</sup> TTCF-spécifiques et contrôle de la spécificité des oligomères de TTCF.....	55
<b>Fig. 23</b> : Fréquences des lymphocytes B TTCF spécifiques T dépendant chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.....	56
<b>Fig. 24</b> : Fréquences des lymphocytes B TTCF spécifiques T indépendant chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.....	57
<b>Fig. 25</b> : Schéma synthétique des observations faites dans le cadre du présent mémoire, de leurs implications potentielles et des pistes à suivre.....	70

## Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF700 : Alexa Fluor 700

APC : Allophycocuanine

APC-H7 : Fluorochrome composé d'allophycocyanine et de 7 cyanines

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARV : Antirétroviraux

BCG : Bacille de Calmette-Guérin

BCR : Récepteur de cellule B

BirA : Biotine ligase

BV421 : Fluorochrome Brilliant Violet 421

CD : Cluster de différenciation

CD19 : Lymphocyte B CD19<sup>+</sup>

CD4 : Lymphocyte T auxiliaire CD4<sup>+</sup>

CD8 : Lymphocyte T cytotoxique CD8<sup>+</sup>

CMH-I / II : Complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou II

CMIS : Centre maternel et infantile sur le SIDA

CMSP : cellules mononucléées du sang périphérique

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CPD : Anticoagulant citrate phosphate dextrose

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTwP-HibCV/HBV : Diphtérie, coqueluche, tétanos, *Haemophilus influenzae*, hépatite B

EDTA : Anticoagulant acide éthylène diamine tétra acétique

ENI : Exposé non infecté

FITC : Fluorescéine

FMO : Fluorochrome minus one

GST : Glutathion S-transférase

Ig : Immunoglobuline

II : Inhibiteur d'intégrase

IL : Interleukine

INF : Interféron

INNTI : Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse

INTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse  
IP : Inhibiteur de protéase  
IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
LB : Bouillon Luria-Bertani  
NE : Non exposé  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes  
PBS : Tampon phosphate salin  
PCR : Réaction en chaîne par polymérase  
PE : Fluorochrome R-Phycoérythrine  
PE-Cy7 : Fluorochrome composé de R-Phycoérythrine et Cy7  
PerCp : Fluorochrome Périidine-Chlorophylle-protéine  
PVVIH : Personne vivant avec le VIH  
R10 : RPMI – 10 % SVF additionné de gentamicine  
RPMI : Milieu Roswell Park Memorial Institute  
RRO : Rougeole, rubéole, oreillon  
SA : Streptavidine  
SA-PE : Streptavidine couplée à un fluorochrome R-Phycoérythrine  
SCO : Sang de cordon ombilical  
SDS-page : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium  
SEB : Entérotoxine staphylococcal B  
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise  
SVF : Sérum de veau foetal  
T1 : Lymphocytes B CD19<sup>+</sup> immature T1  
T2 : Lymphocytes B CD19<sup>+</sup> immature T2  
TCR : Récepteur de cellules T  
TH1 : Lymphocytes T auxiliaire CD4<sup>+</sup> de type 1  
TH2 : Lymphocytes T auxiliaire CD4<sup>+</sup> de type 2  
TME : Transmission mère-enfant  
TNF : Facteur de nécrose tumorale  
TTCF : Fragment C terminal du toxoïde tétanique  
V450 : Fluorochrome Horizon V450  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

*À mes parents Nicole et Jean-Yves, mon conjoint Samy  
et mon directeur Dr Soudeyns,  
sans vous rien n'aurait été possible.*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier toutes les participantes et leurs familles, votre contribution est la base qui permet de faire avancer la science. Merci!

Merci à tous les membres du laboratoire d'immunopathologie virale du CHU Sainte-Justine pour leur support : Dr Hugo Soudeyns; Insaf Salem Fourati; Dre Armelle Le Campion; Dre Doris Ransy; Laurence Raymond-Marchand; Kimberly Ann Milton McSween; Ariane Larouche; Martine Caty

Merci à toute l'équipe du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) du CHU Sainte-Justine pour leur travail et leur soutien : Silvie Valois; Dr Marc Boucher; Dre Isabelle Boucoiran; Dre Fatima Kakkar; Dr Normand Lapointe

Merci au « *CIHR team in Cellular Aging and HIV Comorbidities in Women and Children* » (CARMA) pour le financement de ce projet; ainsi qu'au Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S) pour l'octroi de ma bourse de formation à la maîtrise, à l'Université de Montréal et au CHU Sainte-Justine

Un dernier merci à tous les autres collaborateurs ayant permis de faire avancer ce projet en me donnant soit un peu de leur temps et de leurs connaissances ou accès à leur installation : Dr Étienne Gagnon (IRIC, Montréal); Dr Kai Wucherpfenning (Dana Farber Cancer Institute, Boston); Dre Françoise LeDeist (CHU Sainte-Justine, Montréal) et Dr Andres Finzi (CR-CHUM, Montréal)

# Chapitre 1 : Introduction

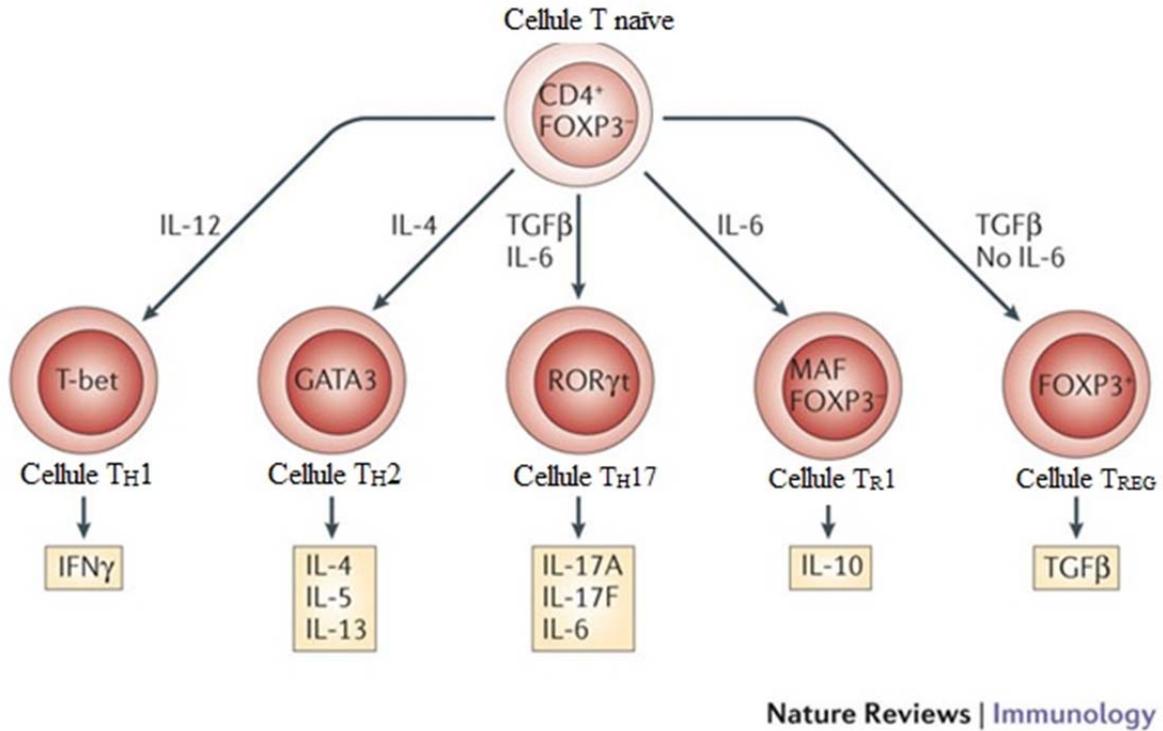
## Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire peut être divisé en deux composantes : l'immunité innée, première ligne de défense moins spécifique et l'immunité adaptative, très spécifique et générant une mémoire immunologique diversifiée. Les principaux acteurs de l'immunité innée sont les monocytes, les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles; alors que les principaux acteurs de l'immunité adaptative sont les lymphocytes. Ces derniers se divisent en deux populations principales, soit les lymphocytes B et les lymphocytes T, qui se subdivisent en T auxiliaires et en T cytotoxiques.

## Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou lymphocytes auxiliaires sont caractérisés par l'expression des glycoprotéines membranaires CD4 et CD3. Lorsqu'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> reconnaît le « non-soi » présenté par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) ses CD4 s'associent avec ses récepteurs de cellules T (TCR) pour former le « complexe TCR »; en présence du signal de costimulation, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> s'activent. Les CPA présentent leurs antigènes (petits peptides de 15 – 25 acides aminés) aux CD4 via le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) présent à la surface des cellules dendritiques (constitutif), des macrophages et des lymphocytes B.

L'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mène à leur prolifération et à leur différenciation en différents sous-types (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, etc.) selon les cytokines présentes dans l'environnement (Fig. 1) <sup>1-3</sup>. Entre autres, l'IL-12 mène aux T<sub>H1</sub> alors que l'IL-4 mène aux T<sub>H2</sub>. Les T<sub>H1</sub> sont impliqués dans la réponse à médiation cellulaire contre les bactéries et autres organismes intracellulaires. Ils sécrètent de l'IFN $\gamma$  qui peut stimuler les macrophages et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T<sub>H2</sub> sont impliqués dans la réponse humorale contre les parasites extracellulaires. Ils produisent principalement de l'IL-4, qui stimule la commutation de classe des immunoglobulines des lymphocytes B, et de l'IL-5, qui recrute les éosinophiles contre les parasites extracellulaires.



**Fig. 1** : Différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se différencient en réponse aux cytokines présentes dans l'environnement. L'IL-12 médie la différenciation en T<sub>H</sub>1, l'IL-4 médie la différenciation en T<sub>H</sub>2, le TGF $\beta$  et l'IL-6 médient la différenciation en T<sub>H</sub>17 alors que l'IL-6 ou le TGF $\beta$  seul médient la différenciation en T<sub>R</sub>1 et T<sub>REG</sub>, respectivement. Traduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Immunology<sup>3</sup>, copyright 2002 (licence : 3745690511522)

## **Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

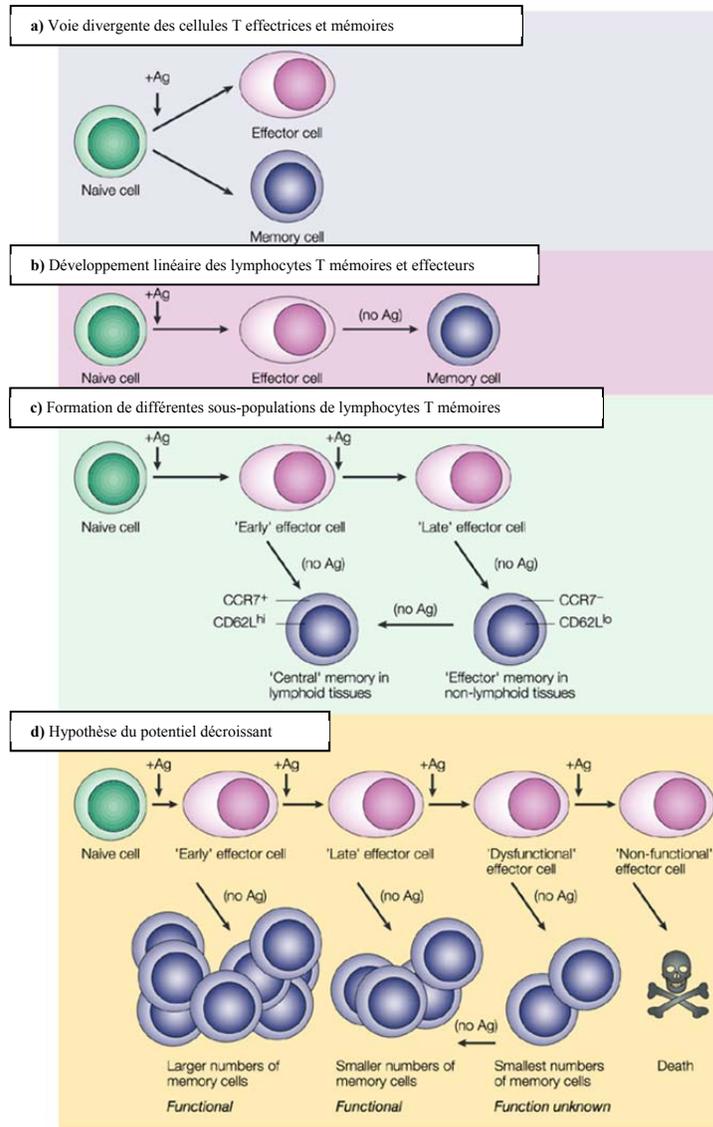
Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou lymphocytes cytotoxiques sont, à l'instar des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, caractérisés par leur complexe TCR qui reconnaît le « non-soi » présenté par des CPA. Par contre, la glycoprotéine membranaire CD4 est remplacée par la glycoprotéine membranaire CD8 et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissent leur antigène (petits peptides de 8 – 10 acides aminés) lorsque celui-ci est présenté par un CMH de classe I (CMH-I) présent de façon quasi-ubiquitaire à la surface de toutes cellules nucléées sauf les cellules germinales. Une fois activé, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> subissent une expansion clonale sous l'effet de l'IL-2, ce qui permet d'augmenter le nombre de cellules spécifique à l'antigène. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont des cellules effectrices qui ciblent et éliminent des cellules tumorales ou infectées par un virus en sécrétant des cytotoxines comme la perforine et les granzymes <sup>4</sup>. Les perforines perforent la membrane cytoplasmique des cellules-cibles afin de permettre l'entrée dans le cytoplasme des granzymes, qui activent la cascade des caspases qui mène à l'apoptose de la cellule-cible.

## **L'activation et différenciation des lymphocytes T mémoires**

L'activation des cellules T est un processus qui nécessite plusieurs signaux. Tout d'abord, comme mentionné plus tôt, le TCR des lymphocytes T naïfs ou mémoires doit reconnaître son peptide antigénique présenté par les CMH <sup>5-7</sup>. Le peptide antigénique provient de la capture et de la dégradation de l'antigène par les CPA. La recombinaison somatique, aussi appelée recombinaison V(D)J, qui a lieu dans le thymus lors de la maturation des lymphocytes T, donne lieu à une diversification des TCR qui permet la reconnaissance d'un large spectre d'antigènes <sup>5,6,8</sup>. Le TCR est intimement lié au CD3 et forme le complexe TCR. Le CD3 est constitué de plusieurs chaînes :  $\gamma$ ,  $\delta$ , 2  $\epsilon$  et 2  $\zeta$ . Les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  contiennent chacune un motif ITAM alors que la chaîne invariante  $\zeta$  en contient 2. C'est via ces motifs ITAM qu'il y a transduction du signal lors de la reconnaissance du complexe peptide-CMH <sup>5</sup>. Le second signal de costimulation est délivré par les glycoprotéines CD80/B7-1 ou CD86/B7-2 de la CPA qui interagissent avec le récepteur CD28 présent sur les lymphocytes <sup>6</sup>. Finalement, suite à leur activation, les lymphocytes T spécifiques à l'antigène produisent de l'IL-2, un inducteur de prolifération, qui induit l'expansion clonale des lymphocytes T <sup>5,6</sup>.

Suite à l'éradication du pathogène, la vaste population de lymphocytes T effecteurs (CD4 ou CD8 selon l'antigène) résultant de l'expansion clonale n'est plus nécessaire et meurent<sup>6, 9-12</sup>. Par contre, pour générer une mémoire immunitaire, une petite population de lymphocytes survivra sous forme de lymphocytes mémoires<sup>13</sup>. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la génération de la mémoire immunitaire qui dépassent le cadre de ce mémoire (Fig. 2)<sup>1</sup>. L'élément essentiel est qu'une sous-population spécifique à l'antigène persistera longtemps après le contrôle de l'infection et donnera naissance à une réponse rapide et robuste lors d'une nouvelle exposition à l'antigène.

En plus des marqueurs mentionnés précédemment, les lymphocytes T expriment plusieurs autres molécules à leur surface comme le récepteur CCR7, impliqué dans la migration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> vers les ganglions lymphatiques, ou les isoformes RA et RO du CD45, impliqués dans l'activation cellulaire. En effet, CD45RA est l'isoforme long de CD45 et est exprimé sur les cellules T naïves alors que CD45RO est l'isoforme plus courte, et est exprimé sur les lymphocytes T qui ont rencontré leur antigène. Ces molécules peuvent être utilisées afin de phénotyper les sous-populations lymphocytaires effectrices et mémoires<sup>14-17</sup>. En effet, les lymphocytes T peuvent être divisés en 4 sous-populations sur la base de l'expression de ces marqueurs : naïves (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>), mémoires centrales (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>), mémoires effectrices (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) et mémoires effectrices exprimant RA (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>)<sup>17</sup>.



**Fig. 2** : Modèles de différenciation des lymphocytes T mémoires.

Le modèle **a)** représente la voie divergente : une cellule T naïve peut donner naissance à des cellules filles qui se développeront soit en cellules T effectrices soit en cellules T mémoires. **b)** Le modèle 2 représente la voie de différenciation linéaire : les cellules T mémoires descendent directement des cellules effectrices qui descendent des cellules T naïves. **c)** dans le modèle 3 (une variation du modèle 2), une stimulation antigénique de courte durée favorise le développement des cellules T mémoires centrales, alors qu'une plus longue stimulation favorise la différenciation des cellules T mémoires effectrices. **d)** Le modèle 4 représente l'hypothèse du potentiel décroissant : les fonctions effectrices des cellules T diminuent de façon constante en raison de la persistance de l'antigène. <sup>1</sup>

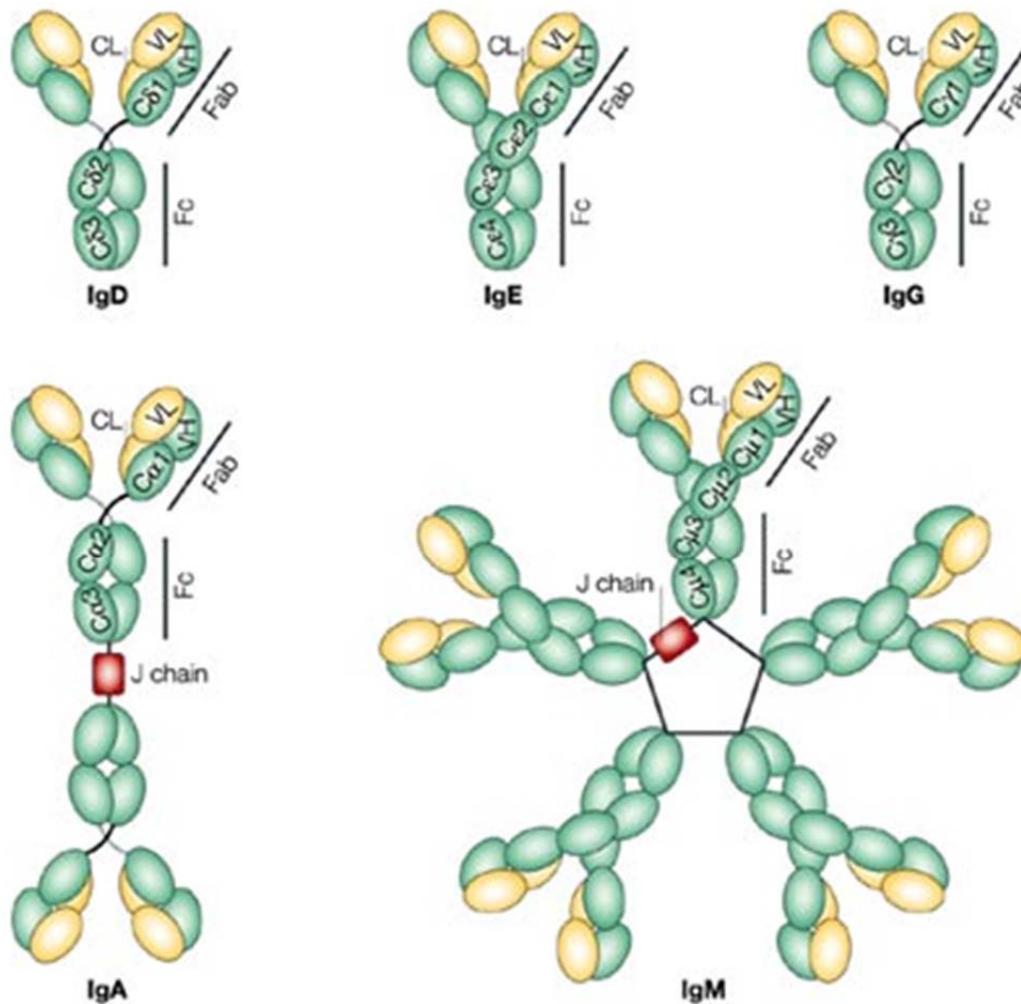
Licence : 3745670357530

## Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup>

### Les immunoglobulines

La réponse humorale est principalement médiée par les immunoglobulines (Ig), des glycoprotéines pouvant activer le complément, neutraliser et opsoniser des pathogènes. La structure en Y des immunoglobulines comprend 4 chaînes polypeptidiques, soit 2 chaînes lourdes identiques (50 kDa) et deux chaînes légères identiques (25 kDa) reliées entre elles par des ponts disulfures (Fig. 3) <sup>18-20</sup>. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine constant (C<sub>L</sub>) et d'un domaine variable (V<sub>L</sub>) alors que les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable (V<sub>H</sub>) et de trois ou quatre domaines constants (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, etc.) <sup>19</sup>. Les chaînes lourdes et légères sont associées de façon à ce que leur domaine variable soit adjacent l'un à l'autre, ce qui permet la formation de 2 sites de reconnaissance de l'antigène au bout de chacun des bras du « Y » (1 par bout). Comme pour les TCR, la recombinaison V(D)J permet une grande diversité de reconnaissance antigénique <sup>19, 20</sup>. La branche centrale du « Y » est constituée des domaines constants des chaînes lourdes non liées aux chaînes légères. C'est cette partie de l'Ig qui détermine s'il est d'isotype D, M, G, A ou E <sup>20</sup>. Chaque isotype possède une fonction différente; par exemple, les IgA sont associées aux muqueuses, les IgG sont nos anticorps circulants produits en réaction à un antigène.

Suite à la rencontre avec son antigène, une Ig peut subir la commutation de classe et/ou l'hypermutation somatique <sup>19, 20</sup>. La commutation de classe (class-switch) est un processus par lequel les lymphocytes B matures via une recombinaison des fragments constants des chaînes lourdes modifient leur Ig (soit M ou D) vers un autre isotype unique (soit M, E, A ou G) <sup>20</sup>. Quant à l'hypermutation somatique, il s'agit d'un processus via lequel la région V(D)J, où a eu lieu la recombinaison somatique dans les chaînes légères et les chaînes lourdes, va être mutée par la cytidine déaminase AID (activation-induced cytidine deaminase) afin d'augmenter l'affinité de l'anticorps pour son épitope <sup>20, 21</sup>.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Fig. 3** : Structure des différentes immunoglobulines.

Les immunoglobulines sont des hétérodimères en forme de « Y » composés de 2 chaînes légères (25 kDa) et 2 chaînes lourdes (55 kDa). Les chaînes légères interagissent avec les chaînes lourdes pour former les deux bras (Fab) qui contiennent les sites de reconnaissance antigénique à leur extrémité. Les extrémités C terminales des chaînes lourdes se combinent pour former la queue (domine Fc) qui peut interagir avec le complément ou des récepteurs Fc. Dépendamment du type de chaîne lourde, les mammifères ont 5 classes d'immunoglobulines (isotypes) : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM <sup>18</sup>. (Licence 3754830584602)

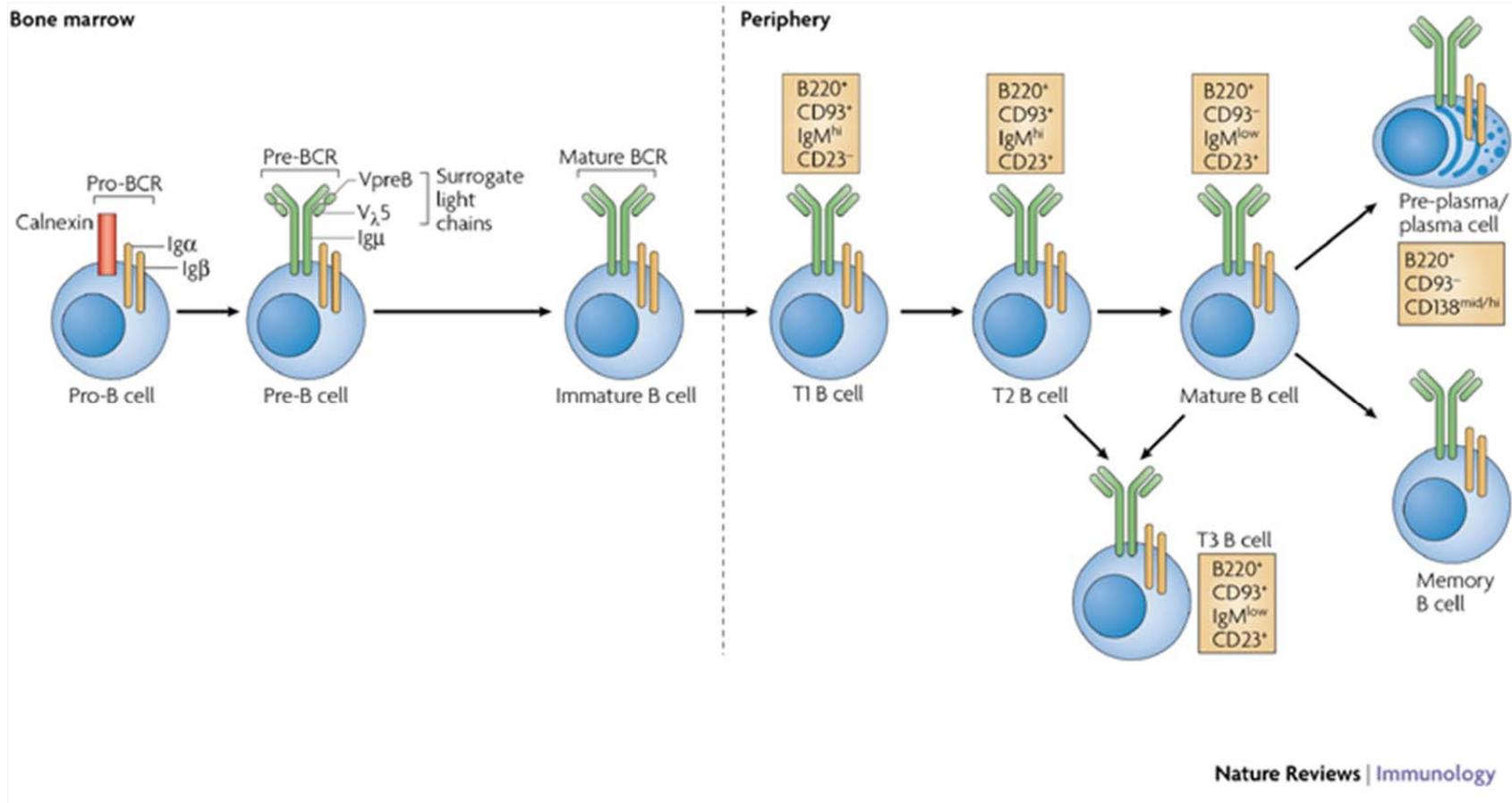
## **Ontogénie des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>**

Comme les lymphocytes T, les lymphocytes B dérivent des cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSH), qui, via un certain nombre d'étapes intermédiaires, se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Ce sont ces CLP, qui se développeront en cellules NK, cellules dendritiques (CD) et lymphocytes B et T. Ainsi, les progéniteurs des cellules B se développeront dans le foie fœtal ou la moelle osseuse postnatale en lymphocytes B CD19<sup>+</sup> (Fig. 4)<sup>22-27</sup>. Dans la cellule proB, il y a d'abord réarrangement entre les gènes D<sub>H</sub> et J<sub>H</sub> des chaînes lourdes, puis réarrangement entre les gènes V<sub>H</sub> et D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> sur un chromosome. Si ce premier réarrangement n'est pas productif, le processus est repris sur l'autre chromosome. Dans la cellule préB, la fonctionnalité des deux chaînes lourdes nouvellement réarrangées est testée via leur association avec une chaîne légère substitutive constituée de VpreB (similaire au domaine variable) et λ5 (similaire au domaine constant). Cette association des chaînes lourdes et des chaînes légères substitutives forme le pré-BCR. Ce dernier est exprimé à la surface des cellules préB en complexe avec les chaînes invariables Iga et Igb. C'est alors qu'a lieu la sélection positive qui n'est ni plus ni moins que la validation de la transduction du signal. Si le signal de survie est reçu, alors la cellule préB procède au réarrangement V-J de la chaîne légère κ. Si ce réarrangement n'est pas productif, alors le réarrangement est repris sur la chaîne légère λ afin d'engendrer une cellule B immature exprimant l'isotype IgM. C'est ici que la tolérance centrale est acquise avec l'aide des cellules stromales qui expriment des antigènes du soi. Si les cellules B immatures reconnaissent le soi spécifique avec une trop forte affinité ou si elles n'interagissent pas du tout, elles reçoivent un signal de mort. Ainsi, seulement les cellules B immatures reconnaissant le soi avec une faible affinité survivent. La spécificité antigénique du BCR (mIgM) est déterminée par la séquence V(D)J de la chaîne lourde et la séquence VJ de la chaîne légère. À l'instar des lymphocytes T, les lymphocytes B expriment aussi une glycoprotéine, le CD19, qui s'assemble avec le récepteur de cellules B, afin de diminuer le seuil de stimulation nécessaire à l'activation.

Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> immatures munis d'un BCR complet et ayant survécu à la sélection stromale quittent la moelle osseuse pour entrer dans la circulation périphérique, en route vers les organes lymphoïdes secondaires. Ce groupe de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> appelé « transitionnel » peut être subdivisé en « T1 » et « T2 ». Ces lymphocytes B transitoires

engendreraient les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs « matures ». Comme pour les lymphocytes T, l'engagement du BCR (mIgM) des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs, associés aux signaux de costimulation CD40/CD40L, entraîne l'activation et la différenciation des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> <sup>20, 28</sup>. Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs peuvent être activés avec ou sans l'aide des lymphocytes T<sub>H</sub>2 (activation T-dépendante et T-indépendante). Lors de l'activation T dépendante, les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> peuvent se différencier, selon l'intensité du signal, en plasmocytes de courte durée, en lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires dépendantes du centre germinatif ou indépendantes du centre germinatif. Dans le centre germinatif, le BCR des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> activés sera modifié à nouveau via la commutation de classe (de IgM/IgD à IgG, IgA et IgE) et l'hypermutation somatique afin de multiplier les capacités fonctionnelles de l'Ig et d'augmenter l'affinité du BCR pour son antigène. Les plasmocytes de courte durée, responsable de la genèse majorité des anticorps protecteurs suite à la réponse primaire, produiront une grande quantité d'IgM puis subiront eux aussi la commutation de classe et sécréteront des IgG <sup>20, 29</sup>. Une fois l'antigène éliminé, comme pour les lymphocytes T, une portion des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> survit sous forme de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires, qui, lors d'une rencontre subséquente avec le même antigène, donneront naissance à des plasmablastes qui sécréteront des anticorps commutés et de plus grandes affinités <sup>20</sup>.

L'évolution des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> peut être suivie grâce à l'expression de plusieurs marqueurs (Fig. 6) tels que CD10, exprimé par les précurseurs et les immatures, CD27, exprimé par les cellules expérimentées (ayant rencontré l'antigène), CD21, dont l'expression diminue avec l'activation, et CD20, qui est exprimé à tous les stades sauf le premier (proB) et le dernier (plasmablaste). Les immatures transitionnelles T1 sont décrites comme étant CD10<sup>++</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD21<sup>lo</sup>/CD20<sup>+</sup>, alors que les T2 sont CD10<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD21<sup>hi</sup>/CD20<sup>+</sup>. Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs sont CD10<sup>-</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD21<sup>hi</sup>/CD20<sup>+</sup>, les mémoires sont CD10<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup>/CD21<sup>hi</sup>/CD20<sup>+</sup>, et les plasmablastes sont CD10<sup>-</sup>/CD27<sup>++</sup>/CD21<sup>low</sup>/CD20<sup>-</sup> <sup>30, 31</sup>.



**Fig. 4 :** Le développement des lymphocytes B.

Le récepteur des cellules B (BCR) est produit dans la moelle osseuse via plusieurs étapes de recombinaison. Lorsqu'il est complet, le lymphocyte B CD19<sup>+</sup> immature quitte la moelle osseuse pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires. On distingue deux sous-groupes d'immatures transitionnelles (T1 et T2) qui donnent naissance aux lymphocytes B CD19<sup>+</sup> matures. Lorsqu'ils rencontrent leur antigène, les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs se développent en lymphocytes B CD19<sup>+</sup> effecteurs sécrétant des anticorps et en lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires<sup>22</sup>. Licence : 3754830339207

## **Le virus de l'immunodéficience humaine**

### **Brève description du virus**

Le VIH est un rétrovirus du genre lentivirus qui infecte près de 35 millions de personnes à travers le monde <sup>32</sup>. C'est un virus à ARN composé de neuf gènes : *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*. *Env* code pour les deux sous-unités de la glycoprotéine d'enveloppe : gp 120 (sous-unité de surface) et gp41 (sous-unité transmembranaire). *Gag* code pour les protéines p17 qui compose la matrice protéique (MA), p24 qui compose la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC) p7 qui protège le génome viral. *Pol* code quant à lui pour la protéase (p11) qui participe à l'assemblage du virus en clivant les précurseurs, la transcriptase inverse (p51/66) qui rétrotranscrit l'ARN viral en ADN viral et l'intégrase p32 qui intègre l'ADN viral à l'ADN cellulaire. Les six autres gènes (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*) codent pour des protéines accessoires et des protéines de régulation qui contrôlent la capacité du VIH à infecter des cellules, à se répliquer, et à provoquer la maladie.

### **Brève description de l'infection**

#### **Cycle de réplication**

Le VIH cible les cellules exprimant la molécule CD4 à leur surface (lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, macrophages, cellules dendritiques, etc.) <sup>32-34</sup>. La réplication virale se déroule en plusieurs étapes (Fig. 5), soit la fixation ou l'attachement à une cellule, la fusion, la pénétration et la décapsidation, la transcription inverse, l'intégration, la transcription, l'épissage des exons et excision des introns, la traduction de l'ARNm, la maturation des protéines virales, l'assemblage, le bourgeonnement, puis la maturation des virus <sup>32-34</sup>.

#### **Évolution**

L'infection par le VIH évolue en plusieurs phases d'abord, la primo-infection qui correspond à la phase de séroconversion qui suit la contamination <sup>34</sup>. Environ le tiers des personnes touchées présenteront des symptômes semblables à ceux de la grippe ou de la mononucléose. Ensuite vient la phase de latence, dite asymptomatique, pendant laquelle le virus peut vivre dans l'organisme sans provoquer de symptômes, et ce pendant de nombreuses années <sup>34</sup>. Vient ensuite la phase SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), durant

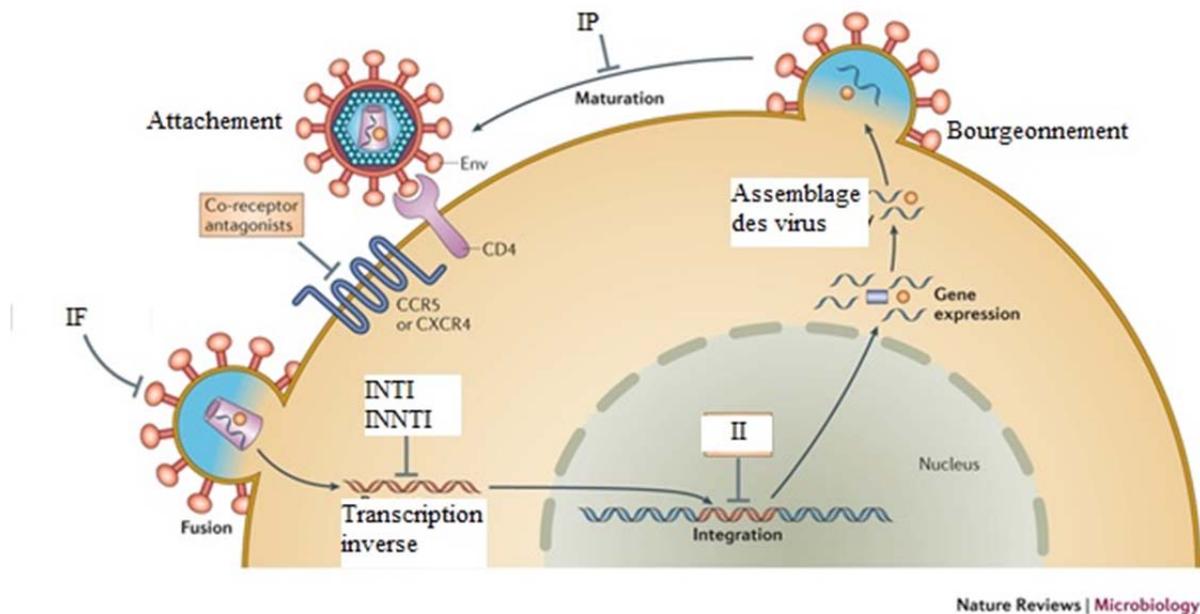
laquelle la personne ressent les effets de l'infection au VIH (fatigue, diarrhée, gonflement des ganglions, perte de poids, sueurs nocturnes, fièvre, etc.). L'état de profonde lymphopénie du stade SIDA rend les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) vulnérable à d'autres infections habituellement mineures (exemple : candidose, pneumonie, virus herpétiques, etc.), à la tuberculose et à certains cancers tels les lymphomes et le sarcome de Kaposi)<sup>34</sup>.

### **Suivi médical**

Afin d'assurer une prise en charge adéquate, les PVVIH devraient être suivis plusieurs fois par année. Deux facteurs sont pris en compte dans le suivi régulier des patients séropositifs, à savoir le compte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la charge virale. Le compte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> correspond au nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> présents dans le sang du patient. Cette valeur permet d'estimer le déficit immunitaire occasionné par le VIH. Le compte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> varie normalement entre 600 et 1 200 cellules/mm<sup>3</sup>. Chez les PVVIH, un décompte supérieur à 500 cellules/mm<sup>3</sup> est souhaitable, à partir de 350 cellules/mm<sup>3</sup>, le traitement devient indispensable. Sous la barre des 200 cellules/mm<sup>3</sup>, le patient est fortement immunosupprimé et le traitement, ainsi qu'une surveillance accrue et possiblement une prophylaxie antibiotique sont indispensables afin de prévenir les risques accrus de maladies opportunistes. La charge virale mesure la quantité de virus présente dans le sang en termes de copies d'ARN/ml. Elle permet le suivi de la réplication virale et de l'efficacité du traitement.

### **Traitement**

À ce jour, il est toujours impossible de guérir du VIH. Cependant, une vingtaine de médicaments antirétroviraux (ARV) sont disponibles pour contrôler l'infection. Ils agissent sur différentes étapes du cycle de réplication du VIH (Fig. 5). Les inhibiteurs nucléosidiques, les inhibiteurs non nucléosidiques et les analogues nucléotidiques font partie des inhibiteurs de la transcriptase inverse, qui ont comme mode d'action le blocage de la synthèse de l'ADN proviral à partir de l'ARN génomique viral<sup>33, 34</sup>. Les inhibiteurs de protéase empêchent la formation de virus infectieux. Les inhibiteurs de fusion empêchent l'entrée du virus dans la cellule cible, alors que les inhibiteurs d'intégrase empêchent la liaison entre l'ADN proviral et le génome de la cellule cible<sup>33-35</sup>.



**Fig. 5 :** Cycle de réplication du VIH et cibles thérapeutiques des antirétroviraux.

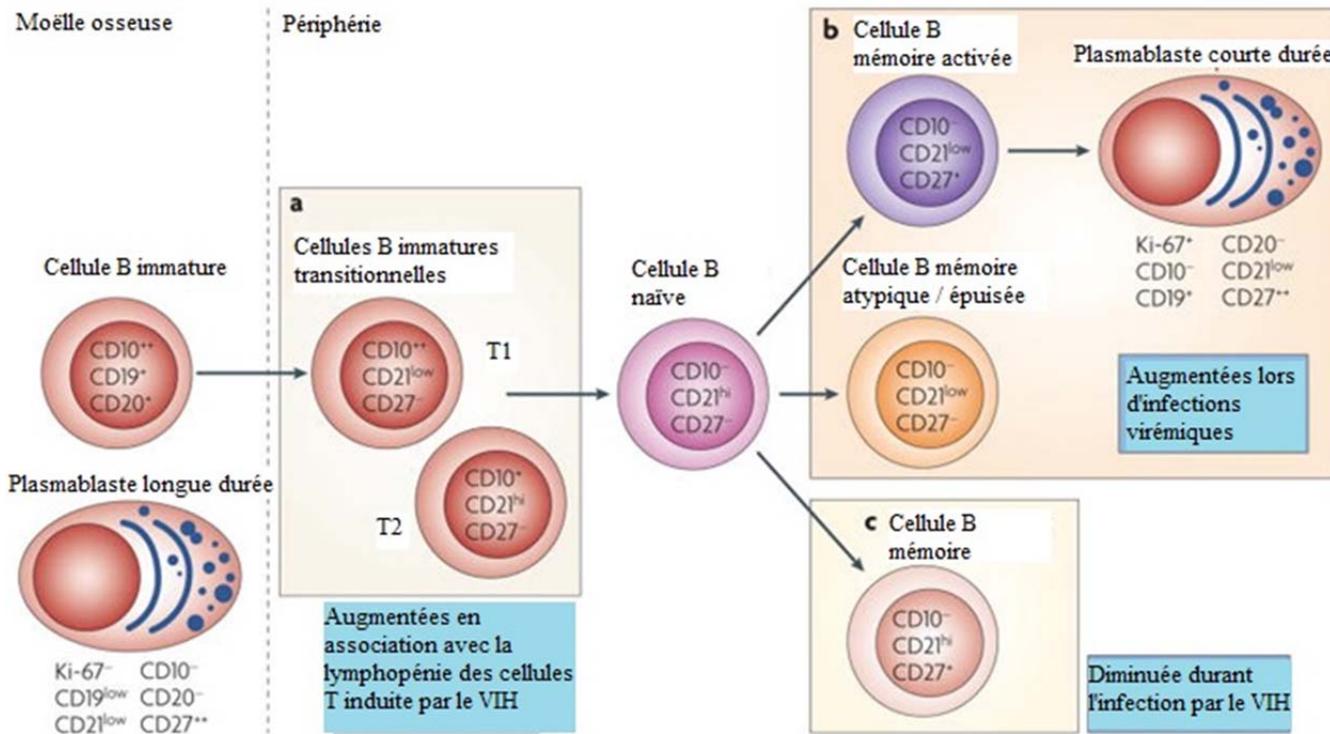
La première étape dans le cycle de réplication du VIH-1 est l'attachement de la glycoprotéine virale Env aux protéines de surface cellulaire CD4 et aux corécepteurs (CCR5 ou CXCR4). Cette étape peut être inhibée par des antagonistes des corécepteurs viraux. La fusion des membranes cellulaires et virales permet l'entrée de la capside virale dans la cellule. Cette étape est la cible des inhibiteurs de fusion (IF). Ensuite, le génome d'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin (ADNdb) et intégré dans le génome de l'hôte. La transcription inverse est la cible des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) et des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), alors que l'intégrase virale est inhibée par les inhibiteurs d'intégrase (II). Suite à son intégration, l'ADN proviral est transcrit en ARN viraux, qui sont traduits en protéines virales qui s'assemblent avec le génome d'ARN viral non épissé à la surface cellulaire. Les virions immatures bourgeonnent à partir de la cellule et mûrissent par traitement protéolytique des polyprotéines virales. Les inhibiteurs de protéase (IP) interfèrent avec l'étape de maturation. *Traduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Microbiology*<sup>33</sup>, copyright 2014 (Licence : 3754840516675).

## L'effet du VIH sur les lymphocytes

Le VIH infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et provoque une diminution drastique de leur fréquence ainsi que de graves altérations de leurs fonctions, comme des réponses antigènes spécifiques inadéquates, des profils de sécrétion de cytokines altérés, une mauvaise interaction avec les lymphocytes B CD19<sup>+</sup>, une expression accrue de plusieurs marqueurs d'activation et une augmentation de l'apoptose<sup>36-42</sup>. La présentation antigénique par les monocytes et les cellules dendritiques est aussi affectée avec la progression de l'infection<sup>39</sup>. Une diminution de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> totaux et une augmentation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> atypiques et activés, ainsi que l'expression du marqueur CD8 sur des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> a même été rapportée<sup>38, 41, 43-49</sup>. L'activation aberrante des lymphocytes T est principalement observée chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires et n'est pas restreinte aux cellules infectées par le VIH ou VIH-spécifiques.<sup>45</sup>

Le même genre d'observation a été fait quant aux lymphocytes B CD19<sup>+</sup>. En effet, leur fréquence est diminuée et de graves perturbations fonctionnelles ont été décrites, comme une absence ou une diminution de la réponse aux signaux antigènes-spécifiques, l'activation polyclonale, l'hypergammaglobulinémie, une fréquence plus élevée de cancer des cellules B (e.g. : lymphomes non hodgkiniens), des profils de sécrétions de cytokines altérés, etc.<sup>37, 38, 41, 44, 45, 50-58</sup>. Plusieurs rapports de diminution des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoire exprimant CD27 et d'apparition de populations naïves activées plus susceptibles à l'apoptose ont été publiés<sup>45, 53, 56, 57, 59</sup>. Ce n'est que récemment, avec la découverte des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> atypiques ou épuisés, à l'instar des T, que le portrait des anomalies du compartiment B fût décodé (Fig. 6)<sup>10, 12</sup>. On observe une augmentation de la fréquence de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> immatures (CD10<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup>), mémoires activés (CD21<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup>), mémoires atypiques/épuisés (CD21<sup>-</sup>/CD27<sup>-</sup>) et plasmablastes, tout ça au détriment des mémoires classiques (CD21<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>) qui diminuent<sup>31, 60-66</sup>.

Plusieurs de ces anomalies se résorbent avec l'initiation d'un traitement ARV et le contrôle de la virémie, mais la restauration peut n'être que partielle<sup>31, 57, 60, 64, 65, 67-69</sup>



**Fig. 6 :** Apparition de 3 nouvelles sous-populations de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> chez les PVVIH.

Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> immatures CD20<sup>+</sup> qui sortent de la moelle osseuse et entrent dans le sang périphérique peuvent être identifiés via l'expression de CD10 en l'absence de CD27. Ces lymphocytes B CD19<sup>+</sup> transitoires immatures peuvent être divisés en T1 (CD21<sup>low</sup>) et T2 (CD21<sup>hi</sup>) et leur fréquence est augmentée dans le sang périphérique PVVIH (a). Une virémie non contrôlée (chronique) est associée à l'expansion de plusieurs sous-populations tels les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> matures activés qui expriment CD27 et répriment CD21; les plasmablastes qui expriment CD27, mais répriment CD20 et CD21; et les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires atypiques/épuisés qui répriment CD21 et CD27 et possèdent plusieurs caractéristiques d'épuisement induites par le virus (b). L'infection à VIH est associée à une diminution de la fréquence des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires (CD21<sup>hi</sup>/CD27<sup>+</sup>) qui n'est pas renversée par la thérapie antirétrovirale (c). Traduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : *Nature Reviews Immunology*<sup>31</sup>, copyright 2009 (Licence : 3751480691307).

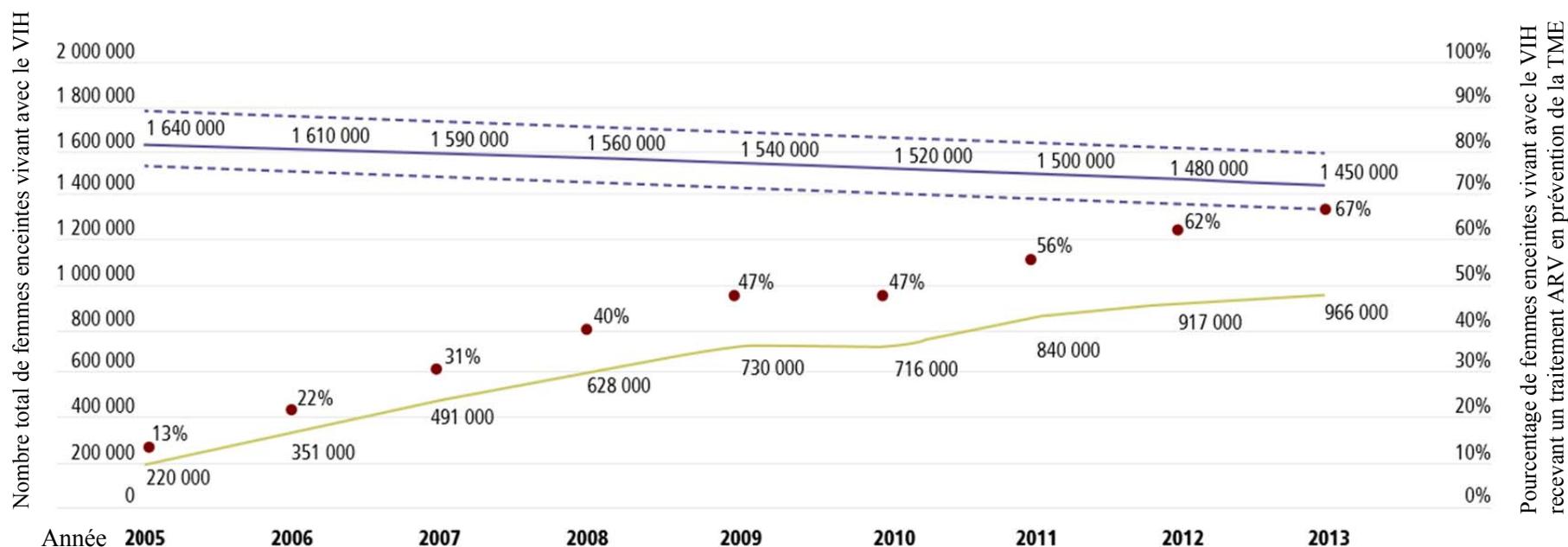
## **Le VIH et la grossesse**

### **La transmission verticale du VIH**

La transmission du VIH de la mère à l'enfant (TME) peut avoir lieu durant la grossesse, pendant l'accouchement et lors de l'allaitement. En absence de toute intervention, le risque de transmission verticale du VIH varie entre 15 et 40 %<sup>70, 71</sup>.

L'organisation de la santé mondiale (OMS) recommande actuellement l'administration à partir du deuxième trimestre ou plus tôt, d'un traitement ARV aux femmes enceintes, l'administration de zidovudine par voie intraveineuse intrapartum, 6 semaines d'ARV oral au nouveau-né et le remplacement de l'allaitement par des préparations maternelles<sup>70-72</sup>. Ces mesures ont été démontrées efficaces puisque le taux de TME est sous la barre des 2 % dans plusieurs endroits<sup>70-79</sup>.

Un de principaux objectifs de l'OMS est d'éliminer les nouvelles infections par le VIH chez les enfants<sup>71</sup>. La TME est la cause principale d'infection néonatale par le VIH. Ainsi, en traitant les mères infectées par le VIH, on prévient la TME. L'accessibilité aux traitements ARV est en constante augmentation et atteint près de 70 % en 2013 (Fig. 7). Avec plus de 1,5 million de femmes enceintes vivant avec le VIH, on parle d'environ 1 million de naissances chaque année. Ces enfants exposés non infectés (ENI) ne sont pas porteurs du VIH mais y auront été exposés durant la gestation (in utero) et l'accouchement (intrapartum), et auront été exposés aux ARV durant la grossesse (in utero), l'accouchement (intrapartum) et les premières semaines de vie.



**Fig. 7 :** Nombre de grossesses VIH+ dans les pays à faible et moyen revenu et pourcentage d’entre elles recevant un traitement ARV entre 2005 et 2013.

Les lignes violettes pleines représentent le nombre total de femmes enceintes vivant avec le VIH (pointillées : intervalle). Les lignes jaunes représentent le nombre de femmes enceintes vivant avec le VIH recevant un traitement ARV en prévention de la TME. Les points rouges représentent le pourcentage de couverture des grossesses VIH<sup>+</sup> <sup>71</sup>.

## La santé des enfants exposés non infectés

La population d'enfants ENI suscite depuis quelques années un intérêt grandissant et plusieurs groupes à travers le monde surveillent son évolution. De plus en plus, on note que malgré l'absence de TME et indépendamment de l'administration du traitement ARV, ces enfants sont plus sensibles aux infections et que leurs premières années de vie sont plus souvent précaires. À titre d'exemple, l'étude ZVITAMBO (n = > 14 110) a rapporté un taux de mortalité 3 fois supérieur chez les ENI par rapport aux enfants non exposés (NE) <sup>80</sup>. En Ouganda, le taux de mortalité durant les 2 premières années de vie était 2 fois plus élevés <sup>81</sup>. Au Malawi, on parle d'un taux de mortalité un peu plus de 4 fois supérieur <sup>82</sup>. Un nombre de visites et d'hospitalisations significativement plus élevé chez les enfants ENI par rapport aux enfants NE a aussi été rapporté, et ce même en l'absence de malnutrition <sup>80, 83-85</sup>.

Les principales causes de morbidité et de mortalité ont été associées à des infections respiratoires aiguës, à des infections à pneumocoque invasif, à des gastro-entérites, des septicémies, des otites moyennes aiguës d'origine bactérienne et virale, des pneumonies, etc. <sup>78, 80, 83, 86-97</sup>. Les pathogènes responsables de ces infections comprennent entre autres *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes* pour les bactéries et le *Rhinovirus humain*, l'*Adenovirus* et le *Bocavirus humain* pour les virus<sup>95</sup>. Certains de ces pathogènes sont habituellement retrouvés chez les patients infectés par le VIH, ce qui est particulièrement inquiétant.

La précarité des ENI est aussi perceptible dans leur réponse au traitement. Deux études portant sur des enfants atteints de pneumonie sévère ont montré que les chances de ne pas répondre à l'antibiothérapie dans les 48 heures étaient considérablement augmentées chez les ENI <sup>96, 97</sup>.

Bien qu'il soit tentant de conclure que ces taux de mortalité et de morbidité élevés résultent des conditions de vie difficiles présentes dans les pays à faible et moyen revenu, cette affirmation serait fautive. Les ENI des pays industrialisés ne sont pas épargnées : en Europe,

un risque augmenté d'infection sévère, d'infection invasive au streptocoque du groupe B et à *Streptococcus pneumoniae* a été rapportée<sup>93, 98, 99</sup>.

Pour tenter d'expliquer ces observations, plusieurs équipes ont analysé diverses composantes de la « problématique ENI ». Certaines ont suivi la voie du lait maternel et de l'allaitement<sup>85, 100-102</sup>, une hypothèse qui prend tout son sens quand on pense au transfert passif d'anticorps et à la malnutrition que peut engendrer l'absence d'allaitement<sup>85, 100-102</sup>. Bien que cette voie ait un sens dans certains pays à faible et moyen revenu, elle n'explique pas les observations faites dans les pays industrialisés, où l'allaitement est une option et non une obligation (i.e. remplacement du lait maternel par du lait maternisé et conditions sanitaires compensant largement pour l'absence de transfert passif d'anticorps).

D'autres se sont tournés vers le système immunitaire inné, comme l'équipe de Reikie et al., qui ont analysé la production de cytokines après stimulation avec des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). Ils ont observé qu'en réponse à ce type de stimulation, plus de cellules mononuclées montaient une réponse pro-inflammatoire et produisaient aussi plus de cytokines. Par contre, ils ont détecté ces différences seulement à 2 et 6 semaines d'âge<sup>103</sup>. Bien que les nouveau-nés soient particulièrement vulnérables durant cette période, ces observations ne suffisent pas à elles seules à expliquer pourquoi les enfants ENI ont des infections plus sévères ou plus fréquentes durant leurs premières années de vie.

Le système immunitaire inné étant intimement lié au système immunitaire adaptatif, ces dérèglements pourraient avoir un impact sur la présentation antigénique, l'activation des lymphocytes et l'établissement de la mémoire immunologique. Il a d'ailleurs été démontré par plusieurs équipes que les populations de lymphocytes sont dérégées chez les ENI. Longwe *et coll.* ont analysé les différentes populations lymphocytaires chez des enfants ENI recevant du cotrimoxazole en prophylaxie et les a comparées à celles retrouvées chez des enfants sains. Ils ont trouvé qu'à 6 mois, les enfants ENI avaient une fréquence moins élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs, mais une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires effecteurs. Ce groupe a rapporté des fréquences de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> semblables dans les deux groupes<sup>104</sup>.

Les travaux de deDeus et al. ont montré que les fréquences de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs et activés (i. e. effecteurs mémoires) pouvaient être associées à la charge virale de la mère à la naissance. Les enfants nés de mères avec une charge virale plus élevée avaient significativement moins de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs et plus de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires<sup>105</sup>. Les travaux de Clerici *et al.* vont également dans ce sens, puisqu'ils ont entre autres observé des fréquences réduites de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs ainsi qu'une fréquence augmentée de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés (effecteurs) chez des nouveau-nés ENI en comparaison avec des nouveau-nés sains<sup>106</sup>. Ces observations à la naissance suggèrent que les enfants ENI pourraient avoir été exposés à des particules virales durant la grossesse. En effet, bien que la transmission verticale du VIH ait le plus souvent lieu lors de l'accouchement, il existe des preuves de transmission in utero et que le VIH peut infecter les trophoblastes<sup>107-117</sup>. Les infections congénitales au virus Herpès simplex, à la rubéole, au cytomégalovirus (CMV), au parvovirus et à *Toxoplasma gondii* démontrent bien que le passage de particules virales et de parasites au travers de la barrière placentaire est possible<sup>116, 118, 119</sup>. *Listeria monocytogenes* peut aussi traverser la barrière placentaire<sup>113, 120</sup>. En ce sens, plusieurs équipes ont signalé la présence de lymphocytes T spécifiques aux protéines structurelles et accessoires du VIH chez les enfants ENI ce qui appuie l'hypothèse de l'exposition au virus<sup>121-125</sup>.

D'autres observations d'anomalies immunologiques ont été faites par d'autres groupes et bien qu'elles diffèrent d'une étude à l'autre, un portrait global peut tout de même être tracé : les enfants ENI naissent avec des populations lymphocytaires altérées d'un profil « immature et naïf » vers un profil plus « mature et mémoire »<sup>126-133</sup>.

Avec la multiplication des rapports d'anomalies du développement du système immunitaire chez les ENI se multiplient les questions sur l'état de santé à long terme de ces enfants. L'une d'entre elles concerne leur capacité à répondre aux vaccins de l'enfance. À ce propos, quelques rapports conflictuels ont été publiés. Certaines équipes ont rapporté une réponse comparable à celle des enfants sains pour le vaccin RRO, qui immunise contre la rubéole, la rougeole et les oreillons<sup>134</sup> et le DTwP-HibCV/HBV, qui protège contre la diphtérie, la coqueluche, le tétanos, *Haemophilus influenzae* et l'hépatite B<sup>135, 136</sup>. D'autres

rapportent plus de non-répondeurs au vaccin de l'hépatite B et des titres de protection inférieurs pour la diphtérie et le tétanos chez les enfants ENI comparés aux enfants sains <sup>137, 138</sup>. Ces rapports qualifiaient les enfants comme étant répondeurs ou non s'ils atteignaient une certaine concentration d'anticorps sériques spécifiques au vaccin. Ainsi, l'état de l'ensemble de la réponse vaccinale, de la fonction effectrice à la génération de la mémoire immunologique, a été évalué à partir de sa seule composante effectrice qu'est la production d'anticorps. De plus, la performance de tous les essais immuno-enzymatiques n'était pas la même et des différences de sensibilité et de précision auraient pu entraîner une interprétation différente des résultats, pour le tétanos du moins <sup>139</sup>.

Lorsque la réponse a été analysée de façon plus fonctionnelle par Kidzeru *et al.*, elle apparut altérée. Comparativement aux contrôles sains NE, la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez les ENI était augmentée suite à la stimulation avec le bacille Calmette-Guérin (BCG), *Bordetella pertussis* et l'entérotoxine staphylococcique B (SEB). Malgré cette importante prolifération, le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> produisant plusieurs cytokines était cependant réduit <sup>140</sup>. Des réponses immunitaires altérées au BCG avaient déjà été signalées auparavant chez les enfants ENI <sup>141, 142</sup>.

Dans un même ordre d'idée, Rowland-Jones *et al.* ont analysé la réponse aux antigènes vaccinaux du BCG et du tétanos ainsi que la réponse à la stimulation avec SEB. Ils ont observé une fréquence similaire de répondeurs chez les ENI et les NE, mais un profil fonctionnel de sécrétion de cytokines (IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) différent. À 3 mois, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> des ENI sécrétaient significativement plus de cytokines, alors qu'à 12 mois, elles en sécrétaient moins que les NE. Aussi, à 3 et 12 mois, la réponse mémoire effectrice TH1 aux antigènes vaccinaux était diminuée chez les ENI <sup>143</sup>.

L'analyse rétrospective des données cliniques de 585 enfants ENI de la cohorte mère-enfant du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) du CHU Sainte-Justine a révélé que les enfants nés de mères avec une charge virale supérieure à 1 000 copies d'ARN/ml avaient une fréquence significativement diminuée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et augmentée de

lymphocytes B CD19<sup>+</sup> à 2 et 6 mois d'âge, comparativement aux enfants nés de mères avec une charge virale inférieure à 50 copies/ml<sup>144</sup>. Cette étude est des plus intéressante parce qu'elle porte sur un nombre important de sujets et qu'elle a été faite ici dans un pays industrialisé.

## **Hypothèses et objectifs**

Compte tenu des préoccupations au sujet des anomalies immunitaires chez les enfants ENI et le manque de compréhension claire quant à leurs causes, les présents travaux avaient pour but de mieux caractériser la nature de ces anomalies et de tester leurs associations avec les paramètres cliniques retrouvés chez la mère (décompte de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ; charge virale VIH-1, traitement ARV, etc.) Pour ce faire, nous avons phénotypé les réservoirs de lymphocytes T et B, et évalué la réponse antigène spécifique au vaccin du tétanos des ENI. Nous nous attendions à observer des différences significatives entre les ENI nés de mères avec une infection contrôlée pendant la grossesse par rapport à ceux nés de mères avec une infection non contrôlée.

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

### **Sujet à l'étude**

Les enfants participant à l'étude ont été recrutés parmi les participants de la cohorte mère-enfant du Centre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS) du CHU Sainte-Justine (n = 35) entre février 2014 et septembre 2015. Les mères des enfants devaient avoir plus de 18 ans, être infectées par le VIH-1 et avoir été traitées avec des agents antirétroviraux pendant la grossesse. Les accouchements prématurés (< 37 semaines d'âge gestationnel) ont été exclus. Les données cliniques et sociodémographiques des couples mères-enfants sont résumées dans le tableau 1.

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU Sainte-Justine. Un consentement écrit et éclairé a été obtenu des parents ou du tuteur de chaque participant.

Tous les enfants participant à l'étude ont été contrôlés pour le VIH selon un protocole rigoureux et un suivi clinique approprié leur a été offert.

### **Vaccination des enfants**

Tous les enfants participants à l'étude ont été vaccinés au CMIS au cours de leur suivi pédiatrique régulier. Le Programme d'immunisation du Québec (fig. 8) comprend un vaccin combiné immunisant contre la diphtérie, la coqueluche, le tétanos, l'hépatite B, la poliomyélite et les infections graves à *Haemophilus influenzae* de type b (DCaT-HB-VPI-Hib)<sup>145</sup>. Le vaccin (INFANRIX hexa, GlaxoSmithKline, Mississauga, Ontario) est administré à tous les enfants à 2, 4, 6 et 18 mois de vie.

Des volontaires sains (contrôles) ont été immunisés avec un vaccin combiné diphtérie, coqueluche et tétanos (Boostrix, GlaxoSmithKline, Mississauga, Ontario). Le sang veineux a été recueilli avant l'immunisation, puis 6 jours et 6-8 semaines post-immunisation.

**Tableau 1 :** Caractéristiques cliniques et sociodémographiques maternelles et des nouveau-nés.

CARACTÉRISTIQUES MATERNELLES			CARACTÉRISTIQUES NOUVEAUX-NÉS	
<b>Origine ethnique</b>			<b>Âge gestationnel</b>	
Africaine	17	53%	À la naissance (semaines) *	39 2/7 1 1/7
Antillaise	6	19%		
Caucasienne	7	22%	<b>Type d'accouchement</b>	
Latino-américaine	1	3%	Vaginal	18 56%
Mûlatre	1	3%	Césarienne élective	9 28%
			Césarienne d'urgence	5 16%
<b>Âge de la mère à la naissance *</b>			<b>Sexe</b>	
15-19	0	0%	Masculin	16 50%
20-24	4	13%	Féminin	16 50%
25-29	5	16%		
30-34	11	34%	<b>APGAR</b>	
35-39	11	34%	À 1 minute *	8,2 2,4
40-44	1	3%	À 5 minutes *	8,8 0,9
45-49	0	0%	À 10 minutes *	9,0 0,2
<b>Compte de CD4 maternel</b>			<b>Poids</b>	
À la naissance **, §	610	(209 - 1078)	À la naissance (grammes) *	3 248,6 479,9
< 200	1	3%		
200 to < 500	8	25%		
≥ 500	23	72%		
Plus bas durant la grossesse **				
< 200	2	6%		
200 to < 500	18	56%		
≥ 500	12	38%		
<b>Charge virale maternelle</b>				
À la naissance **, §	40	(40 - 55 440)		
< 1 000	31	97%		
≥ 1 000	1	3%		
Plus élevée durant la grossesse **				
< 1 000	22	69%		
≥ 1 000	10	31%		
<b>Prophylaxie antirétrovirale durant la grossesse</b>			Recrutés N = 35	
NRTI + PI	24	75%	Prématurés	2
None	1	3%	Déménagé	1
Changement	4	13%	<b>Total N =</b>	<b>32</b>
PI+II+NRTI	1	3%		
NRTI + NNRTI	1	3%		
II + NRTI	1	3%		

Légende :

\* moyenne (déviation standard)

\*\* médiane (min - max)

§ dernière donnée avant accouchement, nombre de cellules par mm<sup>3</sup>

# Calendrier régulier de vaccination

Certains vaccins sont recommandés pour tous. Ils font partie du calendrier de vaccination.

Vaccin qui protège contre :	À 2 mois	À 4 mois	À 6 mois	À 12 mois	À 18 mois	Entre 4 et 6 ans	4 <sup>e</sup> année du primaire	3 <sup>e</sup> année du secondaire	Après 60 ans
Diphtérie-coqueluche-tétanos-hépatite B-polio-Hib	✓	✓	✓ (sans l'hépatite B)		✓				
Pneumocoque	✓	✓		✓					✓ (65 ans et plus)
Rotavirus	✓	✓							
Grippe, à l'automne			✓ (6 à 23 mois)						✓
Méningocoque C				✓				✓ (à compter du 1 <sup>er</sup> septembre 2013)	
Rougeole-rubéole-oreillons-varicelle				✓ (sans la varicelle)	✓				
Diphtérie-coqueluche-tétanos-polio*						✓		✓ (sans la polio)	
Hépatite B							✓ (le vaccin utilisé protège aussi contre l'hépatite A)		
Virus du papillome humain							Filles seulement		

\* Une dose du vaccin dcaT est aussi indiquée pour tous les adultes.

D'autres vaccins peuvent être recommandés en raison de l'état de santé, du travail, des activités ou d'un voyage.

Santé  
et Services sociaux  
Québec 

Fig. 8 : Programme de vaccination infantile du Québec <sup>145</sup>.

## **Traitement des échantillons**

L'étude nécessitait un prélèvement de sang de cordon ombilical à la naissance et deux prélèvements de sang veineux à 6 et 12 mois. Le sang de cordon a été recueilli à la naissance (n = 19) à l'aide des sacs de collecte de sang Optipac contenant du Citrate Phosphate Dextrose (CPD) comme agent anticoagulant (Fresenius Kabi Group, Richmond Hill, ON). Le sang veineux (10 ml) a été recueilli à 6 mois (n = 15) et 12 mois (n = 7) à l'aide de tube de prélèvement contenant de l'EDTA (Becton, Dickinson and Company, Mississauga, On).

Dans les 6 heures suivant le prélèvement, le plasma a été recueilli suite à une centrifugation de 10 minutes à 1 000 g, puis conservé à -80 C. Pour recueillir les cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP), on a procédé à une centrifugation par gradient de densité. Le plasma précédemment retiré a été remplacé par du milieu RPMI (Wisent, St-Jean-Baptiste, Québec). Le sang a ensuite été dilué 1:2 dans du RPMI et transféré, en prenant soin de ne pas mélanger les phases, dans un tube conique contenant du milieu séparateur Ficoll Hypaque (Wisent, St-Jean-Baptiste, Québec). Les tubes sont centrifugés 20 minutes à 1 000 g sans frein. À l'issue de la centrifugation, les CMSP se retrouvent entre le plasma et le milieu séparateur. Les CMSP sont récoltées à l'aide d'une pipette Pasteur jetable, placées dans un nouveau tube conique de 50 ml, puis lavées trois fois avec 35, 15 et 10 ml de R10 (RPMI + 10 % v/v sérum de veau fœtal (SVF, Wisent, St-Jean-Baptiste, Québec) avec gentamicine (Wisent, St-Jean-Baptiste, Québec). Finalement, les cellules sont resuspendues dans du milieu de congélation (SVF + 10% v/v DMSO [Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO], congelé progressivement à -80°C et transférées, dans les 48 heures, pour cryoconservation dans l'azote liquide.

## **Production d'oligomères de toxoïde tétanique**

### **Construction du vecteur pET41-BirA**

Le gène BirA a été amplifié à partir du plasmide pET21a-BirA [Addgene plasmide 20857, Cambridge, MA] à l'aide de la trousse à PCR HotStarTaq DNA Polymerase [Qiagen]. L'amorce sens contient un site de restriction XbaI souligné [5' - TCT AGA ATG AAG GAT AAC ACC GTG CCA CTG - 3'] alors que l'amorce anti-sens contient un site de

restriction HindIII [5' - GGC CGC AAG CTT TTA TTT TTC TGC ACT ACG CAG - 3']. Le produit de PCR a par la suite été purifié grâce la trousse Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit [GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ]. L'insert ainsi que le plasmide pET41[a]<sup>+</sup> ont été digérés avec les enzymes de restriction HindIII et XbaI FASTDigest [Thermo Scientific, Carlsbad, CA] lors d'une incubation de 1 heure, à 37 °C. Le produit de digestion du plasmide pET41[a]<sup>+</sup> correspondant à 4 990 pb a été purifié grâce à la trousse Illustra. Le gène BirA a été ligué dans le plasmide pET41[a]<sup>+</sup> à l'aide de la ligase T4 [Invitrogen, Carlsbad, CA], 1 heure à température pièce. La ligation pET41[a] - BirA a été utilisée pour transformer des *E. coli* TOP10 chimiquement compétentes [ThermoFisher, Carlsbad, CA], en utilisant un protocole de transformation par choc thermique. Suite à la transformation, les gélules ont été incubées 16 heures à 37 °C. Afin de vérifier que les colonies obtenues portaient bien le vecteur recombinant, une extraction plasmidique a été réalisée avec la trousse QIAprep Spin Miniprep [Qiagen] et les plasmides ont été séquencés [Université de Laval à Québec].

### **Clonage et purification des vecteurs pET15a-TTCF et pET41-BirA**

Le plasmide pET15a-TTCF nous a aimablement été fourni par le Dr Kai Wucherpfennig, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA)<sup>146</sup>. Ce dernier code pour le fragment C terminal du toxoïde tétanique (TTCF) muni d'un site de biotinylation et d'une étiquette polyhistidine. Le plasmide recombinant pET41(a) - BirA et le plasmide pET15a-TTCF ont été amplifiés dans des *E. coli* TOP10 puis purifiés à l'aide d'une extraction plasmidique avec la trousse QIAprep Spin Midiprep. L'ADN plasmidique a été élué dans le l'eau ultra pure et conservée à -20°C.

### **Production de TTCF**

#### **Transformation des BL21 avec les vecteurs pET15a-TTCF et pET41 (a) BirA**

Des *E. coli* BL21 (DE3) ont été cotransformées avec le plasmide recombinant pET41(a)-BirA et pET15a-TTCF à un ratio de 1:10 en utilisant un protocole de transformation par choc thermique. Les bactéries transformées ont été cultivées dans 50 ml de bouillon Luria-Bertani (LB) additionné de kanamycine [50 µg/ml] et d'ampicilline [100 µg/ml] 16 heures à

37°C, avec agitation. Suite à l'incubation, la culture a été transférée dans 450 ml de Super Broth (32 g / L tryptone, 20 g / L extrait de levure, 5 g NaCl et 5 ml NaOH [1M] à pH 7.4) additionnés extemporanément de 12 ml de MgSO<sub>4</sub> (4 %), 20 ml sucrose (20 %), ampicilline [100 µg / ml] et kanamycine [50 µg/ml] et incubé à 37°C avec agitation. La densité optique (DO) de la culture a été mesurée toutes les 30 minutes jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> de 1.

### **Induction de la production de protéines**

Lorsque la DO<sub>600</sub> a atteint 1, la production de TTCF et BirA a été induite avec 1 mM d'isopropyle β- D-thiogalactopyranoside 1 (IPTG) pendant 6 h à 37°C avec agitation. La biotine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) a été ajoutée au même moment à raison de 100 mg/L. Les bactéries ont été récoltées en centrifugeant dix aliquotes de 50 ml durant 30 minutes à 4 000 g. Les culots ont été séchés puis conservés à -80°C jusqu'à la purification de protéine.

### **Purification du TTCF sur colonne d'affinité**

Les culots de bactéries ont été lysés dans du réactif d'extraction de protéine B-PER (« *B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent* », Thermo Scientific, Carlsbad, CA) pendant 1 h avec agitation. Le lysat bactérien contenant les protéines a été recueilli à l'aide d'une ultracentrifugation de 10 minutes à 16 000 g. La protéine d'intérêt TTCF étant joutée d'une étiquette polyhistidine, elle peut être purifiée par chromatographie sur colonne. Pour ce faire, nous avons utilisé la trousse « *HisPur™ Ni-NTA Spin Columns* » (Thermo Scientific, Rockford, IL) avec les concentrations d'imidazole suivantes : tampon d'équilibration : 10 mM, tampon de lavage : 25 mM et tampon d'élution : 250 mM. Les trois lavages recommandés ont été augmentés à cinq (tampon de lavage) et le volume d'élution doublé à 2 ml (tampon d'élution).

La qualité de la purification a été analysée par SDS-page. Des fractions de 100 µl ont été récolté au début et à la fin du passage de l'échantillon, après chaque lavage et à chaque 500 µl d'élution. On a ajouté 100 µl de tampon d'échantillon de Laemmli 2X (Bio-Rad, Mississauga, On) à chaque fraction. Les différentes fractions ont été incubées 5 minutes à

95 °C. Un gel de polyacrylamide préfabriqué 4 - 20 % (Bio-Rad, Mississauga, On) et l'échelle de poids moléculaire « *Precision Plus Protein Dual Color Standards* » (Bio-Rad, Mississauga, On) ont été utilisés. La migration a été effectuée à 100 V pour les 15 premières minutes, puis à 200 V jusqu'à la fin de la migration. Le gel a par la suite été coloré au Bleu de Coomassie (50 % v/v méthanol, 40 % v/v H<sub>2</sub>O, 10 % v/v acide acétique et 0,25 % v/v « *Coomassie brilliant blue R250* ») pendant 1 h puis décoloré avec une solution de décoloration (50 % méthanol, 40 % H<sub>2</sub>O, 10 % acide acétique) pendant la nuit.

Une fois la purification contrôlée, le TTCF est ajusté à une concentration de 1 mg/ml et additionné d'azoture de sodium à une concentration finale de 0,02 %; pour assurer la conservation à 4°C.

### **Essai d'oligomérisation**

L'efficacité de biotinylation du TTCF a été évaluée dans un essai de retard sur gel. Le TTCF purifié a été incubé pendant une heure à température ambiante avec de la streptavidine (SA)(Amresco, Solon, Ohio) à différents ratios (de l'excès de streptavidine à l'excès de TTCF : 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5), puis analysé par SDS-page comme décrit précédemment mais sans bouillir les échantillons.

## **Analyses par cytométrie en flux**

### **Décongélation des CMSP**

Les CMSP cryoconservées sont décongelées dans un bain-marie à 37°C sous constante agitation. La cryoviale est retirée du bain quand il ne reste qu'un grain de glace au fond. Les CMSP sont transférées dans un tube de 50 ml puis lavées avec 35 ml de milieu R10 refroidi à 4°C. Le 1<sup>er</sup> ml de milieu est ajouté goutte à goutte en brassant entre chaque goutte en au moins une minute. Cette procédure évite que les cellules subissent un choc osmotique. Les 4 ml subséquents sont ajoutés de la même façon sans contrainte de temps. Les 10 ml suivants sont ajoutés à raison de quelques gouttes à la fois. Puis, les derniers 20 ml sont ajoutés en petits jets, toujours en agitant. La suspension de CMSP est centrifugée 10 min à 500 g. On procède à un deuxième lavage avec 10 ml de R10.

## **Marquage des CMSP**

Les cellules décongelées sont incubées avec 125 unités de benzonase (Novagen, San Diego, CA); puis centrifugées 5 minutes à 500 g et resuspendues dans 1 ml de SVF à 4°C pour 30 minutes; cette étape de blocage évite les liaisons non spécifiques des anticorps aux récepteurs Fc. Suite au blocage, on centrifuge les CMSP et on les resuspend dans 200 µl de tampon phosphate salin (PBS) 2 % SVF pour le marquage TTCF ou dans 50 µl d'anticorps pour le phénotypage des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

## **Marquage avec le TTCF**

Les oligomères de TTCF sont préparés extemporanément en incubant dans un tube à PCR sous agitation pour 90 minutes 7 µg de streptavidine PE premium grade (Molecular Probe, Carlsbad, CA) avec le TTCF biotinylé purifié précédemment à un ratio de 1:2. On complète ensuite le volume à 100 µl avec du PBS et on centrifuge 10 minutes à 14 000 g pour éliminer les agrégats. Le marquage des CMSP se fait dans les tubes de polycarbonate de 3 ml avec 0,125 µg/ml de TTCF oligomérisé durant 60 minutes, dans l'obscurité, à 4°C et sous agitation légère. Les cellules ont été ensuite comarquées avec les anticorps (Tableau 2) pendant 60 minutes, dans l'obscurité, à 4°C et sous agitation légère. On lave les CMSP deux fois dans 3 ml de PBS 5% v/v SVF et on resuspend le culot dans 400 µl de PBS. Les cellules ont été acquises avec un cytomètre LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Pour le marquage TTCF, on marque entre 2 et 5 x 10<sup>6</sup> CMSP selon les échantillons disponibles.

## **Phénotypage des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Les CMSP sont incubées dans des microtubes avec 50 µl du mélange d'anticorps (Tableau 3) à 4°C dans l'obscurité pour 30 min. On lave les CMSP deux fois dans 1 ml de PBS 5% v/v SVF et on resuspend le culot dans 400 µl de PBS. Les CMPS marquées sont transférées dans des tubes de polypropylène pour la cytométrie et acquises à l'aide du cytomètre LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Pour le phénotypage des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, on marque environ 1 x 10<sup>6</sup> CMSP.

**Tableau 2 :** Spécification des complexes anticorps-fluorochromes utilisés pour le phénotypage des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> et l'analyse de la réponse TTCF-spécifique.

Anticorps	Clone	Fluorochrome	Concentration utilisée	Laser	Longueur d'émission	Detecteur LSR	Compagnie / produit
CD3	UCHT1	PerCp	1/50				BioLegend / 300428
CD16	3G8	PerCP	1/50	488 nm - bleu	695	B	BioLegend / 302030
CD14	MφP9	PerCP	1/50				BD Pharmigen / 340585
CD10	HI10a	AF700	1/50	640nm - rouge	719	B	BD Pharmigen / 563509
CD20	2H7	APC-H7	1/50	640 nm - rouge	785	A	BD Pharmigen / 560853
CD27	M-T271	FITC	1/5	488 nm - bleu	520	E	BD Pharmigen / 560986
IgM	G20-127	APC	1/10	640 nm - rouge	660	C	BD Pharmigen / 551062
CD21	B-ly4	PE-Cy7	1/25	488 nm - bleu	785	A	BD Pharmigen / 561374
CD19	HIB19	BV421	1/20	405 nm - violet	448	C	BD Pharmigen / 562441
SA-TTCF	---	PE	0,125 ug / ml	488 nm - bleu	578	D	SA : Molecular Probe / S-21388

**Tableau 3 :** Spécification des complexes anticorps-fluorochromes utilisés pour le phénotypage des lymphocytes T.

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Concentration utilisée</b>	<b>Laser</b>	<b>Longueur d'émission</b>	<b>Détecteur LSR</b>	<b>Compagnie / produit</b>
CD3	UCHT1	AF700	1/10	640 nm - rouge	719	B	BD Pharmigen / 561027
CD4	RPA-T4	APC-H7	1/10	640 nm - rouge	785	A	BD Pharmigen / 560251
CD8	RPA-T8	V450	1/25	405 nm - violet	448	C	BD Pharmigen / 560347
CD45RA	HI100	FITC	1/25	488 nm - bleu	520	E	BD Pharmigen / 555488
CCR7	3D12	PE-Cy7	1/10	488 nm - bleu	785	A	BD Pharmigen / 560922

## **Analyse des données**

Les données de cytométrie en flux ont été visualisées et analysées avec le logiciel FACSDiva 8.0 (BD Biosciences, San Jose, CA). Afin de s'assurer du positionnement des cadrans dans les cytogrammes, on a fait un contrôle « FMO » (« *fluorescence minus one* »), c'est-à-dire qu'on marque les cellules contrôles selon les protocoles mentionnés précédemment, mais en excluant à tour de rôle un fluorochrome dans chacun des mélanges d'anticorps.

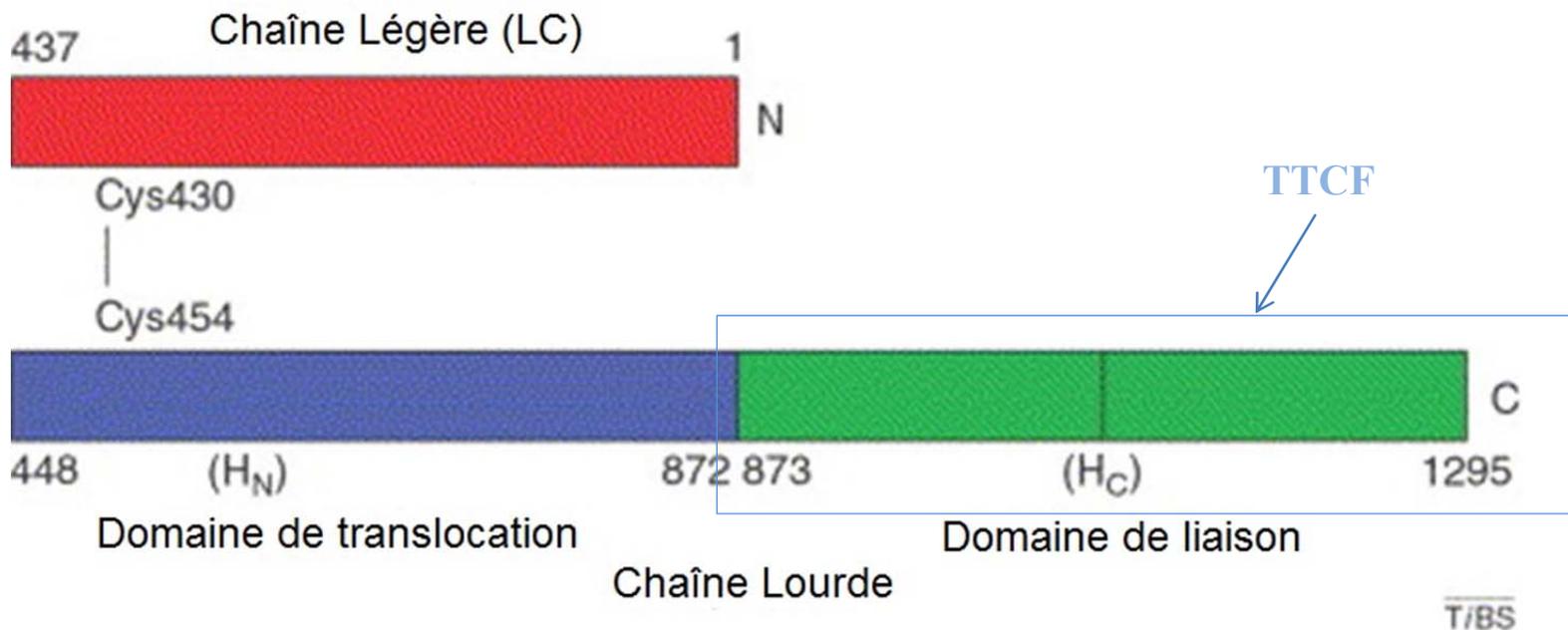
Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les tests Student ou Wilcoxon-Mann-Whitney ont été utilisés selon les résultats à l'analyse de normalité de la distribution avec le test D'Agostino-Pearson.

## Chapitre 3 : Résultats

### Production d'oligomères de TTCF

Pour analyser la réponse antigène spécifique des CD19<sup>+</sup>, nous avons utilisé le fragment C terminal du toxoïde tétanique (TTCF) (Fig. 9). Le TTCF est le fragment C terminal du toxoïde tétanique (TeNT), une neurotoxine produite par *Clostridium tetani* et agent causal du tétanos, une infection potentiellement fatale caractérisée par des contractions musculaires douloureuses et incontrôlables<sup>147</sup>. La TeTN fait partie de la famille des neurotoxines clostridiennes (Fig. 9) qui sont composées de deux chaînes, une légère (L) et une lourde (H), reliée par un pont disulfure. La chaîne L est la partie neurotoxique possédant une activité métalloprotéase au zinc qui, via son action, provoque les spasmes tétaniques. La chaîne H se compose de deux fragments non toxiques : le N-terminal (HN) et le C-terminal (HC). Le HN est un facilitateur de translocation de la chaîne L, alors que le fragment HC, d'environ 50 kDa, est nécessaire pour la liaison neuronale et le transport rétrograde<sup>148</sup>. Lors de la vaccination avec l'anatoxine tétanique, la majorité de la réponse immunitaire est générée contre le fragment HC<sup>148</sup>. C'est donc ce dernier qu'on a utilisé pour la préparation des oligomères de TTCF afin de mesurer la réponse antigène-spécifique des enfants ENI au vaccin du tétanos.

Afin d'oligomériser le TTCF, ce dernier doit être biotinylé. Nous avons d'abord tenté la biotinylation *in vitro* à l'aide de la biotine ligase BirA (Avidity), mais cette technique nécessitait des changements de tampon qui affectaient le TTCF en le précipitant. Puisque le taux de récupération était près de 2 %, nous avons tenté une nouvelle approche de biotinylation *in vivo* telle que décrite par Leisner *et al.*<sup>149</sup>. Cette technique consiste principalement en une cotransformation avec un premier plasmide contenant la protéine d'intérêt à biotinyler (TTCF) et un second codant pour l'enzyme biotine ligase (BirA). La sélection des bactéries ayant acquis les deux plasmides se fait en s'assurant que chaque plasmide ait un gène de sélection différent, dans notre cas : résistance à l'ampicilline et résistance à la kanamycine. Puisque nos deux plasmides (pET15b-TTCF et pET21a-BirA) possèdent le gène de résistance à l'ampicilline, nous avons transféré le gène BirA contenu dans le plasmide pET21a-BirA vers le plasmide pET41(a)+ contenant le gène de résistance à la kanamycine (Fig. 10).



**Fig. 9** : Schéma de la structure des neurotoxines clostridiennes

Les neurotoxines clostridiennes (NTC) sont des protéines d'environ 150 kDa, synthétisées sous forme de polypeptides à chaîne unique et post-traductionnellement clivées en molécules bi-chaîne. Les chaînes légère et lourde des NTC sont liées par un pont disulfure unique. La chaîne légère (LC), affichée en rouge, possède une fonction endopeptidase dépendante du zinc et contient l'atome de zinc catalytique et un motif HExxH associé aux protéases zinc-dépendante. La chaîne lourde comprend deux domaines fonctionnels de taille à peu près égale. La section N-terminal (HN), en bleu, est le domaine de translocation impliqué dans la translocation et l'activation de la LC. La section C-terminal (HC), en vert, est le domaine de liaison ici nommé TTCF.<sup>148</sup> Reprinted from *Trends Biochem Sci*, Vol. 27, Turton, K., Chaddock, J.A. & Acharya, K.R., Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility, Pages No. 552-8, Copyright (2002), with permission from Elsevier

Lors du premier essai, le gène BirA a été transféré dans le vecteur pET41(a)+ natif en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et HindIII. Le vecteur pET41(a)+ comprend une étiquette GST (445 – 1 095). Nous pensions pouvoir tirer profit de cette caractéristique pour récupérer les deux protéines en purifiant la BirA sur une colonne d'affinité de glutathion et le TTCF muni d'une étiquette polyhistidine sur une colonne d'affinité NiNTA. Par contre, nous nous sommes rendu compte, lors des contrôles de purification sur SDS-page, que beaucoup de BirA n'était pas retenu dans la colonne de glutathion et se retrouvait dans l'élution de la colonne NiNTA avec notre TTCF. En analysant à nouveau le vecteur construit, nous nous sommes rendu compte qu'il y avait dans le vecteur pET41(a)+ natif une étiquette polyhistidine (397 – 414) et que ce dernier se retrouvait entre la GST et BirA; résultant en la rétention de la BirA résiduelle dans la colonne d'affinité avec le TTCF.

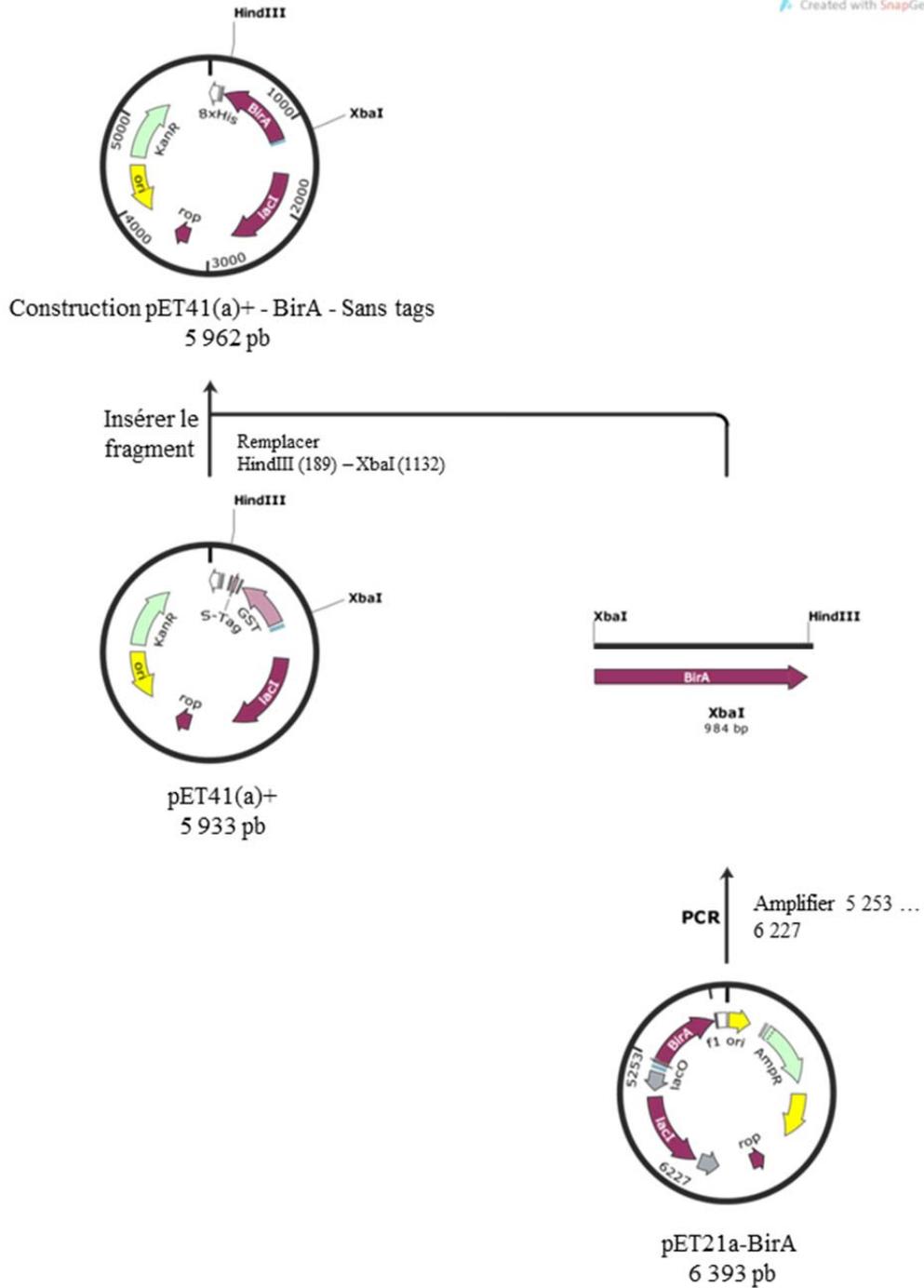
Pour pallier ce problème, le vecteur a été reconstruit, cette fois en excluant les étiquettes GST et polyhistidine (Fig. 10). Pour y arriver, nous avons conçu des amorces personnalisées à l'aide du logiciel SnapGene (GSL Biotech LLC, Chicago, Illinois). L'amorce sens (5' – TCT AGA ATG AAG GAT AAC ACC GTG CCA CTG – 3') lie les nucléotides 1 137 à 1 166 du plasmide pET21a-BirA et permet l'insertion d'un site de clivage spécifique à l'enzyme de restriction XbaI (TCTAGA); alors que l'amorce anti-sens (5' – GGC CGC AAG CTT TTA TTT TTC TGC ACT ACG CAG – 3') lie la section du plasmide pET21a-BirA (183 – 215) contenant le site de clivage spécifique à l'enzyme HindIII (189) et permet l'insertion d'un codon stop (TTA) entre le gène BirA (195-1160) et l' étiquette polyhistidine (150-173) contenue dans le plasmide. Le produit de PCR contenant BirA a ensuite été digéré avec XbaI et HindIII afin de permettre son insertion dans le plasmide pET41(a)+ préalablement clivé (avec XbaI [1132] et HindIII [189]) et purifié sur gel (Fig. 11).

On peut voir sur le gel que le plasmide a bel et bien été digéré par l'absence des formes enroulée et super enroulée. La bande de 5 kb correspondant au plasmide a été découpée et purifiée. La bande de plus faible poids moléculaire correspond au fragment contenant l'étiquette polyhistidine et GST qu'on souhaite exclure. On peut de plus constater que la PCR a bien fonctionné puisque la bande d'amplification est bel et bien à 1 kb, ce qui correspond à la longueur du gène BirA qu'on souhaitait amplifier. Cette bande a également été purifiée

avant de procéder à la ligation. Une fois notre nouveau plasmide séquencé, amplifié et purifié, nous avons dû optimiser la quantité d'IPTG, la durée et la température de l'induction. Initialement, nous avons contrôlé quatre conditions : 500  $\mu$ M IPTG – 25 °C; 500  $\mu$ M IPTG – 37 °C, 1 mM IPTG – 25 °C et 1 mM IPTG – 37 °C (Fig. 12)

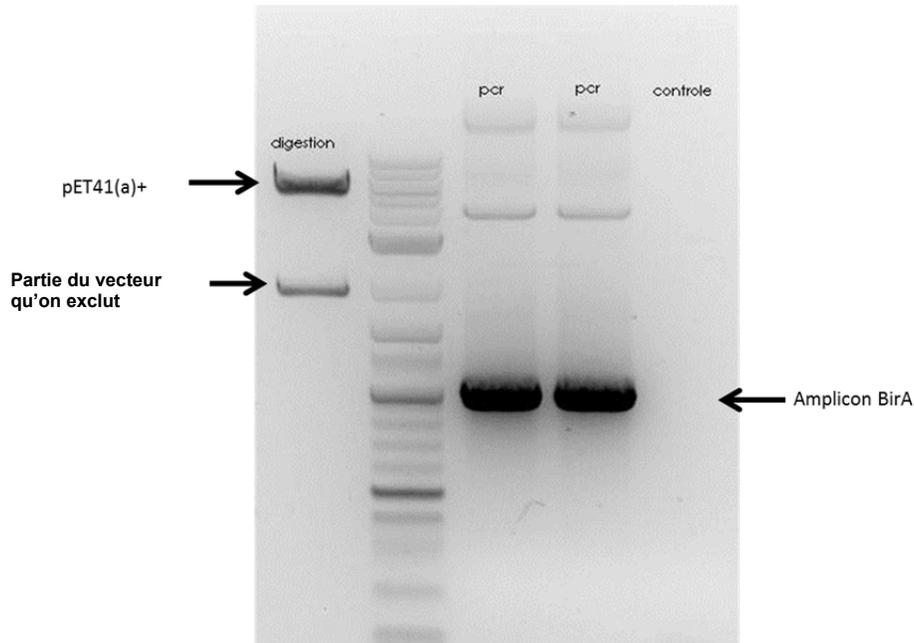
Pour que la biotinylation ait lieu *in vivo*, nous devons ajouter de la biotine durant l'induction. Aussi, puisqu'il y avait maintenant deux vecteurs à induire, nous avons recontrôlé la quantité d'IPTG et le temps nécessaire pour obtenir une bonne induction : 1 mM IPTG – 37 °C; 1,5 mM IPTG – 37 °C, 2 mM IPTG – 37 °C et en ajoutant la biotine (Fig. 13). Pour des raisons pratiques, nous avons sélectionné l'incubation de 6 heures avec 1 mM d'IPTG. Une fois la production complétée, les bactéries ont été lysées et la protéine a été récupérée à l'aide d'une colonne d'affinité NiNTA. Pour s'assurer que la protéine purifiée était la bonne et qu'il n'y avait pas de contamination, on a procédé à un gel SDS-PAGE (Fig. 14). On a perdu un peu de la protéine d'intérêt lors des étapes de chargement et de lavage, mais on est tout de même arrivé à obtenir une bonne élution, concentrée et pure.

L'efficacité de la biotinylation *in vivo* a été contrôlée par un retard sur gel (Fig. 15). Nous avons incubé le TTCF biotinylé avec de la SA à différents ratios. La SA (60 kDa) lie le TTCF biotinylé (52 kDa) et décale la bande à environ 110 kDa si un TTCF se lie, 160 kDa si 2 TTCF se lient, 210 kDa si 3 TTCF se lient, et 260 kDa si 4 TTCF se lient. Le premier ratio représente un excès de SA qui permet la liaison de tout le TTCF biotinylé. Une biotinylation efficace se traduirait par un déplacement complet de la bande de TTCF, alors qu'une biotinylation inefficace entrainerait une bande de TTCF résiduelle à 52 kDa. Les ratios subséquents illustrent une augmentation graduelle de la quantité de TTCF jusqu'à l'excès. Cela favorise la formation d'oligomères avec plusieurs TTCF sur une même SA, tout en révélant le ratio où il y a le moins de TTCF résiduels. L'obtention d'oligomères est importante, car ceux-ci se lient avec plus d'avidité au BCR lors du marquage. D'un autre côté, les monomères de TTCF non lié pourraient se lier au BCR et prendre la place d'un oligomère. Lors de l'utilisation du TTCF pour l'analyse de la réponse immunitaire, cette situation serait regrettable, car la liaison des oligomères couplés à la SA est ce qui nous permet de détecter la réponse antigène spécifique. Suivant cette logique, nous avons choisi le ratio 1 : 2.

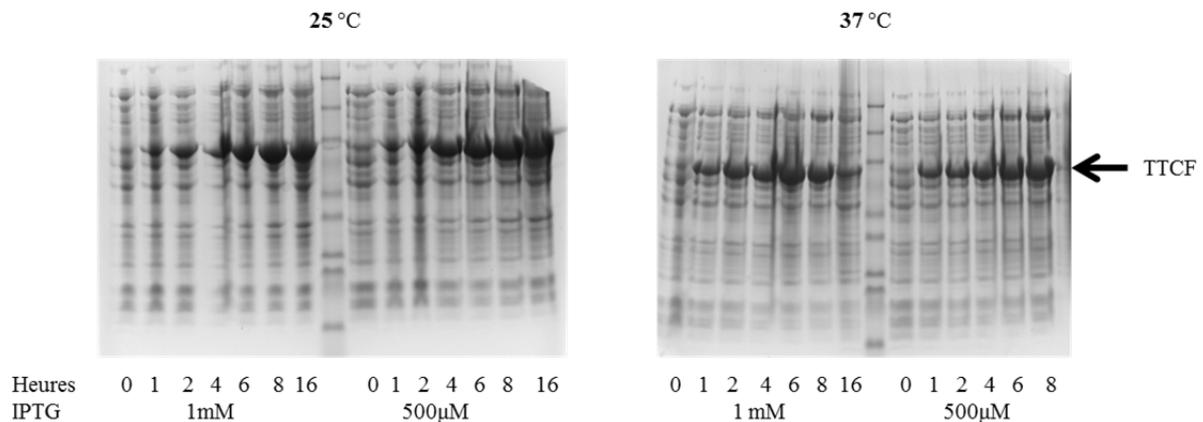


**Fig. 10 :** Construction du plasmide pET41-BirA.

Le gène BirA a été amplifié à l'aide d'amorces permettant l'insertion d'un site de clivage XbaI et l'insertion d'un codon-stop avant l'étiquette polyhistidine. Le produit de PCR digéré avec XbaI et HindIII a été inséré dans le plasmide pET41(a)+ préalablement clivé avec XbaI (1132) et HindIII (189).

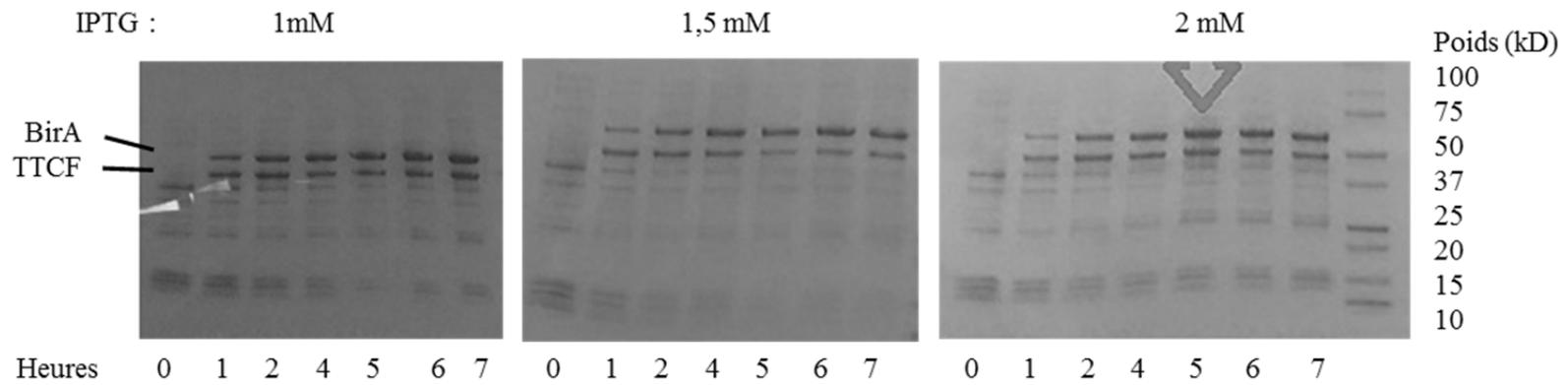


**Fig. 11 :** Électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplification par PCR de BirA et de la digestion du plasmide pET41 (a)+. Amplification du gène BirA (984 pb) à partir du vecteur pET21-BirA et digestion (XbaI et HindIII) du plasmide pET41(a)+ en section plasmide qui recevra le gène BirA (bande 5 kb) et section à exclure contenant les étiquettes polyhistidine et GST.



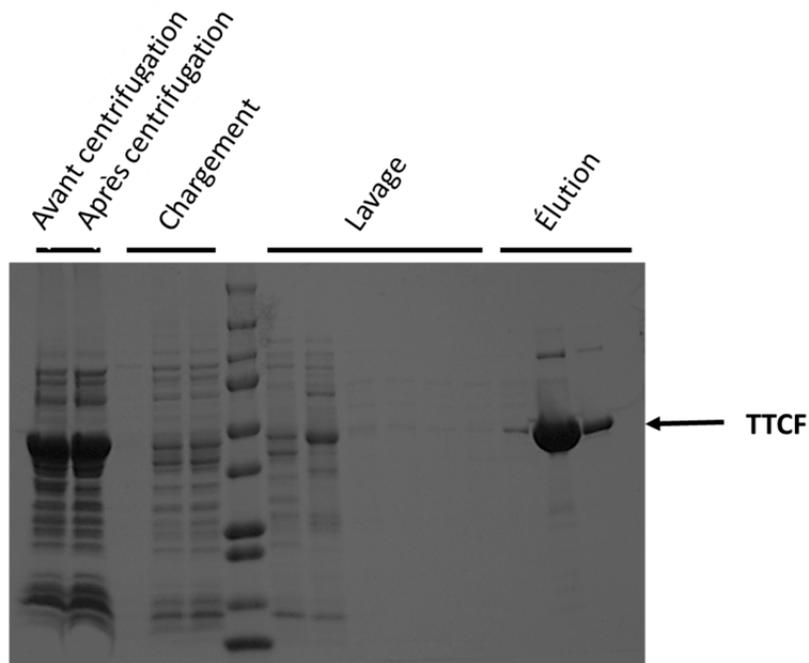
**Fig. 12 :** Optimisation initiale de l'induction du TTCF.

L'induction du TTCF (52 kDa) a été contrôlée sous quatre conditions : 500 μM IPTG – 25 °C; 500 μM IPTG — 37 °C, 1 mM IPTG – 25 °C et 1 mM IPTG – 37 °C.

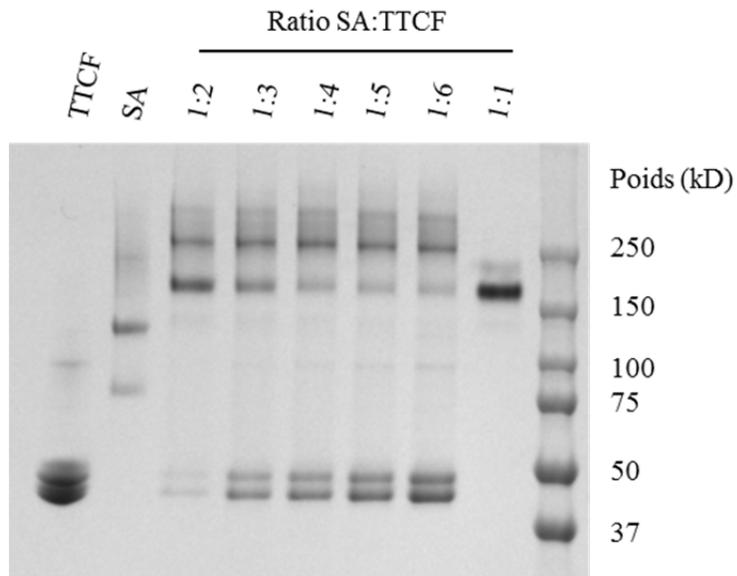


**Fig. 13 :** Optimisation de l'induction du TTCF et de la biotine ligase BirA.

Contrôle de l'induction du TTCF et de la biotine ligase BirA (biotinylation *in vivo*) avec différentes concentrations d'IPTG : 1 mM IPTG – 37 °C; 1,5 mM IPTG - 37 °C, 2 mM IPTG – 37 °C et en ajoutant la biotine [100 mg/L].



**Fig. 14 :** SDS-PAGE contrôlant la purification du TTCF par chromatographie sur colonne d'affinité NiNTA.



**Fig. 15 :** Essai de biotinylation par retard sur gel.

La streptavidine (60 kDa) lie le TTCF biotinylé (52 kDa) pour former des oligomères : 1SA:1TTCF = 110 kDa, 1SA:2TTCF = 160 kDa, 1SA:3TTCF = 210 kDa et 1SA:4TTCF = 260 kDa. Le ratio idéal permet l'obtention d'oligomères avec un minimum de TTCF résiduel.

## **Analyses par cytométrie en flux**

Les analyses des sous-populations ont été faites sur les échantillons obtenus de sang de cordon ombilical et de sang veineux à 6 mois et 12 mois. Il est important de noter que le nombre d'enfants recrutés est supérieur au nombre d'échantillons traités, car des complications peuvent survenir lors de l'obtention des prélèvements (incapacité à prélever, accouchement difficile, appel de la salle d'accouchement non reçu, etc.). De plus, puisqu'il s'agit d'une étude prospective, le nombre d'enfants diminue avec l'avancement des temps d'échantillonnage. Tous les prélèvements recueillis avant le 1er novembre 2015 ont été traités.

En l'absence de contrôles entièrement adéquats (i.e. enfants NE), qui seront recrutés dans une phase ultérieure de l'étude, nous avons stratifié les enfants en groupes afin de les comparer entre eux. Nous avons utilisé plusieurs paramètres maternels, tels les classes de traitement reçu (données non montrées), le compte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (< 200 CD4/ml, ≥ 200 — < 500 CD4/ml, ≥ 500 CD4/ml) à la naissance (données non montrées), ou le décompte plus bas durant la grossesse; la charge virale la plus élevée durant la grossesse à savoir indétectable (< 40 copies d'ARN/ml) vs détectable (≥ 40 copies d'ARN/ml). C'est cette dernière stratification qui s'est révélée la plus intéressante. Pour être classés dans le groupe « indétectable » (< 40 copies d'ARN/ml), les enfants devaient être nés d'une mère ayant obtenu une charge virale inférieure à 40 lors de **toutes** leurs visites de suivi de grossesse au CMIS. Les enfants nés de mères chez lesquelles nous avons détecté ne serait-ce qu'une seule charge virale supérieure à 40 en grossesse ont été placés dans le groupe ≥ 40.

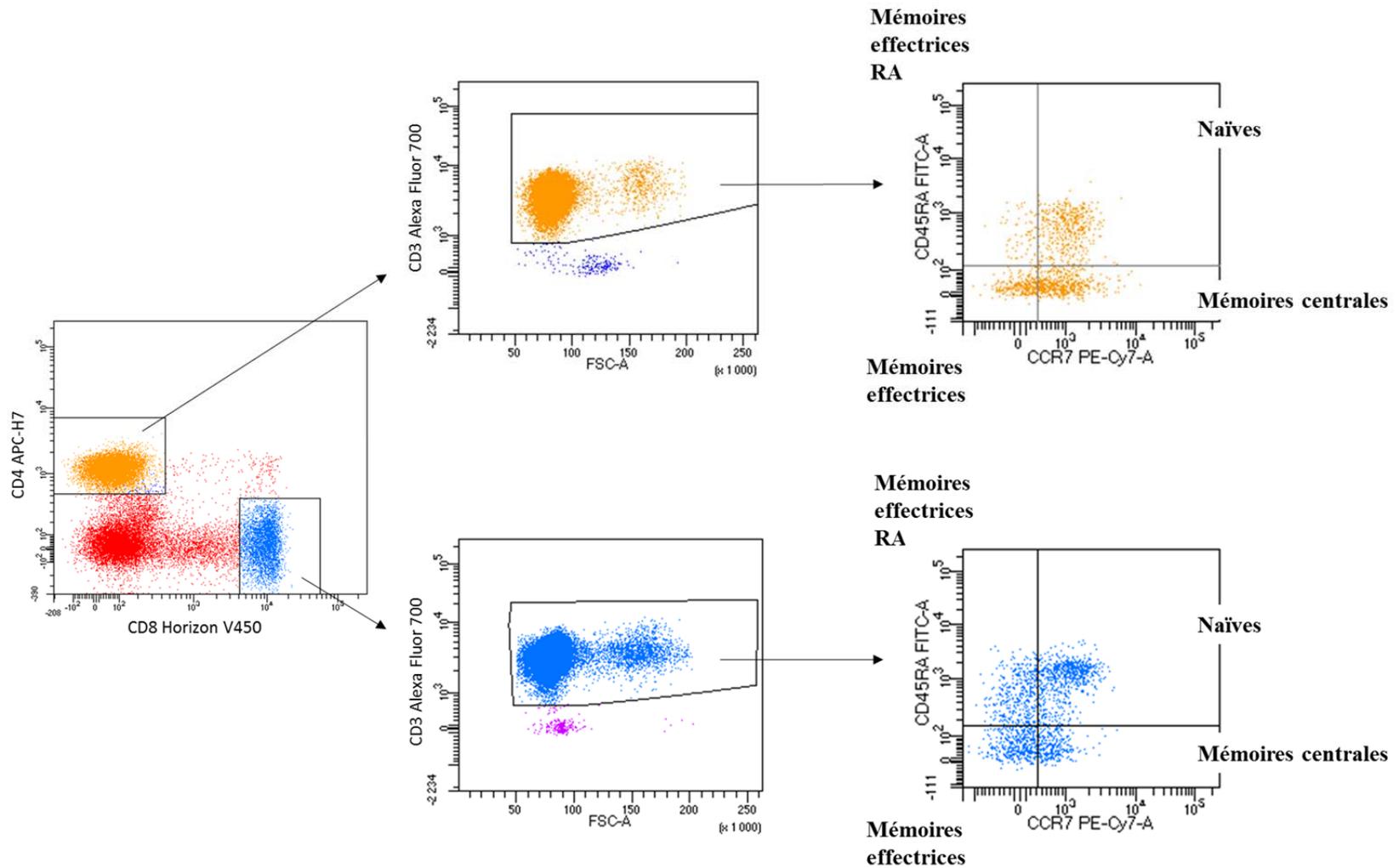
## **Analyse phénotypique des lymphocytes T**

Le phénotypage des lymphocytes T a été fait de façon à obtenir un portrait global des populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les marqueurs utilisés pour définir les sous-populations naïve, mémoire, effectrice et effectrice-mémoire ont été bien décrits dans la littérature (CD45RA et CCR7) (Tableau 4 & Fig. 16).

Le positionnement des cadrans dans les cytogrammes a été validé à l'aide de contrôles « FMO » « fluorescence minus one » (Fig. 17).

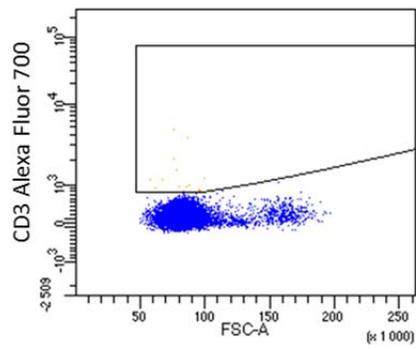
**Tableau 4 :** Phénotypes des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et lymphocytes T CD8<sup>++</sup> selon les marqueurs CD45RA et CCR7.

Lymphocyte	Sous-populations	CCR7	CD45RA
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Naïf	+	+
	Centrale mémoire	+	-
	Effecteur mémoire	-	-
	Effecteur mémoire RA	-	+
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Naïf	+	+
	Centrale mémoire	+	-
	Effecteur mémoire	-	-
	Effecteur mémoire RA	-	+

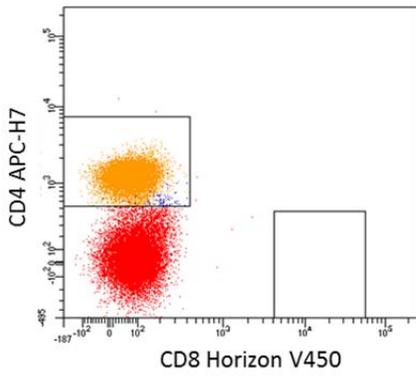


**Fig. 16 :** Stratégie de sélection des sous-populations de lymphocytes T.

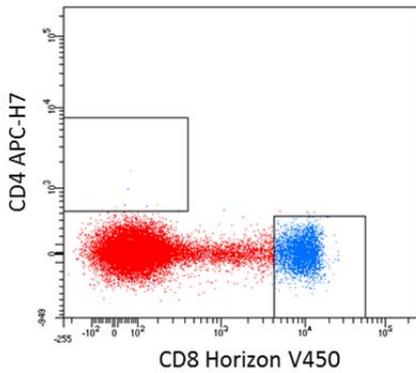
Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> sont subdivisés en naïfs (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), mémoire centrale (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>), effecteur mémoire (CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) et effecteur mémoire RA (CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>).



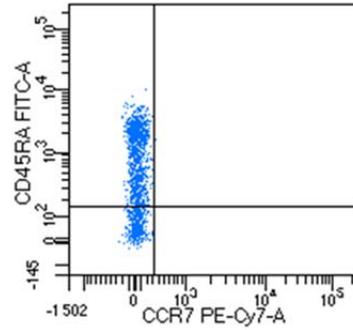
**FMO  
Alexa  
Fluor 700**



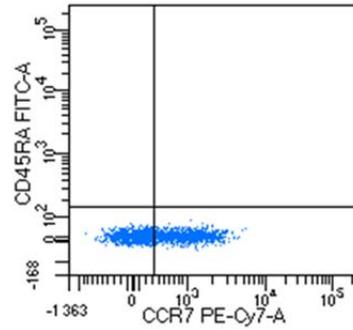
**FMO  
Horizon  
V450**



**FMO  
APC-H7**



**FMO  
PE-Cy7**



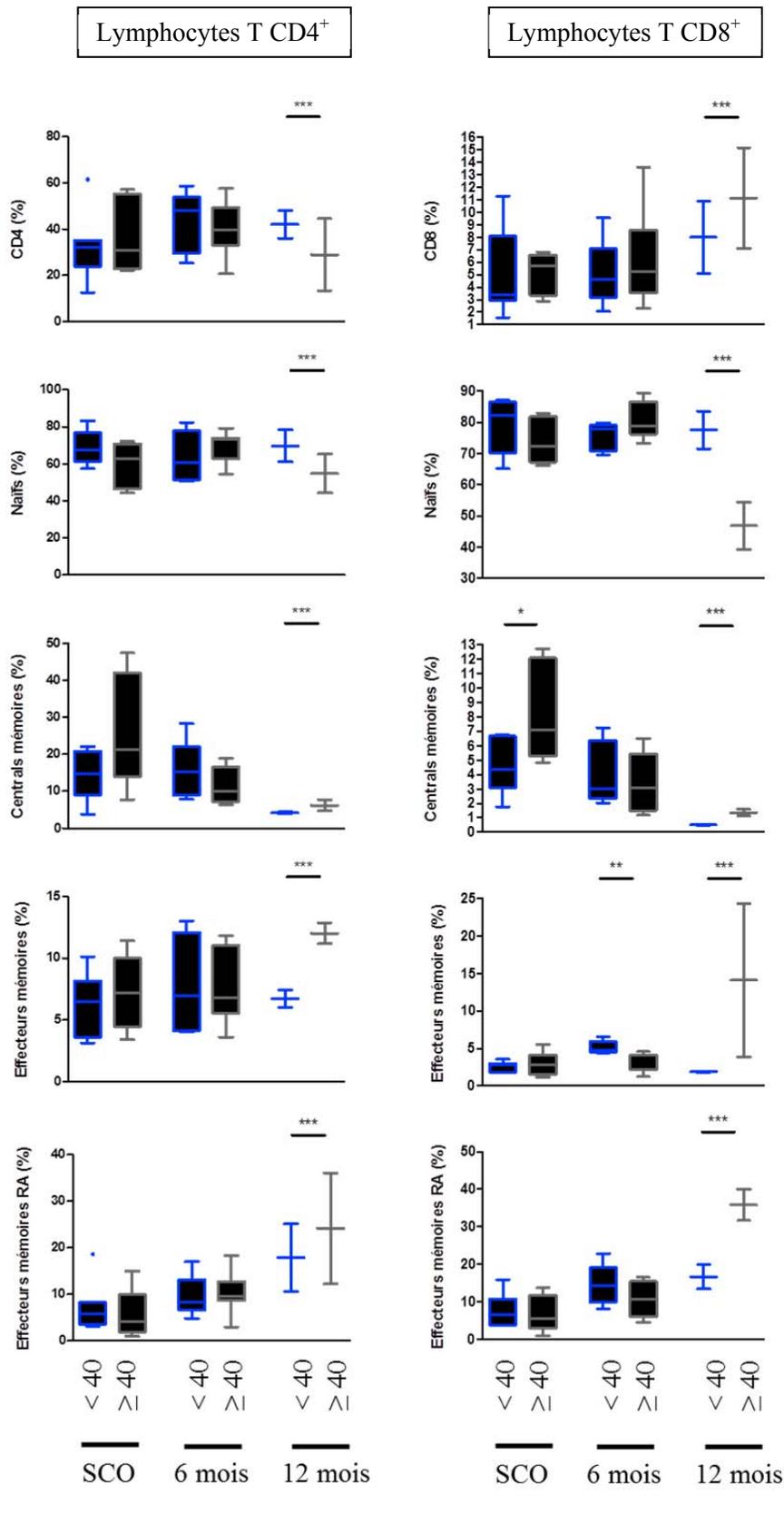
**FMO  
FITC**

**Fig. 17 :** Contrôle FMO « fluorescent minus one » du marquage des lymphocytes T.

En ce qui concerne les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les deux groupes d'ENI (< 40 copies/ml vs ≥ 40 copies/ml chez la mère) à la naissance (SCO) et à 6 mois de vie (Fig. 18). Par contre, à 12 mois, les ENI nés de mères avec une charge virale détectable avaient significativement moins de CD4 totaux en termes de fréquence (< 40 : 42,04 ± 8,429 %; ≥ 40 : 28,97 ± 22,01 %, p = < 0,0001). Lors du phénotypage de cette population, on a pu observer une différence hautement significative (p = < 0,0001) de la fréquence des CD4 naïfs (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>) chez les ENI nés de mères avec une charge virale détectable (< 40 : 69,67 ± 12,26 %; ≥ 40 : 54,72 ± 14,84 %). Quant aux sous-populations centrales mémoires (CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>), effectrices mémoires (CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) et effectrices mémoires RA (CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>), des fréquences significativement plus élevées (p = < 0,0001) ont été observées (< 40 : 4,120 ± 0,3111 %; ≥ 40 : 6,175 ± 2,114 %; < 40 : 6,710 ± 0,9899 %; ≥ 40 : 12,03 ± 1,195 %; < 40 : 17,86 ± 10,25 %; ≥ 40 : 24,16 ± 16,88 %) (Fig. 18).

En ce qui concerne les CD8, une fréquence significativement plus élevée (p = 0,0256) des centrales mémoires a été observée dans le sang de cordon chez les ENI nés de mères avec une charge virale détectable (< 40 : 4,469 ± 1,852 %; ≥ 40 : 8,178 ± 3,493 %). À 6 mois, on a observé une fréquence inférieure (p = 0,0025) des effectrices mémoires (< 40 : 5,140 ± 0,8635 %; ≥ 40 : 3,433 ± 1,252 %). Alors qu'à 12 mois, on observe une fréquence beaucoup plus élevée (p = < 0,0001) de CD8 totaux (< 40 : 7,990 ± 4,087 %; ≥ 40 : 11,13 ± 5,720 %); à l'intérieur desquels, les sous-populations centrales mémoires (CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>), effectrices mémoires (CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) et effectrices mémoires RA (CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>) étaient significativement plus élevées (< 40 : 0,49 ± 0,07071 %; ≥ 40 : 1,350 ± 0,3394 %; < 40 : 1,855 ± 0,1061 %; ≥ 40 : 14,12 ± 14,50 %; < 40 : 16,64 ± 4,646 %; ≥ 40 : 35,83 ± 5,869 %; p = < 0,0001). La sous-population naïve était alors significativement moins représentée chez les ENI nés de mères avec une virémie détectable durant la grossesse (< 40 : 77,56 ± 8,464 %; ≥ 40 : 46,89 ± 10,76 %, p = < 0,0001) (Fig. 18).

Il est important d'observer qu'à 12 mois d'âge, l'accumulation des CD8 effecteurs mémoires et effecteurs mémoires RA est beaucoup plus importante chez les ENI nés de mères avec une charge virale détectable.



**Fig. 18 :** Fréquences des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.

SCO : Sang de cordon ombilical < 40 : Charge virale maternelle inférieure à 40 copies/ml lors de tous les contrôles durant la grossesse.  $\geq 40$  : Charge virale maternelle supérieure à 40 copies/ml lors d'au moins un contrôle durant la grossesse.

Les valeurs numériques et la taille des échantillons (n) sont disponibles dans l'Annexe 1.

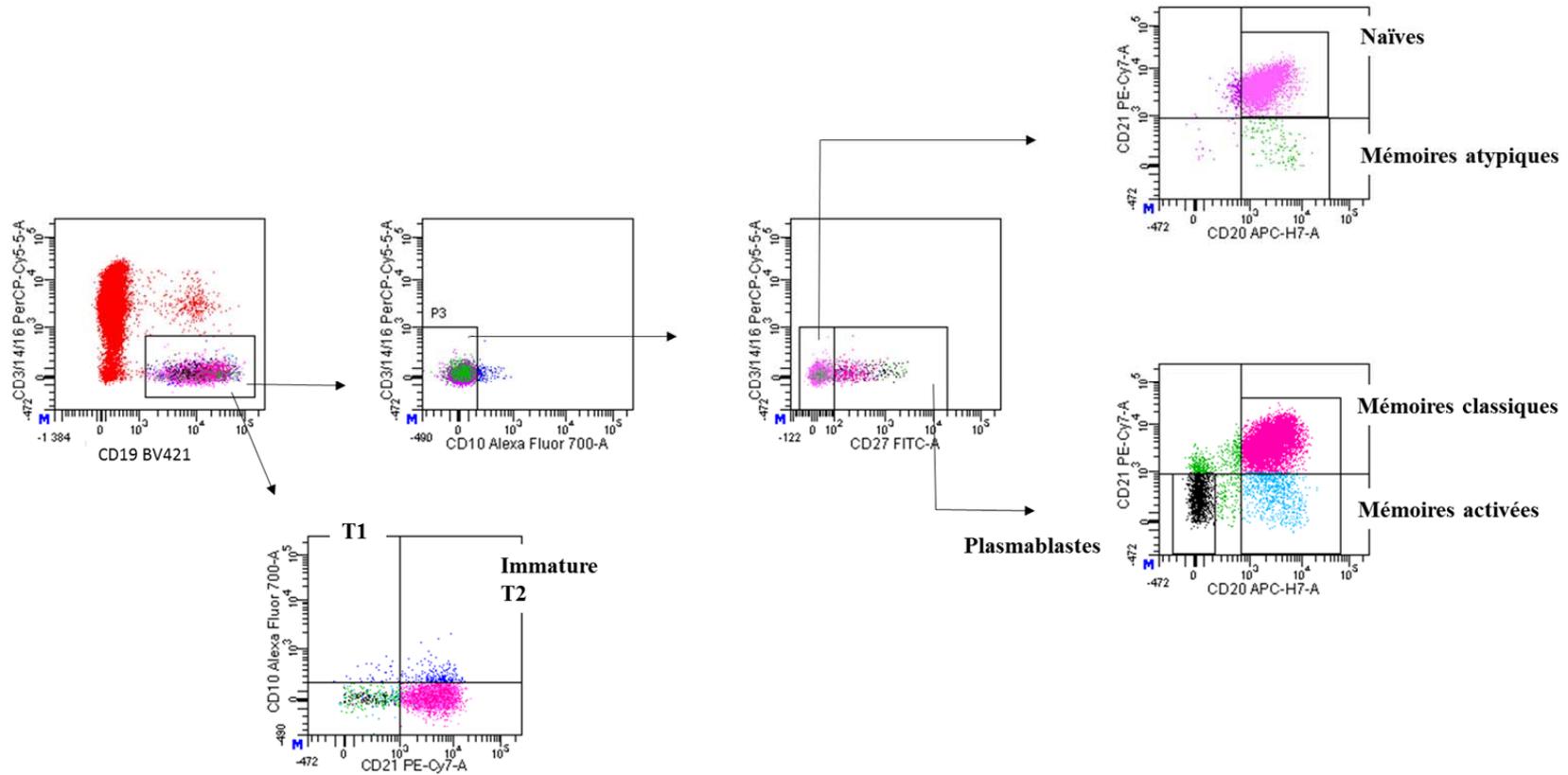
\* : Significatif ( $\leq 0,05$ )  
 \*\* : Très significatif ( $\leq 0,005$ )  
 \*\*\* : Hautement significatif ( $\leq 0,0005$ )

## Analyses phénotypiques des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>

L'analyse phénotypique (Fig. 19) des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> a été faite de façon à obtenir un portrait plus complet des sous-populations (Tableau 5) et pour permettre l'analyse de la réponse spécifique au vaccin du tétanos à l'aide d'oligomères de TTCF. Tout comme pour le phénotypage des lymphocytes T, le positionnement des cadrans a été validé à l'aide d'une stratégie FMO (Fig. 20). Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> ont été sélectionnés en excluant les marqueurs de lymphocytes T (CD3) et des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, les neutrophiles et les monocytes (CD14, CD16). Le marqueur CD10 a été utilisé pour identifier les cellules immatures, de concert avec le marqueur de maturation CD21 (T1 : CD10<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup> et T2 : CD10<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup>). Les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> matures perdent l'expression de CD10. Nous avons ensuite utilisé les marqueurs d'activation CD27, de maturation CD21 et de différenciation CD20 afin d'identifier les sous-populations naïves (CD27<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>), mémoires atypiques (CD27<sup>-</sup>/CD21<sup>-</sup>/CD20<sup>+</sup>), mémoires classiques (CD27<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>), mémoires activées (CD27<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>/CD20<sup>+</sup>) et plasmablastes (CD27<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>/CD20<sup>-</sup>). Dans le SCO des enfants ENI nés de mères avec une charge virale détectable, nous avons trouvé une fréquence significativement plus faible ( $p = 0,0410$ ) de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> totaux ( $< 40 : 14,72 \pm 7,745 \% ; \geq 40 : 9,017 \pm 5,300 \%$ ) par rapport aux enfants ENI nés de mères avec une charge virale indétectable (Fig. 21). Ces enfants présentaient également une fréquence significativement plus élevée de plasmablastes ( $< 40 : 0,05375 \pm 0,02615 \% ; \geq 40 : 0,0850 \pm 0,04301 \% ; p = 0,0454$ ) et de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires classiques ( $< 40 : 4,474 \pm 2,267 \% ; \geq 40 : 7,577 \pm 2,561 \% ; p = 0,0081$ ). Nous avons également observé une fréquence plus élevée de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires activés ( $< 40 : 0,1750 \pm 0,03742 \% ; \geq 40 : 0,6320 \pm 1,224 \% ; p = 0,0596$ ) mais cette différence n'était pas statistiquement significative. À 6 mois d'âge, nous avons observé une fréquence plus élevée de lymphocytes B naïfs ( $< 40 : 57,63 \pm 16,77 \% ; \geq 40 : 69,11 \pm 7,066 \% ; p = 0,0371$ ). Alors qu'à 12 mois, nous avons observé une fréquence presque significativement plus élevée ( $p = 0,0571$ ) de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> totaux ( $< 40 : 17,11 \pm 2,267 \% ; \geq 40 : 27,50 \pm 7,743 \%$ ) chez les ENI nés de mères avec une virémie détectable. On a pu observer que l'évolution globale des deux groupes était très similaire et que la fréquence de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires atypiques diminuait avec le temps.

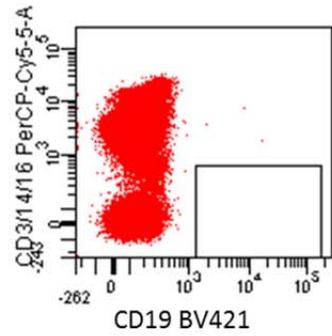
**Tableau 5 :** Phénotypes des sous-populations de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> selon les marqueurs CD10, CD27, CD20 et CD21.

Sous-populations	CD10	CD27	CD20	CD21
Naïve	-	-	+	+
Mémoire atypique	-	-	+	-
Mémoire classique	-	+	+	+
Mémoire activée	-	+	+	-
Plasmablaste	-	+	-	-
Immature T1	+	S.O.	S.O.	-
Immature T2	+	S.O.	S.O.	+

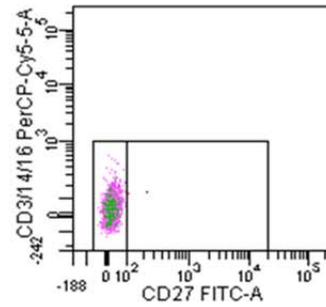


**Fig. 19** : Stratégie de sélection pour le phénotypage des populations de lymphocytes B  $CD19^+$ .

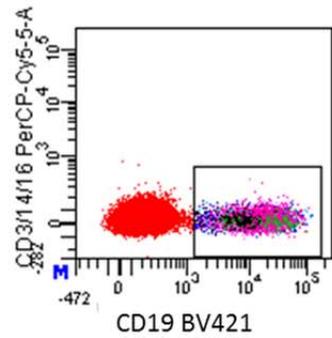
Les lymphocytes B  $CD19^+$  ont été sélectionnés en excluant les marqueurs de lymphocytes T (CD3) et des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, les neutrophiles et les monocytes (CD14, CD16). Le marqueur CD10 a été utilisé pour identifier les cellules immatures, avec le marqueur de maturation CD21 (T1 :  $CD10^+/CD21^-$  et T2 :  $CD10^+/CD21^+$ ). Les lymphocytes B  $CD19^+$  matures perdent l'expression de CD10. Les marqueurs d'activation CD27, de maturation CD21 et de différenciation CD20 ont été ensuite utilisés pour révéler les sous-populations naïves ( $CD27^-/CD21^+/CD20^+$ ), mémoires atypiques ( $CD27^-/CD21^-/CD20^+$ ), mémoires classiques ( $CD27^+/CD21^+/CD20^+$ ), mémoires activées ( $CD27^+/CD21^-/CD20^+$ ) et plasmablastes ( $CD27^+/CD21^-/CD20^-$ ).



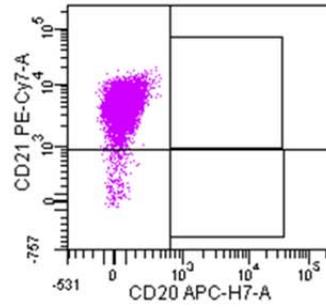
**FMO  
Brilliant  
violet 421**



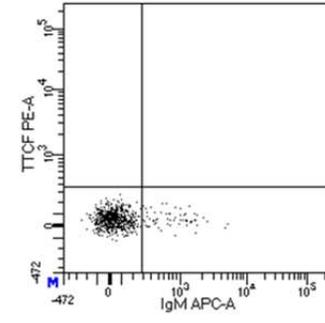
**FMO  
FITC**



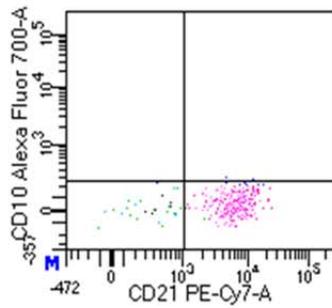
**FMO  
PerCP –  
Cy5,5**



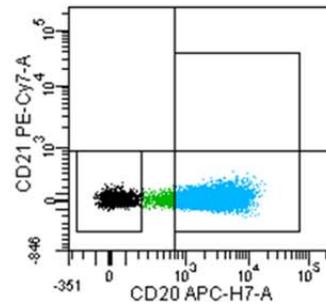
**FMO  
APC-H7**



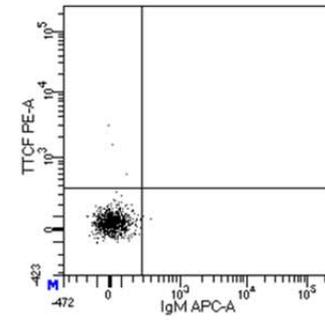
**FMO  
PE**



**FMO  
Alexa  
Fluor 700**

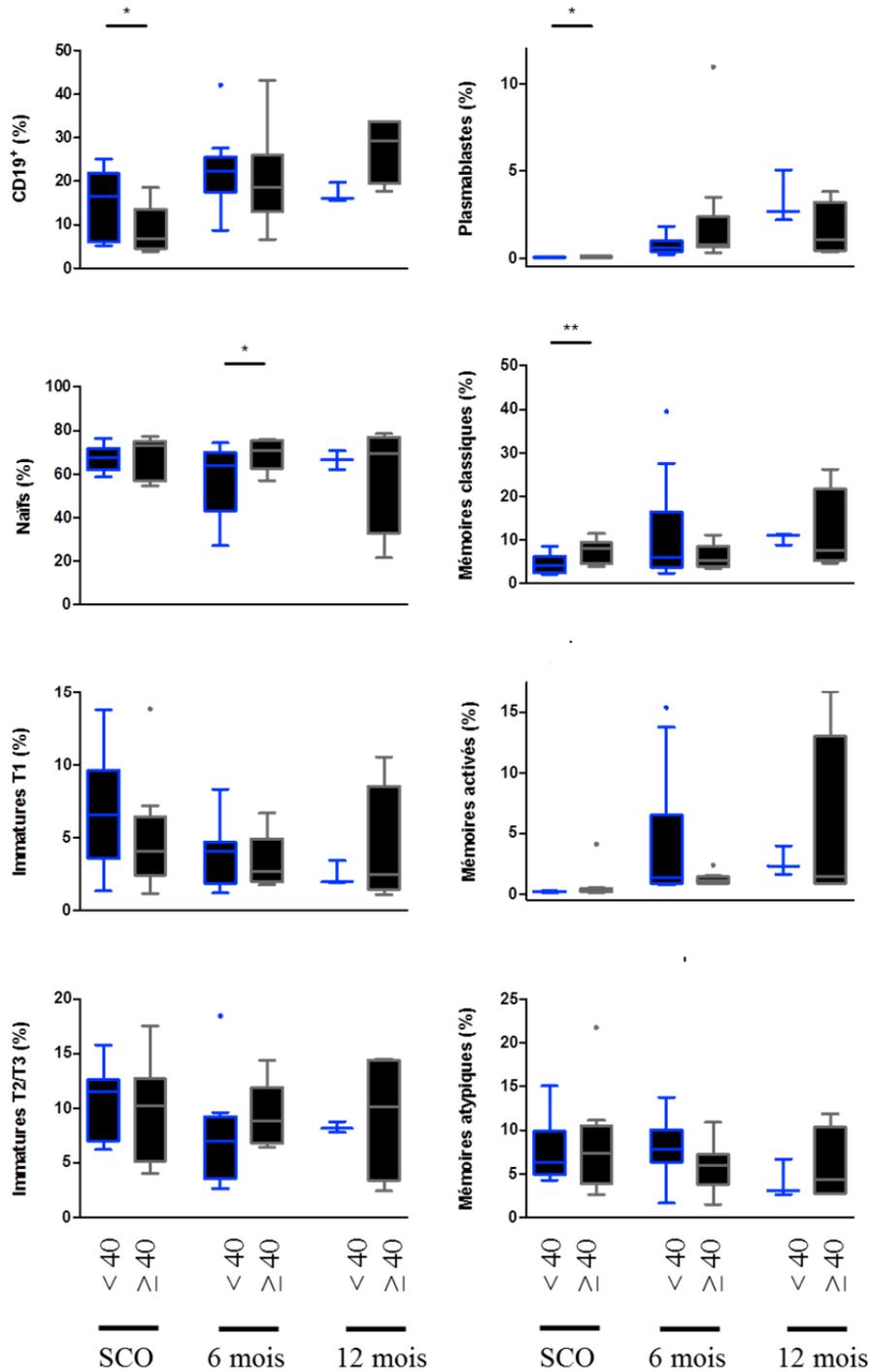


**FMO  
PE-Cy7**



**FMO  
APC**

**Fig. 20** : Contrôles FMO du marquage des lymphocytes B.



**Fig. 21** : Fréquences des sous-populations de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.

Les valeurs numériques et la taille des échantillons (n) sont disponibles dans l'Annexe 1. **SCO** : Sang de cordon ombilical  $< 40$  : Charge virale maternelle inférieure à 40 copies/ml lors de tous les contrôles durant la grossesse ;  $\ge 40$  : Charge virale maternelle supérieure à 40 copies/ml lors d'au moins un contrôle durant la grossesse. \* : Significatif ( $\leq 0,05$ ) ; \*\* : Très significatif ( $\leq 0,005$ )

## Analyses de la réponse antigène-spécifique

Pour l'analyse de la réponse antigène-spécifique, nous avons utilisé la stratégie de sélection des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> et avons généré pour chaque sous-population un nouveau cytogramme représentant la coloration IgM en fonction de l'oligomère de TTCF marqué à la streptavidine PE (SA-PE) (Fig. 22). Cela nous a permis d'évaluer la fréquence des lymphocytes spécifiques au TTCF dans chaque sous-population (Tableau 6).

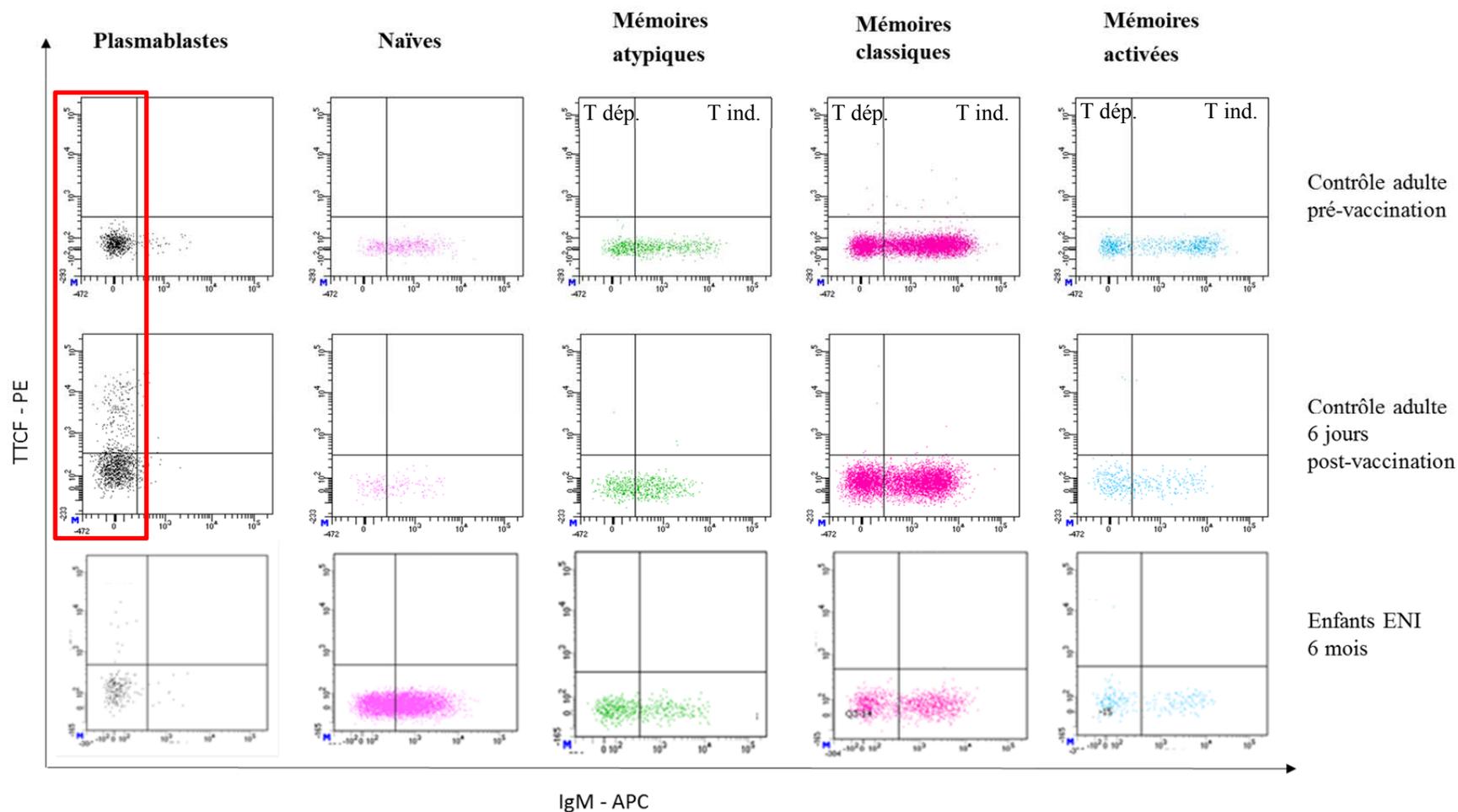
La spécificité des oligomères de TTCF a été validée à partir de prélèvements sanguins provenant de sujets adultes sains. Ces derniers ont été prélevés avant et 6 jours après un rappel vaccinal pour le tétanos. La protection pour le tétanos chez les adultes doit être renouvelée tous les 10 ans; nous avons donc choisi des adultes sains qui étaient sur le point de recevoir leur renouvellement. Cette procédure a permis l'observation des plasmablastes spécifiques au TTCF qui apparaissent 6 jours après la vaccination <sup>146</sup> (Fig. 22, encadré rouge). L'absence de plasmablastes avant la vaccination confirme que la liaison du TTCF est bien spécifique (Fig. 22, encadré rouge).

Le profil général de réponse au vaccin du tétanos détecté par le TTCF est semblable dans les deux groupes d'ENI (Figs. 23 et 24), bien qu'à 6 mois, ceux nés de mères avec une charge virale détectable avaient significativement ( $p = 0,0140$ ) plus de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> mémoires classiques T indépendantes ( $< 40 : 0,08738 \pm 0,04709 \%$ ;  $\geq 40 : 0,2484 \pm 0,3404 \%$ ) (Fig. 24). De plus, ils ont un peu plus de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs ( $< 40 : 0,03734 \pm 0,02740 \%$ ;  $\geq 40 : 0,04883 \pm 0,009428 \%$ ;  $p = 0,0564$ ), mémoires classiques ( $< 40 : 0,02356 \pm 0,02832 \%$ ;  $\geq 40 : 0,07781 \pm 0,1146 \%$ ;  $p = 0,0733$ ), mémoires activées ( $< 40 : 0,03994 \pm 0,08359 \%$ ;  $\geq 40 : 0,1216 \pm 0,1438 \%$ ;  $p = 0,0873$ ) et mémoires activées T indépendantes ( $< 40 : 0,06649 \pm 0,1223 \%$ ;  $\geq 40 : 0,1377 \pm 0,1980 \%$ ;  $p = 0,0972$ ), mais ces différences n'étaient pas significatives.

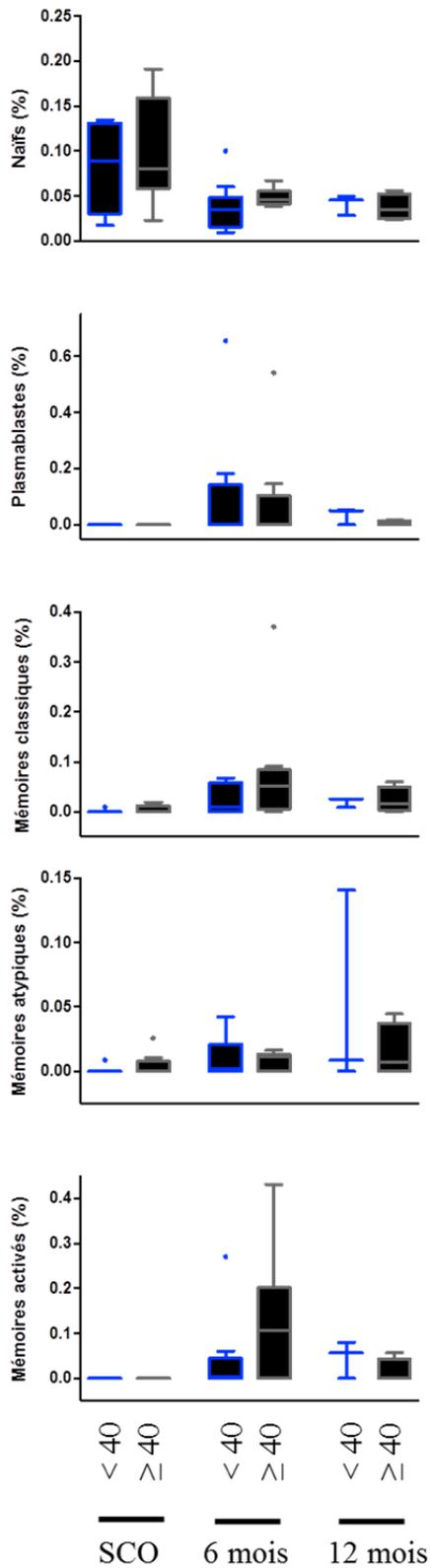
Ainsi, sur le plan du système immunitaire adaptatif, il existe clairement une différence chez les enfants ENI nés de mères avec une virémie détectable.

**Tableau 6 :** Phénotypes des sous-populations de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> TTF1<sup>+</sup> spécifiques selon l'expression de l'immunoglobuline M (IgM).

Sous-populations	CD10	CD27	CD20	CD21	IgM	TTF1
Naïve	-	-	+	+	+	+
Mémoire atypique	-	-	+	-	-	+
Mémoire atypique T indépendante	-	-	+	-	+	+
Mémoire classique	-	+	+	+	-	+
Mémoire classique T indépendante	-	+	+	+	+	+
Mémoire activée	-	+	+	-	-	+
Mémoire activée T indépendante	-	+	+	-	+	+
Plasmablaste	-	+	-	-	-	+

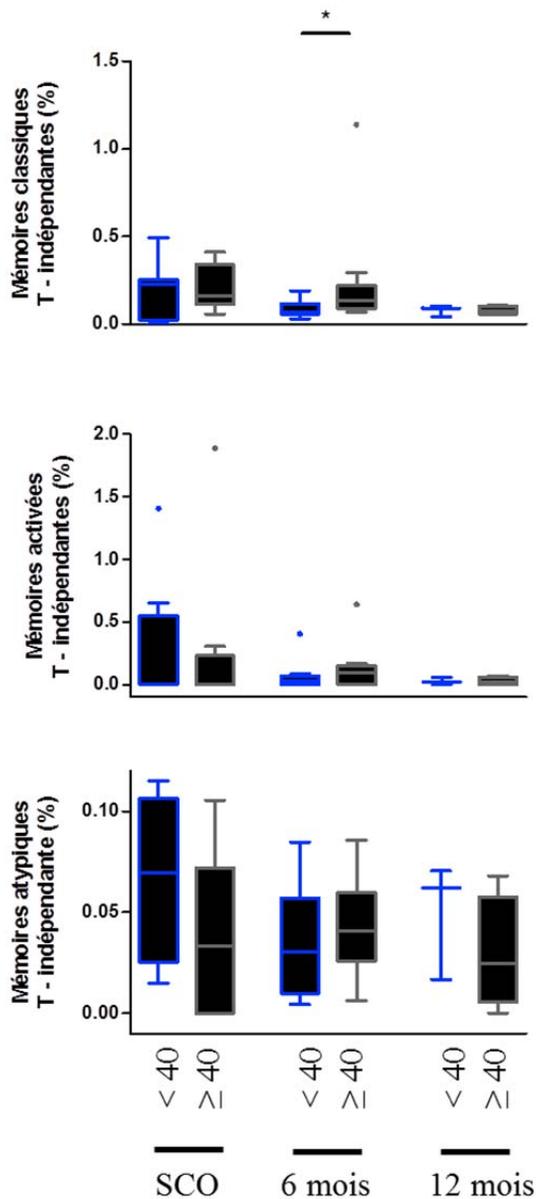


**Fig. 22 :** Stratégies de sélection des lymphocytes B  $CD19^+$  TCF-spécifiques et contrôle de la spécificité des oligomères de TCF. À partir de la stratégie de sélection des lymphocytes B  $CD19^+$ , les sous-populations antigènes-spécifiques ont été détectées (IgM en fonction de l'oligomère de TCF : SA-PE). La spécificité des oligomères de TCF a été validée à partir de prélèvements sanguins provenant d'adultes sains prélevés avant et 6 jours après un rappel vaccinal pour le tétanos. L'absence de plasmablastes avant la vaccination, suivie de l'apparition des plasmablastes 6 jours après la vaccination confirme que la liaison du TCF est bien spécifique (encadré rouge).



**Fig. 23 :** Fréquences des lymphocytes B TTCF spécifiques T dépendant chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.

**SCO :** Sang de cordon ombilical < 40 : Charge virale maternelle inférieure à 40 copies/ml lors de tous les contrôles durant la grossesse ; ≥ 40 : Charge virale maternelle supérieure à 40 copies/ml lors d'au moins un contrôle durant la grossesse.



**Fig. 24** : Fréquences des lymphocytes B TCF spécifiquement T indépendant chez les enfants ENI selon la charge virale maternelle.

**SCO** : Sang de cordon ombilical < 40 : Charge virale maternelle inférieure à 40 copies/ml lors de tous les contrôles durant la grossesse ; ≥ 40 : Charge virale maternelle supérieure à 40 copies/ml lors d'au moins un contrôle durant la grossesse. \* : Significatif ( $\leq 0,05$ )

## Chapitre 4 : Discussion

### Analyse des populations lymphocytaires chez les ENI

Il est bien connu que l'infection à VIH affecte les compartiments de lymphocytes T et B, et que certains déficits immunitaires subsistent au-delà de la suppression virale. Alors qu'advient-il du système immunitaire des enfants ENI? Les phénotypages réalisés dans les présents travaux dépeignent la situation immunitaire de cette population grandissante d'enfants ENI et montrent que certaines des anomalies présentes chez les PVVIH sont présentes chez les enfants ENI.

Quand on a regroupé tous les enfants ENI de notre étude (Annexe 1, Tableau 7) on a observé, dans le sang de cordon ombilical (SCO), des fréquences de lymphocytes naïfs de  $64,82 \pm 10,83$  % pour les  $CD4^+$ ,  $76,71 \pm 7,93$  % pour les  $CD8^+$  et  $68,12 \pm 7,64$  % pour les  $CD19^+$ . Le SCO et le sang périphérique des enfants sains entre 0 et 3 mois sont majoritairement constitués (plus de 90 %) de cellules naïves<sup>150-152</sup>. La fréquence de lymphocytes B naïfs observée dans le SCO de nos ENI s'approche de celle observée par Muema *et al.* chez des enfants infectés par le VIH ayant une virémie basse (< 5 000 copies d'ARN / ml de sang) et 4,8 ans d'âge moyen<sup>69</sup>. Cette comparaison met à l'avant une maturation précoce du système immunitaire à la naissance et appuie globalement l'hypothèse selon laquelle les ENI sont exposés in utero et intrapartum à la charge virale maternelle ou du moins à l'inflammation causée par l'infection non contrôlée.

Lorsque stratifiées selon la charge virale maternelle, nos données sont particulièrement intéressantes puisqu'elles font état de l'activation qu'engendre potentiellement l'exposition à cette virémie. On a retrouvé dans le SCO des enfants nés de mères avec une virémie détectable une fréquence presque 2 fois plus élevée de lymphocytes T  $CD8^+$  mémoires centrales, 1,6 fois moins de lymphocytes B  $CD19^+$  à l'intérieur desquels il y avait 3,6 fois plus de mémoires activés, 1,7 fois plus de mémoires classiques et 1,5 fois plus de plasmablastes. Nos résultats rejoignent ceux publiés sur l'infection virémique au VIH qui entraîne l'augmentation de la fréquence des lymphocytes B  $CD19^+$  mémoires activés, des plasmablastes et des lymphocytes T  $CD8^+$  mémoires centrales. Chez des PVVIH adultes, autant dans la phase primaire de

l'infection que dans la phase chronique, une diminution de la fréquence du nombre de lymphocytes B totaux et naïfs et une augmentation des mémoires activés, des mémoires atypiques et des plasmablastes a été observée. Après 48 semaines sous traitement ARV, le nombre total de lymphocytes B s'est normalisé, alors que pour les autres populations une amélioration sans normalisation est survenue<sup>65</sup>. Ces observations ont aussi été faites chez des enfants infectés par le VIH<sup>46, 69, 153</sup>. Cette ressemblance entre les anomalies des PVVIH et les ENI nés de mères avec une virémie détectable suggère une exposition au virus ou du moins à des composantes virales qui réussiraient à traverser le placenta.

D'ailleurs, sur ce point, la plupart des mères avec une virémie détectable avaient une virémie indétectable au moment de la naissance et bien souvent à mi-grossesse (Tableau 1), et ce grâce à l'administration d'ARV. Cela signifie que l'exposition au virus ou aux particules virales aurait principalement lieu au début de la grossesse. Comme le VIH peut se retrouver dans le trophoblaste<sup>107-117</sup> et que le système hématopoïétique est parmi les premiers à apparaître durant l'embryogenèse avec le système cardiovasculaire<sup>154</sup>, il est envisageable que des virus non infectieux (puisque nous sommes en absence de transmission) ou des protéines virales s'y retrouvent aussi, agissent sur le système immunitaire en développement du fœtus et soient responsables des anomalies immunologiques des nouveau-nés. Il est aussi possible que l'inflammation maternelle découlant de l'infection au VIH ait un impact sur le fœtus. En effet, il n'est pas improbable que les cytokines circulant dans le sang maternel se retrouvent chez le fœtus et cause les aberrations immunologiques observées<sup>155</sup>. Cette proposition rejoint celle selon laquelle l'IL-17 maternelle produite suite à une infection virale pourrait être responsable de l'autisme chez les enfants<sup>156</sup>. Ainsi, l'état inflammatoire maternel pourrait être un facteur contributif.

À 6 mois d'âge, suite à l'exposition aux pathogènes ambiants, le système immunitaire adaptatif des ENI a atteint un stade plus mature et il n'existe plus de différences significatives entre les deux groupes à l'exception de la fréquence plus élevée de lymphocytes B naïfs chez les ENI nés de mères avec une virémie détectable. Par contre, en s'attardant aux données, on a pu observer que la fréquence des enfants ENI nés de mères avec une virémie détectable ne varie pas vraiment entre la naissance et 6 mois alors qu'elle diminue de façon importante pour

les enfants nés de mères avec une virémie indétectable. Cela s'explique justement par le fait que ces enfants sont nouvellement stimulés depuis 6 mois et que l'apparition de leurs sous-populations activées et mémoires se reflète par une diminution de la fréquence des cellules naïves. Ainsi, l'absence de diminution du nombre de lymphocytes B naïfs pourrait refléter un épuisement du compartiment B chez les enfants ENI nés de mères avec une charge virale détectable. D'ailleurs, bien qu'il n'y ait pas de différence statistiquement significative, les fréquences de lymphocytes B mémoires classiques, activés et atypiques étaient plus faibles.

À 6 mois, il est aussi intéressant de noter une fréquence significativement plus basse de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires chez les enfants nés de mères avec une charge virale détectable. Ce résultat va à l'encontre de l'état d'activation retrouvé dans la littérature mais n'est pas dénué de sens puisqu'il suggère, à l'instar du compartiment B, un état d'épuisement. En effet, ces enfants ont aussi moins de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> EMRA et CM, et bien que ces différences ne soient pas significatives cela suggère que leurs cellules sont moins aptes à répondre aux antigènes. L'épuisement clonal, d'abord décrit dans les populations de lymphocytes T, est caractérisé par une perte de fonction dans le contexte d'infections virales chroniques et du cancer<sup>10, 12, 157</sup>. Il est caractérisé par une capacité de prolifération réduite, une diminution de la production de cytokines, une perte de la capacité de tuer des cellules cibles (lymphocytes T CD8<sup>+</sup>), et, ultimement, par la disparition pure et simple des cellules épuisées. Les cellules épuisées expriment également à leur surface un ou plusieurs récepteurs inhibiteurs, dont PD-1, CTLA-4, 2B4, TIM-3 et LAG-3 pour les lymphocytes T<sup>12</sup>. L'infection virémique chronique par le VIH entraîne aussi l'augmentation de la fréquence des lymphocytes B atypiques, de grandes cellules mémoires épuisées exprimant de hauts niveaux de récepteurs inhibiteurs, dont FCRL4, CD22, CD72, LAIR-1, CD85j et CD85k<sup>31,158</sup>. La présence d'une fréquence plus élevée de cellules atypiques chez tous les ENI (Tab.7) par rapport à la population saine, dont la fréquence oscille autour de 3% à travers la vie<sup>152</sup>, supporte encore plus l'hypothèse de l'épuisement chez les ENI. La bonne nouvelle est que leur fréquence de cellules atypiques diminue avec le temps pour atteindre environ 5 % à 12 mois d'âge, suggérant que l'état d'épuisement n'est que temporaire et qu'il devrait se résorber avec le temps. Les marqueurs d'épuisement des lymphocytes B cités plus haut n'ont pas été inclus dans la présente étude pour des raisons techniques (i.e. il ne restait plus de laser disponible

pour d'autres fluorochromes. Par contre, dans une phase ultérieure de l'étude, alors que l'équipement sera amélioré (i.e. ajout de lasers UV), il sera possible de les analyser. En ce qui concerne les lymphocytes T, l'analyse de l'épuisement via l'expression de PD-1 a été entamée tardivement, il n'y a donc pas assez de données. Ainsi l'état d'épuisement sera confirmé dans une phase ultérieure de l'étude avec d'autres échantillons.

À 12 mois, les enfants nés de mères avec une charge virale détectable ont une fréquence significativement plus faible de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux, une fréquence significativement plus élevée de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> totaux et de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> totaux. Ces observations s'apparentent aux résultats rétrospectifs publiés par notre équipe qui notaient une fréquence significativement plus élevée de lymphocytes B et une fréquence significativement plus faible de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à 2 et 6 mois chez les enfants nés de mères avec une charge virale supérieure à 1 000 copies d'ARN / ml<sup>144</sup>. Le phénotypage des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à 12 mois a révélé significativement moins de cellules naïves et significativement plus de cellules mémoires tant centrales qu'effectrices. Ces observations ne sont pas sans rappeler les travaux de Garcia-Knight *et al.*, qui ont observé une corrélation entre la charge virale maternelle et l'état d'activation immunitaire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez des ENI de 12 mois<sup>143</sup>. Il est inquiétant de constater que les ENI nés de mères avec une charge virale détectable affichent une déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, puisque l'appauvrissement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est habituellement caractéristique de l'infection par le VIH. Une autre caractéristique de l'infection par le VIH est l'état d'activation du système immunitaire. Cette caractéristique est aussi retrouvée chez les enfants ENI, et ce même plusieurs mois après la naissance et la fin de l'exposition à la virémie maternelle comme le montrent nos données. Nos observations suggèrent que malgré le contrôle de la virémie maternelle à la naissance, l'exposition au VIH durant n'importe quel stade de la grossesse a une empreinte durable sur le système immunitaire en développement.

### **Analyse de la réponse antigène-spécifique**

Avant de procéder à l'analyse de la réaction antigène-spécifique, il a fallu produire le TTCF qui allait être utilisé pour l'analyse. Puisque les étapes de production du TTCF par l'équipe du Dr Wucherpfennig diffèrent en plusieurs points des nôtres, il est primordial de discuter de ces modifications afin de démontrer la validité de notre procédure. Ils ont induit

l'expression à 28°C, les cellules ont été lysées par sonication dans un tampon tris/NaCl, l'étiquette polyhistidine a été éliminée par clivage avec 10 U de thrombine et le TTCF résultant a été mono-biotinylé à l'aide de la BirA pendant 4 heures à 30°C.

Cette procédure utilisée par l'équipe du Dr Wucherpfennig, que nous avons essayée, nécessitait plusieurs changements de tampon et étapes de purification (chromatographie par filtration sur gel Superose 12 et chromatographie par échange d'anions MonoQ), qui engendrait la précipitation du TTCF et offrait un rendement de moins de 10%. La biotinylation *in vivo* du TTCF a permis d'éliminer la chromatographie par échange d'anions qui servait à retirer l'excès de biotine et était pratiquement aussi efficace de la biotinylation *in vitro*<sup>149</sup>. La chromatographie par filtration sur gel, qui servait à purifier le TTCF suite au clivage de l'étiquette polyhistidine, a pu être éliminée suite à l'observation d'une efficacité de multimérisation comparable entre le TTCF avec et sans cette étiquette. La capacité de marquage des oligomères de TTCF avec et sans étiquette histidine était aussi comparable.

Avant d'aborder la différence de ratio de SA:TTCF que nous avons utilisé, il est important de comprendre d'où viennent les tétramères et comment ils fonctionnent. Auparavant, les populations antigène-spécifique de lymphocytes T étaient difficilement étudiable à cause de l'affinité trop faible entre un monomère pCMH et son TCR spécifique. Cette faible affinité pCMH-TCR résultait en une interaction de quelques secondes tout au plus. Il y a 20 ans, Michael McHeyzer-Williams, Mark Davis et John D. Altman ont révolutionné l'étude de ces populations de lymphocytes en générant des multimères de pCMH. Le principe est simple : la multimérisation des monomères de pCMH permet l'engagement de plusieurs TCR sur un même lymphocyte T spécifique et augmente l'avidité de l'interaction pCMH-TCR<sup>159, 160</sup>.

Depuis, pratiquement toutes les équipes ayant travaillé avec des tétramères ont utilisé un ratio de multimérisation de 1:4 (SA:pCMH) ou plus. Ce ratio permet la saturation des 4 bras de la streptavidine et une formation optimale de tétramère. L'Institut national de la santé des États-Unis d'Amérique (NIH), qui fabrique sur commande des pCMH dédiés à la tétramérisation, propose en plus d'ajouter graduellement la streptavidine afin d'assurer la

saturation de toutes les molécules de streptavidine et la formation optimale de tétramères<sup>161</sup>. L'équipe de Moon a utilisé une technique différente en ajoutant en excès le pCMH à tétramériser puis en filtrant ensuite la préparation pour conserver les tétramères et se débarrasser des monomères pCMH libres<sup>162</sup>. Par la suite, il a été démontré que l'interaction des monomères pCMH est si faible que les monomères pCMH libres restants n'affectaient pas la liaison des tétramères pCMH avec les cellules et donc ne nuisait pas à la détection des lymphocytes T antigène-spécifique<sup>149</sup>.

Dans ce cas, pourquoi avons-nous utilisé un ratio 1:2 qui ne permet pas la saturation de la streptavidine et engendre préférentiellement la formation de monomères, dimères et trimères? Simplement parce qu'il est question de l'interaction peptide-BCR et non de l'interaction pCMH-TCR. En d'autres mots, les tétramères utilisés sont composés de TTCF et non de pCMH et qu'ils iront se lier à leur BCR spécifique et non à des TCR. Qu'est-ce que ça change? L'interaction monomère pCMH-TCR est, comme mentionnée plus tôt, faible et de courte durée, ce qui n'impacte pas la détection des T antigène-spécifique par les tétramères. L'interaction entre un antigène et son BCR spécifique est beaucoup plus forte. Ainsi, la liaison de monomère de TTCF libre pourrait bloquer la liaison de tétramères et empêcher la détection des lymphocytes B antigène-spécifiques. Nous avons donc choisi le ratio qui, lors de l'essai de tétramérisation, offrait un équilibre entre un maximum de multimérisation et un minimum de TTCF libre, à savoir 1:2.

L'analyse de la réponse antigène-spécifique des lymphocytes B, la réponse au vaccin du tétanos, détectée via le TTCF, n'est globalement pas très différente entre les deux groupes d'ENI. Cela signifie que les ENI répondent de façon indépendante de la charge virale maternelle. Par contre, cela ne signifie pas nécessairement qu'ils répondent bien ou mal et leur profil de réponse doit être comparé à celui d'enfants sains (qui seront recrutés ultérieurement dans l'étude) pour conclure à anomalie. Aussi, plusieurs autres vaccins sont administrés aux enfants ENI et ils ne fonctionnent pas tous de la même manière. Tester la réponse des ENI à plus d'un vaccin pourrait révéler une anomalie spécifique à un type de vaccin qui n'est pas visible avec le vaccin antitétanique. Il serait aussi intéressant, bien que probablement difficile,

de comparer les populations de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques des enfants ENI.

Le vaccin contre le tétanos est fabriqué à partir du toxoïde tétanique qui est de nature protéique. Ce type d'antigène est T-dépendant, ce qui veut dire qu'il nécessite l'aide des lymphocytes T auxiliaires pour provoquer une réponse immunitaire. L'antigène T-dépendant doit être présenté par les CPA aux lymphocytes T dans le contexte du CMH-II. L'activation des lymphocytes T induit la production de cytokines, qui iront entre autres agir sur les cellules B antigène-spécifiques en causant leur expansion. La réponse à un antigène T-dépendant produit des cellules B et T mémoires durables et induit la commutation de classe et l'hypermutation somatique des cellules B antigène-spécifiques ce qui permet la production d'anticorps de haute affinité et d'isotypes variés<sup>163</sup>.

Il est donc étonnant de constater que nous avons détecté 5 fois plus de cellules mémoires classiques TCF7-spécifique T-indépendantes (n'ayant pas reçu l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) chez les ENI nés de mères avec une charge virale détectable. Ces enfants avaient aussi un peu plus de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> naïfs, de mémoires classiques, mémoires activés et mémoires activés T-indépendantes. Dans les cas où les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont épuisés ou déplétés, il est facile d'imaginer qu'ils ne puissent pas aider les lymphocytes B. Mais il a été montré par Moir *et al.* qu'une réduction de l'activation des cellules B par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avait lieu chez les patients virémiques comparativement aux patients avirémiques, et ce en présence d'un nombre comparable de lymphocytes T CD4<sup>+</sup><sup>55</sup>. Ainsi, en réponse à un antigène T-dépendant, les cellules B TCF7-spécifiques n'arriveraient pas à agir commuter et continueraient d'exprimer l'IgM. De telles cellules, dans le cadre de notre stratégie de sélection des sous-populations (Fig. 22), apparaîtraient dans le cadran T-indépendant (IgM<sup>+</sup>). À 12 mois, il n'existe presque plus de différences entre les deux groupes et on a observé beaucoup moins de cellules IgM<sup>+</sup> chez les ENI nés de mères avec une charge virale détectable.

Ainsi, l'expression de l'immunoglobuline IgM par les sous-populations de lymphocytes B représente habituellement des cellules non exposées à un antigène (naïves et

immatures) alors que la commutation de classe représente les cellules ayant déjà été exposées à un antigène. Chez les PVVIH en phase primaire de l'infection, la fréquence de cellules mémoires classiques et atypiques qui exprimaient l'IgM était significativement plus élevée, alors que chez les PVVIH en phase chronique de l'infection avaient une fréquence augmentée de cellules exprimant l'IgM dans toutes les sous-populations (mémoires classiques, activées et atypiques)<sup>65</sup>. Dans les deux groupes de PVVIH (infection primaire et chronique), après un traitement ARV prolongé, le nombre de cellules exprimant l'IgM s'est normalisé dans les sous-populations mémoires classiques et activées, alors que pour les mémoires atypiques, l'altération était encore observable<sup>65</sup>. Ces exactement le même type de résultats que nous avons obtenus avec nos ENI, pour qui le nombre de cellules IgM<sup>+</sup> TTCF-spécifiques élevé à 6 mois a diminué à 12 mois. Ainsi, on peut proposer que l'exposition à la virémie maternelle in utero puisse avoir les mêmes effets que l'exposition à une virémie chronique chez une PVVIH et que l'arrêt de l'exposition à la virémie maternelle suite à la naissance puisse avoir le même effet qu'un traitement ARV prolongé chez les PVVIH.

Ces observations suggèrent encore une fois que l'exposition à la virémie maternelle impacte le compartiment B en développement mais que la réponse vaccinale se normalise avec le temps puisque l'exposition au virus n'est plus présente. Bien entendu, il reste encore à comparer la réponse des enfants ENI avec la réponse d'enfants sains pour déterminer si elle est « normale » ou non. L'hypothèse la plus probable suite aux résultats obtenus ici, est qu'il y aura une différence, puisque nos enfants ENI se rapprochent bien plus des PVVIH que des enfants sains.

Prise ensembles, nos observations supportent bien la théorie de l'exposition à des particules virales à quelques exceptions près : les cellules atypiques sont présentes chez les ENI nés de mères avec une virémie indétectable et leurs fréquences de lymphocytes naïfs dans le SCO sont faibles. Il existe par contre plusieurs explications logiques à ce phénomène. On sait que de petits rebonds de virémie sont possibles chez les patients indétectables sous traitement ARV, par exemple lorsqu'ils oublient un comprimé ou le régurgite en raison des nausées matinales survenant dans le premier trimestre de grossesse (mauvaise observance thérapeutique)<sup>164</sup> Il est aussi possible qu'une protéine virale traverse le placenta et cause tous

ces dommages. Un bon candidat est Tat, une protéine de régulation du VIH-1 pouvant moduler plusieurs processus cellulaires<sup>165</sup>. Tat est sécrétée par les cellules infectées et peut être internalisée par les cellules voisines<sup>165</sup>. Avec la naissance de l'enfant et sa croissance fulgurante durant la première année, le nombre de cellules contenant Tat serait dilué. Ainsi, l'effet de Tat finirait par disparaître. Bien sûr, cette théorie n'explique en rien l'activation des lymphocytes T observée à 12 mois. Il est par contre important de noter que le nombre d'échantillons phénotypés pour les T à 12 mois est très faible, et que la signifiante statistique devra être confirmée avec plusieurs autres échantillons.

### **Avenues futures**

Comme il l'a été mentionné à plusieurs reprises au cours de la discussion, les travaux présentés dans ce mémoire suggèrent que les enfants ENI ont été exposés durant la grossesse ou l'accouchement à des particules virales, des virus ou des protéines virales comme Tat. L'absence de signifiante statistique lors de la stratification par classe d'ARV ne permet pas d'exclure définitivement cette hypothèse ni celle de l'environnement proinflammatoire engendré par l'infection au VIH, mais les présents travaux ne permettent pas non plus de tirer de conclusion sur leur implication. Ainsi, puisque les présents travaux semblent pointer dans la direction de l'exposition à la charge virale maternelle, il serait intéressant d'essayer de prouver ce concept. L'utilisation d'un tétramère de gp120 fait déjà partie de la suite du projet. La détection de cellules gp120-spécifiques dans le SCO des ENI serait une preuve de plus qu'ils sont exposés au minimum à de la gp120 circulante et au maximum à des virus entiers. La détection de Tat, un candidat possible de la cause des anomalies, pourrait être faite via un marquage intracellulaire avec l'anticorps anti-Tat – FITC (ab43016, Abcam). Les CMSP du SCO pourraient aussi être lysés et Tat recherché par immunoprécipitation à l'aide d'un protocole adapté pour la détection de protéines se trouvant dans le noyau<sup>166</sup>.

De plus, comme nos résultats démontrent une augmentation de la fréquence des B atypiques (ou épuisés), l'état d'épuisement des lymphocytes T pourrait facilement être investigué en ajoutant 1 anticorps au marquage T, soit un anti-PD-1 un récepteur inhibiteur associé à l'épuisement clonal des T<sup>12</sup>. En effet, la surexpression et/ou l'expression prolongée

de récepteurs inhibiteurs (PD-1, BTLA, LAG-3, 2B4, etc.) sont une des caractéristiques principales de l'épuisement des cellules T<sup>12</sup>. Parmi ces récepteurs inhibiteurs, PD-1 est celui qui tient un rôle central dans les troubles de cellules T au cours de l'infection par le VIH<sup>12</sup>.

Plusieurs publications soutiennent que la réponse au vaccin antitétanique est efficace chez les ENI parce que leur titre d'anticorps atteint le seuil de positivité<sup>136, 137, 143</sup>. Nos données montrent en effet un nombre important de plasmablastes à 6 mois, ce qui pourrait tout à fait se traduire en une sécrétion d'anticorps acceptable. Par contre, comme les données l'ont montrée, ce sont les cellules mémoires qui semblent poser problème. Il serait intéressant de titrer la quantité d'anticorps antitétaniques des enfants ENI de l'étude afin de voir si ceux qui répondent mieux ont aussi une meilleure mémoire ou si le manque de mémoire T<sub>H</sub>17-spécifique est indépendant de la réponse anticorps. Évidemment, l'addition de contrôles sains sera un atout majeur pour la comparaison des titres et des populations T<sub>H</sub>17-spécifique qui sont générées suite à la vaccination.

## **Limitations de l'étude**

Les principales observations faites au cours des présents travaux portaient sur le SCO des ENI. Ainsi, les sceptiques pourraient argumenter qu'il y a eu contamination par le sang maternel lors du prélèvement et que nos observations découlent en fait des cellules des mères vivant avec le VIH. Bien que le prélèvement fait dans le SCO ne devrait pas être contaminé par le sang maternel, puisque ce dernier ne s'y engage pas et est restreint au placenta, les accouchements sont parfois « sanglants » et une contamination n'est pas impossible. Par contre, il serait étonnant qu'une contamination ait eu lieu lors de tous les prélèvements, et puisque nos données se ressemblent d'un patient à l'autre, nous considérons que cette piste est improbable.

La validation de la détection des cellules B antigène-spécifique avec des tétramères issus de différents ratios SA:TTCF a été faite, mais les données n'ont pas été présentées parce qu'elles ne différaient pas énormément les unes des autres. Bien que le nombre de cellules détecté avec le ratio 1:2 était un peu plus élevé, il est difficile de dire si les oligomères de streptavidine non saturés des ratios 1:2 et 1:3 arrivent à marquer toutes les cellules ou si le

TTCF libre du ratio 1:4 et 1:5 empêche la détection de toutes les cellules en se liant au BCR. Une bonne façon de s'assurer de la détection de toutes les cellules par des tétramères saturés est la technique utilisée par l'équipe de Moon *et al.* mentionnée précédemment<sup>162</sup>. La tétramérisation avec un excès de TTCF (ratio de 8 TTCF pour 1 streptavidine) permettrait la saturation des 4 bras de la streptavidine et la filtration du mélange avec des filtres de 100 kDa permettrait l'élimination du TTCF libre. La filtration n'endommagerait pas la tétramérisation, puisque l'interaction biotine-streptavidine est une des plus fortes qui existe. Puisque comme pour les lymphocytes T, les tétramères sont plus efficaces pour détecter des populations de cellules antigène-spécifiques présentes en faible nombre, leur utilisation est à privilégier. Pour s'assurer que nous avons détecté toutes les cellules TTCF-spécifiques avec le ratio 1:2, une expérience pourrait être faite dans une phase ultérieure de l'étude. Des cellules provenant de l'hybridome SA13, caractérisé par l'expression constante d'un BCR TTCF-spécifique, pourraient être marquées avec les différents ratios utilisés précédemment (1:2, 1:3, 1:4 et 1:5) tout en ajoutant le ratio 1:8-filtré qui assure une tétramérisation complète. La fréquence de cellules obtenue avec le ratio 1:8-filtré serait la fréquence de référence, puisque nous sommes certains d'une avidité maximale due à la saturation des streptavidine et qu'aucun TTCF libre ne bloque le BCR. Puisque les manipulations ont toutes été faites avec le même ratio (1:2), elles sont tout de même valables. En effet, si la détection n'était pas optimale, elle n'était pas optimale de la même manière pour tous les échantillons traités.

Il est important de noter que la comparaison des fréquences des différentes populations lymphocytaires des enfants ENI avec les fréquences retrouvées dans la littérature ne peut être une base de conclusion solide mais seulement une indication de piste à suivre. En effet, d'une équipe à l'autre, les populations lymphocytaires ne sont pas phénotypées de la même manière tant en termes des marqueurs utilisés qu'en termes d'analyse des données<sup>46, 66, 69, 152, 153, 167</sup>. Il faut aussi tenir compte des différences inter et intraéthniques. C'est pourquoi, en l'absence de contrôles sains présentant le même type de caractéristiques que nos ENI, nous les avons comparés entre eux.

Il reste néanmoins que nos observations ont révélé des anomalies qui semblent exacerbées par la virémie maternelle (Fig. 25). Ces anomalies pourraient expliquer au moins

en partie les rapports d'infections et de mortalité plus élevés chez les ENI. En effet, la fréquence plus élevée de cellules atypiques dans le compartiment B, l'incapacité apparente des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à communiquer et l'état d'activation et de maturation précoce du compartiment B à la naissance suggèrent le développement d'une réponse humorale moins efficace et un état d'épuisement immunitaire du moins temporaire.

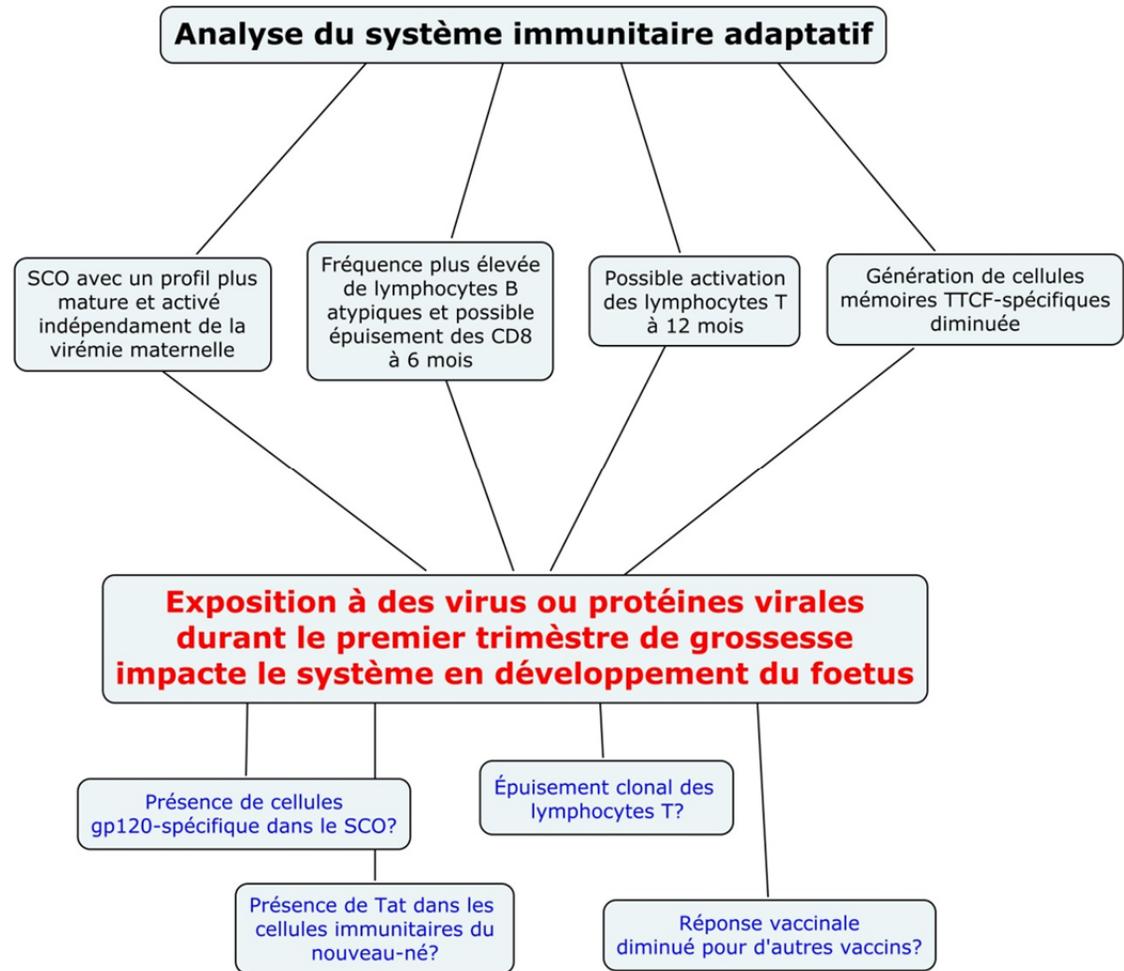
**Prévention de la transmission mère-enfant du VIH = augmentation de la population d'enfants exposés non-infectés (ENI)**

Plusieurs groupes de recherche rapportent :

- Fréquence d'hospitalisation plus importante
- Taux d'infection plus important
- Taux de mortalité plus important

Cliniquement parlant :

Infections respiratoires aiguës, infections à pneumocoque invasif, gastro-entérites, septicémies, otites moyennes aiguës d'origine bactérienne et virale, des pneumonies, etc.



**Fig. 25 :** Schéma synthétique des observations faites dans le cadre du présent mémoire, de leurs implications potentielles et des pistes à suivre..

## Chapitre 5 : Conclusion

Nos travaux ont mis en évidence des différences statistiquement significatives entre les ENI nés de mères avec une charge virale détectable comparativement à ceux nés de mères avec une charge virale indétectable. À la naissance, les patients avaient significativement moins de lymphocytes B totaux, plus de lymphocytes B mémoires classiques, activés, plasmablastes et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires centrales. À 6 mois, ils avaient significativement plus de lymphocytes B naïfs et significativement moins de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires. À 12 mois d'âge, ils avaient significativement plus de lymphocytes B et T CD8<sup>+</sup> totaux et significativement moins de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux. Les sous-populations de lymphocytes T à 12 mois affichaient un profil activé avec significativement plus de cellules mémoires effectrices et mémoires centrales et moins de cellules naïves. Ces anomalies du compartiment T ne semblent pas se résorber à 12 mois d'âge comme décrit dans la littérature, mais cette observation devra être reconfirmée sur un plus grand nombre de patients. Nos données suggèrent qu'il y a exposition à la virémie maternelle et que cette dernière impacte le système immunitaire en développement du fœtus. De plus, nos données suggèrent que cette exposition a lieu durant le premier trimestre de grossesse puisque les femmes sont presque toutes indétectables à partir du deuxième trimestre. Les mécanismes sous-jacents causant ces anomalies doivent encore être élucidés (présence de Tat, détection de l'exposition virale via tétramères de gp120, etc.) et l'épuisement du compartiment T à la naissance et à 6 mois reste à être investigué.

L'analyse de la réponse antigène-spécifique a révélé une fréquence significativement plus élevée (3x) de lymphocytes B mémoires classiques TTCF-spécifiques exprimant l'IgM<sup>+</sup> (aussi appelé T-indépendants). Cette anomalie, ainsi que le nombre supérieur de cellules mémoires TTCF-spécifiques IgM<sup>+</sup> suggère un profil plus naïf et immature chez les enfants nés de mères avec une virémie détectable. Les enfants ENI semblent donc avoir plus de mal à établir une mémoire immunitaire efficace face au vaccin antitétanique. Tester d'autres vaccins de l'enfance pourrait révéler d'autres anomalies ou confirmer celle qui a été observée.

Ces anomalies sont plus importantes chez les ENI nés de mères avec une virémie détectable, mais en comparant les valeurs avec la littérature, elles semblent aussi être présentes chez les ENI nés de mères avec une virémie indétectable. Globalement, les anomalies observées sont présentes dès la naissance dans le SCO et appuient la théorie que les enfants ENI soient exposés soit à des virus, à des particules virales ou à des complexes immuns, et qu'une telle exposition a un impact sur leur système immunitaire en développement. Dans un pays industrialisé où l'accès aux soins est facilité, ces anomalies ont des conséquences modérées mais dans des pays à faible et moyen revenu, les conséquences peuvent être beaucoup plus tragiques, voire fatales.

## Bibliographie

1. Kaech, S.M., Wherry, E.J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2**, 251-262 (2002).
2. Wilson, C.B., Rowell, E. & Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **9**, 91-105 (2009).
3. Hooper, L.V. & Macpherson, A.J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* **10**, 159-69 (2010).
4. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* **3**, 361-70 (2003).
5. Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322 (2002).
6. Alegre, M.-L., Frauwirth, K.A. & Thompson, C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **1**, 220-228 (2001).
7. Berridge, M.J. Lymphocyte activation in health and disease. *Crit Rev Immunol* **17**, 155-78 (1997).
8. Abbey, J.L. & O'Neill, H.C. Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development. *Immunol Cell Biol* **86**, 166-174 (2007).
9. Baitsch, L. et al. Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS One* **7**, e30852 (2012).
10. Barber, D.L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-7 (2006).
11. Derre, L. et al. BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J Clin Invest* **120**, 157-67 (2010).
12. Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nat Immunol* **12**, 492-9 (2011).
13. Kaech, S.M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12**, 749-761 (2012).
14. Keshavarz Valian, H. et al. CCR7+ Central and CCR7- Effector Memory CD4+ T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Immunology* **33**, 220-234 (2013).
15. Merindol, N., Champagne, M.A., Duval, M. & Soudeyns, H. CD8(+) T-cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplantation and characteristics associated with leukemic relapse. *Blood* **118**, 4480-8 (2011).
16. Mullen, K.M. et al. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology* **249**, 86-92 (2012).
17. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**, 745-63 (2004).
18. Rojas, R. & Apodaca, G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 944-55 (2002).
19. Yaari, G. & Kleinstein, S. Practical guidelines for B-cell receptor repertoire sequencing analysis. *Genome Medicine* **7**, 121 (2015).

20. Lou, Z., Casali, P. & Xu, Z. Regulation of B Cell Differentiation by Intracellular Membrane-Associated Proteins and microRNAs: Role in the Antibody Response. *Front Immunol* **6** (2015).
21. Muramatsu, M. et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-63 (2000).
22. Cambier, J.C., Gauld, S.B., Merrell, K.T. & Vilen, B.J. B-cell anergy : from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* **7**, 633-43 (2007).
23. Nemazee, D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 19-51 (2000).
24. Halverson, R., Torres, R.M. & Pelanda, R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nature Immunol.* **5**, 645-650 (2004).
25. Tiegs, S.L., Russell, D.M. & Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* **177**, 1009-1020 (1993).
26. Nemazee, D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* **6**, 728-740 (2006).
27. Holmes, M.L., Pridans, C. & Nutt, S.L. The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol* **86**, 47-53 (2008).
28. Poulin, L., Paquette, N., Moir, S., Lapointe, R. & Darveau, A. Productive infection of normal CD40-activated human B lymphocytes by HIV-1. *AIDS* **8**, 1539-44 (1994).
29. Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M. & Corcoran, L.M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 160-71 (2015).
30. Kaminski, D.A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A.F. & Sanz, I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol* **3**, 302 (2012).
31. Moir, S. & Fauci, A.S. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 235-45 (2009).
32. Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Micro* **10**, 279-290 (2012).
33. Laskey, S.B. & Siliciano, R.F. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nat Rev Microbiol* **12**, 772-80 (2014).
34. Simon, V. & Ho, D.D. HIV-1 dynamics in vivo : implications for therapy. *Nat Rev Microbiol* **1**, 181-90 (2003).
35. Taha, H., Das, A. & Das, S. Clinical effectiveness of dolutegravir in the treatment of HIV/AIDS. *Infection and Drug Resistance* **8**, 339-352 (2015).
36. Bowen, D.L., Lane, H.C. & Fauci, A.S. Immunopathogenesis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* **103**, 704-9 (1985).
37. Reddy, M.M. et al. Human immunodeficiency virus type-1 infection of homosexual men is accompanied by a decrease in circulating B cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**, 428-34 (1991).
38. Gaines, H. et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**, 995-9 (1990).
39. Miedema, F. Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodeficient Rev* **3**, 173-93 (1992).
40. Fevrier, M., Dorgham, K. & Rebollo, A. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection : role of apoptosis. *Viruses* **3**, 586-612 (2011).

41. Ruibal-Ares, B., Belmonte, L., Bare, P. & De Elizalde de Bracco, M.M. [Apoptosis and human immunodeficiency virus infection (HIV)]. *Medicina (B Aires)* **60 Suppl 2**, 17-20 (2000).
42. Malaspina, A. et al. Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. *J Immunol* **170**, 5965-72 (2003).
43. Schlesinger, M., Rabinowitz, R., Levy, P. & Maayan, S. The expression of CD8 on B lymphocytes in HIV-infected individuals. *Immunol Lett* **50**, 23-7 (1996).
44. Landay, A.L., Bethel, J. & Schnittman, S. Phenotypic variability of lymphocyte populations in peripheral blood and lymph nodes from HIV-infected individuals and the impact of antiretroviral therapy. DATRI 003 Study Group. Division of AIDS Treatment Research Initiative. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 445-51 (1998).
45. Haas, A., Zimmermann, K. & Oxenius, A. Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J Virol* **85**, 12102-13 (2011).
46. van den Heuvel, D. et al. Persistent subclinical immune defects in HIV-1-infected children treated with antiretroviral therapy. *AIDS* **29**, 1745-56 (2015).
47. Ribeiro, S.P. et al. The CD8(+) memory stem T cell (T(SCM)) subset is associated with improved prognosis in chronic HIV-1 infection. *J Virol* **88**, 13836-44 (2014).
48. Williams, L.D. et al. Immune activation is associated with CD8 T cell interleukin-21 production in HIV-1-infected individuals. *J Virol* **88**, 10259-63 (2014).
49. Chowdhury, A. et al. Differential Impact of In Vivo CD8+ T Lymphocyte Depletion in Controller versus Progressor Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *J Virol* **89**, 8677-86 (2015).
50. Sjamsoedin-Visser, E.J., Heijnen, C.J., Zegers, B.J. & Stoop, J.W. Defect in B cell function in HTLV III/LAV positive hemophilia patients. *Blood* **69**, 1388-93 (1987).
51. Widney, D. et al. Effects of zidovudine on B lymphocyte activation. *Cell Immunol* **158**, 140-56 (1994).
52. Scamurra, R.W. et al. Impact of HIV-1 infection on VH3 gene repertoire of naive human B cells. *J Immunol* **164**, 5482-91 (2000).
53. De Milito, A., Morch, C., Sonnerborg, A. & Chiodi, F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS* **15**, 957-64 (2001).
54. Fournier, A.M. et al. Spontaneous secretion of immunoglobulins and anti-HIV-1 antibodies by in vivo activated B lymphocytes from HIV-1-infected subjects: monocyte and natural killer cell requirement for in vitro terminal differentiation into plasma cells. *Clin Immunol* **103**, 98-109 (2002).
55. Moir, S. et al. Perturbations in B cell responsiveness to CD4+ T cell help in HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6057-62 (2003).
56. De Milito, A. et al. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* **103**, 2180-6 (2004).
57. Titanji, K. et al. Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *AIDS* **19**, 1947-55 (2005).
58. Thapa, D.R. et al. B-cell activation induced microRNA-21 is elevated in circulating B cells preceding the diagnosis of AIDS-related non-Hodgkin lymphomas. *AIDS* **26**, 1177-80 (2012).

59. Chong, Y. et al. Increased frequency of CD27- (naive) B cells and their phenotypic alteration in HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 621-9 (2004).
60. Moir, S. et al. Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J Infect Dis* **197**, 572-9 (2008).
61. Ho, J. et al. Two overrepresented B cell populations in HIV-infected individuals undergo apoptosis by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19436-41 (2006).
62. Das, A. et al. Double-positive CD21+CD27+ B cells are highly proliferating memory cells and their distribution differs in mucosal and peripheral tissues. *PLoS One* **6**, e16524 (2011).
63. Sciaranghella, G., Tong, N., Mahan, A.E., Suscovich, T.J. & Alter, G. Decoupling activation and exhaustion of B cells in spontaneous controllers of HIV infection. *AIDS* **27**, 175-80 (2013).
64. Bamford, A. et al. The influence of paediatric HIV infection on circulating B cell subsets and CXCR5(+) T helper cells. *Clin Exp Immunol* **181**, 110-7 (2015).
65. Pogliaghi, M. et al. Beneficial Effects of cART Initiated during Primary and Chronic HIV-1 Infection on Immunoglobulin-Expression of Memory B-Cell Subsets. *PLoS One* **10**, e0140435 (2015).
66. Moir, S. & Fauci, A.S. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev* **254**, 207-24 (2013).
67. Redgrave, B.E. et al. The effect of combination antiretroviral therapy on CD5 B- cells, B-cell activation and hypergammaglobulinaemia in HIV-1-infected patients. *HIV Med* **6**, 307-12 (2005).
68. Amu, S. et al. Frequency and phenotype of B cell subpopulations in young and aged HIV-1 infected patients receiving ART. *Retrovirology* **11**, 76 (2014).
69. Muema, D.M. 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* **195**, 1082-91 (2015).
70. Forbes, J.C. et al. A national review of vertical HIV transmission. *AIDS* **26**, 757-63 (2012).
71. WHO. Global update on the health sector response to HIV, 2014. *Hiv Reporting* (July 2014).
72. Townsend, C.L. et al. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS* **22**, 973-81 (2008).
73. Townsend, C.L. et al. Earlier initiation of ART and further decline in mother-to-child HIV transmission rates, 2000-2011. *AIDS* **28**, 1049-57 (2014).
74. Kim, M.H. et al. Low rates of mother-to-child HIV transmission in a routine programmatic setting in Lilongwe, Malawi. *PLoS One* **8**, e64979 (2013).
75. Prieto, L.M. et al. Low rates of mother-to-child transmission of HIV-1 and risk factors for infection in Spain : 2000-2007. *Pediatr Infect Dis J* **31**, 1053-8 (2012).
76. Frange, P. & Blanche, S. [Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV]. *Presse Med* **43**, 691-7 (2014).
77. Sunohara, D. et al. Current status of pediatric human immunodeficiency virus infection in Japan. *J Infect Chemother* **20**, 661-5 (2014).

78. von Mollendorf, C. 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. *Clin Infect Dis* **60**, 1346-56 (2015).
79. WHO, U., UNAIDS. (WHO, UNICEF, UNAIDS, WASHINGTON DC/GENEVA, 2015).
80. Marinda, E. et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 519-26 (2007).
81. Brahmbhatt, H. et al. Mortality in HIV-infected and uninfected children of HIV-infected and uninfected mothers in rural Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* **41**, 504-8 (2006).
82. Landes, M. et al. Mortality and health outcomes of HIV-exposed and unexposed children in a PMTCT cohort in Malawi. *PLoS One* **7**, e47337 (2012).
83. Slogrove, A. et al. HIV-exposed uninfected infants are at increased risk for severe infections in the first year of life. *J Trop Pediatr* **58**, 505-8 (2012).
84. Koyanagi, A. 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. *Pediatr Infect Dis J* **30**, 45-51 (2011).
85. Marquez, C. et al. Increased morbidity in early childhood among HIV-exposed uninfected children in Uganda is associated with breastfeeding duration. *J Trop Pediatr* **60**, 434-41 (2014).
86. Liu, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* **379**, 2151-61 (2012).
87. Pavlinac, P.B. et al. High-risk enteric pathogens associated with HIV infection and HIV exposure in Kenyan children with acute diarrhoea. *AIDS* **28**, 2287-96 (2014).
88. Pavlinac, P.B., Tickell, K.D. & Walson, J.L. Management of diarrhea in HIV-affected infants and children. *Expert Rev Anti Infect Ther* **13**, 5-8 (2015).
89. Cutland, C.L. et al. Maternal HIV infection and vertical transmission of pathogenic bacteria. *Pediatrics* **130**, e581-90 (2012).
90. Singh, H.K. et al. High rates of all-cause and gastroenteritis-related hospitalization morbidity and mortality among HIV-exposed Indian infants. *BMC Infect Dis* **11**, 193 (2011).
91. Heresi, G.P., Caceres, E., Atkins, J.T., 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. *Clin Infect Dis* **25**, 739-40 (1997).
92. Slogrove, A.L., Cotton, M.F. & Esser, M.M. Severe infections in HIV-exposed uninfected infants : clinical evidence of immunodeficiency. *J Trop Pediatr* **56**, 75-81 (2010).
93. Epalza, C. et al. High incidence of invasive group B streptococcal infections in HIV-exposed uninfected infants. *Pediatrics* **126**, e631-8 (2010).
94. Mussi-Pinhata, M.M. 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* **119**, e694-704 (2007).

95. Madhi, S.A. et al. Bacterial and Respiratory Viral Interactions in the Etiology of Acute Otitis Media in HIV-infected and HIV-uninfected South African Children. *Pediatr Infect Dis J* **34**, 753-60 (2015).
96. Kelly, M.S. et al. Treatment Failures and Excess Mortality Among HIV-Exposed, Uninfected Children With Pneumonia. *J Pediatric Infect Dis Soc* **4**, e117-26 (2015).
97. McNally, L.M. 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. *Lancet* **369**, 1440-51 (2007).
98. Adler, C. et al. Severe Infections in HIV-Exposed Uninfected Infants Born in a European Country. *PLoS One* **10**, e0135375 (2015).
99. Taron-Brocard, C. et al. Increased risk of serious bacterial infections due to maternal immunosuppression in HIV-exposed uninfected infants in a European country. *Clin Infect Dis* **59**, 1332-45 (2014).
100. Asbjornsdottir, K.H. et al. Breastfeeding is associated with decreased pneumonia incidence among HIV-exposed, uninfected Kenyan infants. *AIDS* **27**, 2809-15 (2013).
101. Asbjornsdottir, K.H. et al. Breastfeeding Is Associated with Decreased Risk of Hospitalization among HIV-Exposed, Uninfected Kenyan Infants. *J Hum Lact* (2015).
102. Kuhn, L. et al. Oligosaccharide composition of breast milk influences survival of uninfected children born to HIV-infected mothers in Lusaka, Zambia. *J Nutr* **145**, 66-72 (2015).
103. Reikie, B.A. et al. Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* **66**, 245-55 (2014).
104. Longwe, H. et al. 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 Immunol* **16**, 50 (2015).
105. de Deus, N. et al. Impact of elevated maternal HIV viral load at delivery on T-cell populations in HIV exposed uninfected infants in Mozambique. *BMC Infect Dis* **15**, 37 (2015).
106. Clerici, M. et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* **96**, 3866-71 (2000).
107. Gaillard, P. et al. Exposure to HIV-1 during delivery and mother-to-child transmission. *AIDS* **14**, 2341-8 (2000).
108. Mano, H. & Chermann, J.C. Fetal human immunodeficiency virus type 1 infection of different organs in the second trimester. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 83-8 (1991).
109. Usami, M. et al. Throughput expression of multiple G-protein coupled receptors for HIV infection in choriocarcinoma cells, trophoblasts, and breast milk cells. *Clin Lab* **55**, 23-30 (2009).
110. Arias, R.A., Munoz, L.D. & Munoz-Fernandez, M.A. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* **307**, 266-77 (2003).
111. David, F.J. et al. Human trophoblast cells express CD4 and are permissive for productive infection with HIV-1. *Clin Exp Immunol* **88**, 10-6 (1992).
112. Douglas, G.C. et al. Cell-mediated infection of human placental trophoblast with HIV in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 735-40 (1991).
113. Le Monnier, A. et al. ActA Is Required for Crossing of the Fetoplacental Barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **75**, 950-7 (2007).

114. Nørskov-Lauritsen, N. et al. In vitro infection of human placental trophoblast by wild-type vaccinia virus and recombinant virus expressing HIV envelope glycoprotein. *Res Virol* **143**, 321-8 (1992).
115. Phillips, D.M. & Tan, X. HIV-1 infection of the trophoblast cell line BeWo : a study of virus uptake. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1683-91 (1992).
116. Robbins, J.R., Zeldovich, V.B., Poukchanski, A., Boothroyd, J.C. & Bakardjiev, A.I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **80**, 418-28 (2012).
117. Zachar, V., Thomas, R.A., Jones, T. & Goustin, A.S. Vertical transmission of HIV : detection of proviral DNA in placental trophoblast. *AIDS* **8**, 129-30 (1994).
118. Rombaldi, R.L., Serafini, E.P., Mandelli, J., Zimmermann, E. & Losquiavo, K.P. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virol J* **5**, 106 (2008).
119. Wright, H.T., Jr. Congenital anomalies and viral infections in infants. The etiologic role of maternal viral infections. *Calif Med* **105**, 345-51 (1966).
120. Lecuit, M. [*Listeria monocytogenes* crossing of the placental barrier]. *Arch Pediatr* **16**, 932-3 (2009).
121. Holditch, S.J. et al. Decay kinetics of HIV-1 specific T cell responses in vertically HIV-1 exposed seronegative infants. *Front Immunol* **2**, 94 (2011).
122. Rowland-Jones, S.L. et al. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* **341**, 860-1 (1993).
123. Cheynier, R. et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* **22**, 2211-7 (1992).
124. Aldhous, M.C., Watret, K.C., Mok, J.Y., Bird, A.G. & Froebel, K.S. Cytotoxic T lymphocyte activity and CD8 subpopulations in children at risk of HIV infection. *Clin Exp Immunol* **97**, 61-7 (1994).
125. Legrand, F.A. et al. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS One* **1**, e102 (2006).
126. Ono, E. et al. Imbalance of naive and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz J Med Biol Res* **41**, 700-8 (2008).
127. Nielsen, S.D. et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood* **98**, 398-404 (2001).
128. Gesner, M. et al. Alteration in the proportion of CD4 T lymphocytes in a subgroup of human immunodeficiency virus-exposed-uninfected children. *Pediatrics* **93**, 624-30 (1994).
129. Bunders, M., Pembrey, L., Kuijpers, T. & Newell, M.L. Evidence of impact of maternal HIV infection on immunoglobulin levels in HIV-exposed uninfected children. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**, 967-75 (2010).
130. Scott, S. et al. The influence of HIV-1 exposure and infection on levels of passively acquired antibodies to measles virus in Zambian infants. *Clin Infect Dis* **45**, 1417-24 (2007).
131. Hygino, J. et al. Altered immunological reactivity in HIV-1-exposed uninfected neonates. *Clin Immunol* **127**, 340-7 (2008).

132. Hygino, J. et al. Enhanced Th17 phenotype in uninfected neonates born from viremic HIV-1-infected pregnant women. *J Clin Immunol* **31**, 186-94 (2011).
133. Miyamoto, M. et al. Low CD4+ T-cell levels and B-cell apoptosis in vertically HIV-exposed noninfected children and adolescents. *J Trop Pediatr* **56**, 427-32 (2010).
134. Siberry, G.K. et al. Immunity to Measles, Mumps, and Rubella in US Children With Perinatal HIV Infection or Perinatal HIV Exposure Without Infection. *Clin Infect Dis* (2015).
135. Simani, O.E. et al. Effect of HIV-1 exposure and antiretroviral treatment strategies in HIV-infected children on immunogenicity of vaccines during infancy. *AIDS* **28**, 531-41 (2014).
136. Reikie, B.A. et al. Antibody responses to vaccination among South African HIV-exposed and unexposed uninfected infants during the first 2 years of life. *Clin Vaccine Immunol* **20**, 33-8 (2013).
137. Abramczuk, B.M. et al. Impaired humoral response to vaccines among HIV-exposed uninfected infants. *Clin Vaccine Immunol* **18**, 1406-9 (2011).
138. Singh, D.K., Kumar, R., Rai, R., Maurya, M. & Bhargava, A. Immunogenicity of Hepatitis B Vaccine in HIV Exposed Uninfected Infants. *Indian J Pediatr* (2015).
139. Perry, A.L., Hayes, A.J., Cox, H.A., Alcock, F. & Parker, A.R. Comparison of five commercial anti-tetanus toxoid immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Vaccine Immunol* **16**, 1837-9 (2009).
140. Kidzeru, E.B. et al. In-utero exposure to maternal HIV infection alters T-cell immune responses to vaccination in HIV-uninfected infants. *AIDS* **28**, 1421-30 (2014).
141. Mazzola, T.N. et al. Impaired Bacillus Calmette-Guerin cellular immune response in HIV-exposed, uninfected infants. *AIDS* **25**, 2079-87 (2011).
142. Ota, M.O. et al. HIV-negative infants born to HIV-1 but not HIV-2-positive mothers fail to develop a Bacillus Calmette-Guerin scar. *AIDS* **13**, 996-8 (1999).
143. Garcia-Knight, M.A. et al. Altered Memory T-Cell Responses to Bacillus Calmette-Guerin and Tetanus Toxoid Vaccination and Altered Cytokine Responses to Polyclonal Stimulation in HIV-Exposed Uninfected Kenyan Infants. *PLoS One* **10**, e0143043 (2015).
144. Kakkar, F. et al. Impact of maternal HIV-1 viremia on lymphocyte subsets among HIV-exposed uninfected infants: protective mechanism or immunodeficiency. *BMC Infect Dis* **14**, 236 (2014).
145. MSSSQ.
146. Franz, B., May, K.F., Jr., Dranoff, G. & Wucherpfennig, K. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. *Blood* **118**, 348-57 (2011).
147. Farrar, J.J. et al. Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**, 292-301 (2000).
148. Turton, K., Chaddock, J.A. & Acharya, K.R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci* **27**, 552-8 (2002).
149. Leisner, C. et al. One-pot, mix-and-read peptide-MHC tetramers. *PLoS One* **3**, e1678 (2008).
150. Tsegaye, A. et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. *Clinical Immunology* **109**, 338-346 (2003).

151. Shearer, W.T. et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 973-80 (2003).
152. Morbach, H., Eichhorn, E.M., Liese, J.G. & Girschick, H.J. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* **162**, 271-9 (2010).
153. Iwajomo, O.H. et al. Delayed reconstitution of B cell immunity to pneumococcus in HIV-infected Malawian children on antiretroviral therapy. *J Infect* **70**, 616-23 (2015).
154. Ygberg, S. & Nilsson, A. The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatr* **101**, 120-7 (2012).
155. Zaretsky, M.V., Alexander, J.M., Byrd, W. & Bawdon, R.E. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol* **103**, 546-50 (2004).
156. Choi, G.B. et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science* **351**, 933-9 (2016).
157. Pantaleo, G. et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9848-53 (1997).
158. Moir, S. et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* **205**, 1797-805 (2008).
159. NIH. (2010).
160. Altman, J.D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-6 (1996).
161. NIH. (2010).
162. Moon, J.J. et al. Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* **27**, 203-13 (2007).
163. Lesinski, G.B. & Westerink, M.A. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Methods* **47**, 135-49 (2001).
164. Practice Bulletin No. 153 : Nausea and Vomiting of Pregnancy. *Obstet Gynecol* **126**, e12-24 (2015).
165. Musinova, Y.R., Sheval, E.V., Dib, C., Germini, D. & Vassetzky, Y.S. Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cell Mol Life Sci* (2015).
166. Dadi S, P.-B.D., Ferrier P in Bio-protocol e319 (2013).
167. Kardava, L. et al. Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J Clin Invest* **124**, 3252-62 (2014).

## Communications

**Gravel C, Le Champion A, Raymond-Marchand L, Boucher M, Lapointe N, Lamarre V, Kakkar F, Côté H, Soudeyns H; The CIHR Team on Cellular Aging and HIV Comorbidities in Women and Children (CARMA). Numerical and phenotypic B-cell abnormalities and vaccine responses in HIV-exposed uninfected (HEU) children.** 8<sup>th</sup> IAS Conference on HIV pathogenesis, treatment & prevention, Vancouver, Canada, July 19<sup>th</sup> - 22<sup>nd</sup> 2015 (affiche et résumé).

**Gravel C, Le Champion A, Raymond-Marchand L, Boucher M, Lapointe N, Lamarre V, Kakkar F, Côté H, Soudeyns H; The CIHR Team on Cellular Aging and HIV Comorbidities in Women and Children (CARMA). Analyse des anomalies numériques des sous-populations de lymphocytes B chez des enfants exposés au VIH mais non-infectés.** 30<sup>ème</sup> congrès de la recherche des étudiants des cycles supérieurs et des postdoctorants en recherche au CHU Sainte-Justine, Saint-Sauveur, Canada, 27-28 mai 2015 (affiche et résumé).

**Gravel C, Le Champion A, Raymond-Marchand L, Boucher M, Lapointe N, Lamarre V, Kakkar F, Côté H, Soudeyns H; The CIHR Team on Cellular Aging and HIV Comorbidities in Women and Children (CARMA). Characterization of B lymphocyte subsets in HIV-exposed uninfected children.** 24<sup>th</sup> Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research, Toronto, Canada, April 30<sup>th</sup> - May 3<sup>rd</sup> 2015 (affiche et résumé BS07).

**Gravel C, Le Champion A, Gagnon E, Boucher M, Lapointe N, Kakkar F, Soudeyns H. Caractérisation des lymphocytes T et B chez les enfants exposés au VIH mais non infectés.** 29<sup>ème</sup> congrès de la recherche des étudiants des cycles supérieurs et des postdoctorants en recherche au CHU Sainte-Justine, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada, 29 mai 2014 (affiche et résumé 74).

**Gravel C, Le Champion A, Gagnon E, Boucher M, Soudeyns H. Anomalies immunitaires chez les enfants exposés au VIH mais non infectés.** 3<sup>e</sup> Journée de la recherche du département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada, 3 mars 2014 (affiche et résumé B8).

## Annexe 1 : Compilation des données

**Tableau 7 :** Fréquences non-stratifiées des sous-populations lymphocytaires présentes chez les ENI à la naissance et à 6 et 12 mois d'âge.

Population		SCO	6 mois	12 mois
CD19 <sup>+</sup>	Totaux	11,55 ± 6,93	21,64 ± 9,43	23,05 ± 7,91
	Naïfs	68,12 ± 7,64	63,07 ± 14,05	62,56 ± 18,85
	Mémoire classique	6,20 ± 2,85	9,04 ± 9,28	11,03 ± 7,06
	Mémoire activé	0,43 ± 0,92	2,79 ± 4,23	4,03 ± 5,69
	Mémoire atypique	8,01 ± 4,69	6,94 ± 3,15	5,06 ± 3,40
	Plasmablaste	0,07 ± 0,04	1,42 ± 2,43	2,32 ± 1,70
	Immature T1	5,80 ± 3,77	3,65 ± 1,93	3,43 ± 3,22
	Immature T2	10,17 ± 3,82	8,33 ± 4,05	8,83 ± 4,28
Taille de l'échantillon		18	19	7
CD19 <sup>+</sup> TTCF spécifique	Naïfs	0,0919 ± 0,0525	0,0428 ± 0,0212	0,0388 ± 0,0125
	Mémoire classique	0,0028 ± 0,0064	0,0493 ± 0,0837	0,0216 ± 0,0192
	Mémoire activé	0,0000 ± 0,0000	0,0786 ± 0,1202	0,0275 ± 0,0353
	Mémoire atypique	0,0028 ± 0,0069	0,0088 ± 0,0113	0,0296 ± 0,0515
	Plasmablaste	0,0000 ± 0,0000	0,0966 ± 0,1869	0,0172 ± 0,0243
	Mémoire classique (T indépendante)	0,1960 ± 0,1426	0,1637 ± 0,2438	0,0797 ± 0,0259
	Mémoire activé (T indépendante)	0,2801 ± 0,5693	0,1002 ± 0,1620	0,0267 ± 0,0293
Mémoire atypique (T indépendante)	0,0522 ± 0,0420	0,0395 ± 0,0261	0,0380 ± 0,0282	
Taille de l'échantillon		16	19	7
CD4 <sup>+</sup>	Totaux	34,25 ± 15,00	41,09 ± 11,91	35,51 ± 15,56
	Naïfs	64,82 ± 10,83	66,61 ± 10,77	62,20 ± 14,07
	Centrale mémoire	19,92 ± 12,31	13,28 ± 6,37	5,15 ± 1,71
	Effecteur mémoire	6,78 ± 2,64	7,72 ± 3,29	9,37 ± 3,20
	Effecteur mémoire RA	6,68 ± 5,10	9,94 ± 4,39	21,01 ± 11,97
Taille de l'échantillon		13	12	4
CD8 <sup>+</sup>	Totaux	5,10 ± 2,66	5,86 ± 3,36	9,56 ± 4,44
	Naïfs	76,71 ± 7,93	78,75 ± 5,95	62,22 ± 19,39
	Centrale mémoire	6,18 ± 3,24	3,64 ± 2,00	0,92 ± 0,54
	Effecteur mémoire	2,81 ± 1,12	4,14 ± 1,38	7,99 ± 10,96
	Effecteur mémoire RA	7,15 ± 4,45	12,12 ± 5,34	26,23 ± 11,90
Taille de l'échantillon		13	12	4

Moyenne ± écart-type en %

**Tableau 8 :** Fréquences des sous-populations lymphocytaires chez les ENI à la naissance, 6 et 12 mois, stratifiées selon la charge virale maternelle.

Population		SCO			6 mois			12 mois		
		< 40*	≥ 40	P	< 40	≥ 40	P	< 40	≥ 40	P
CD19 <sup>+</sup>	Totaux	14,72 ± 7,745	9,017 ± 5,3	<b>0,0410</b>	22,58 ± 8,714	20,6 ± 10,59	0,3299	17,11 ± 2,267	27,5 ± 7,743	<b>0,0571</b>
	Naïfs	67,24 ± 6,102	68,83 ± 8,948	0,3372	57,63 ± 16,77	69,11 ± 7,066	<b>0,0371</b>	66,36 ± 4,342	59,7 ± 25,94	0,4286
	Mémoire classique	4,474 ± 2,267	7,577 ± 2,561	<b>0,0081</b>	11,49 ± 12,31	6,307 ± 2,742	0,3304	10,39 ± 1,299	11,52 ± 9,897	0,2000
	Mémoire activé	0,175 ± 0,03742	0,632 ± 1,224	<b>0,0596</b>	4,189 ± 5,569	1,23 ± 0,4886	0,2235	2,61 ± 1,225	5,09 ± 7,759	0,3143
	Mémoire atypique	7,573 ± 3,642	8,357 ± 5,553	0,4827	7,977 ± 3,261	5,78 ± 2,734	0,0662	4,117 ± 2,221	5,775 ± 4,267	0,4286
	Plasmablaste	0,05375 ± 0,02615	0,085 ± 0,04301	<b>0,0454</b>	0,739 ± 0,5134	2,172 ± 3,432	0,1264	3,313 ± 1,549	1,573 ± 1,567	0,1143
	Immature T1	6,849 ± 3,937	4,954 ± 3,617	0,1185	3,839 ± 2,09	3,436 ± 1,837	0,3311	2,45 ± 0,8489	4,165 ± 4,309	0,4286
	Immature T2	10,62 ± 3,316	9,806 ± 4,323	0,3332	7,368 ± 4,798	9,397 ± 2,92	0,1055	8,217 ± 0,502	9,295 ± 5,982	0,5000
Taille de l'échantillon		8	10		10	9		3	4	
CD19 <sup>+</sup> TTCF spécifique	Naïfs	0,08261 ± 0,04793	0,1011 ± 0,05833	0,2501	0,0373 ± 0,0274	0,04883 ± 0,00943	<b>0,0564</b>	0,0411 ± 0,0112	0,037 ± 0,0147	0,3143
	Mémoire classique	0,00119 ± 0,00336	0,0045 ± 0,00838	0,2441	0,0236 ± 0,0283	0,07781 ± 0,1146	0,0733	0,02 ± 0,01	0,0228 ± 0,0259	0,4286
	Mémoire activé	0 ± 0	0 ± 0	n/a	0,0399 ± 0,0836	0,1216 ± 0,1438	0,0873	0,0455 ± 0,0413	0,01408 ± 0,0282	0,2176
	Mémoire atypique	0,00108 ± 0,00304	0,00453 ± 0,00931	0,2441	0,0101 ± 0,0143	0,00741 ± 0,00717	0,4828	0,0497 ± 0,079	0,0145 ± 0,0211	0,4272
	Plasmablaste	0 ± 0	0 ± 0	n/a	0,1036 ± 0,2048	0,08896 ± 0,1769	0,4819	0,0344 ± 0,0298	0,00433 ± 0,0087	0,1209
	Mémoire classique (T indépendante)	0,1932 ± 0,1619	0,1989 ± 0,1316	0,4696	0,0874 ± 0,0471	0,2484 ± 0,3404	<b>0,0140</b>	0,0792 ± 0,0329	0,08003 ± 0,0249	0,4286
	Mémoire activé (T indépendante)	0,2858 ± 0,5082	0,2743 ± 0,6604	0,3748	0,0665 ± 0,1223	0,1377 ± 0,198	0,0972	0,0256 ± 0,0287	0,0276 ± 0,0341	0,4272
	Mémoire atypique (T indépendante)	0,06533 ± 0,03874	0,03913 ± 0,0435	0,1120	0,0366 ± 0,0289	0,04282 ± 0,02385	0,3076	0,0497 ± 0,0288	0,02925 ± 0,0283	0,3143
Taille de l'échantillon		8	8		10	9		3	4	
CD4 <sup>+</sup>	Totaux	32,34 ± 14,99	36,46 ± 16,1	0,4726	43,03 ± 13,25	39,71 ± 11,73	0,3775	42,04 ± 8,429	28,97 ± 22,01	<b>&lt; 0,0001</b>
	Naïfs	68,98 ± 8,78	59,96 ± 11,69	0,1830	63,82 ± 13,71	68,61 ± 8,735	0,1717	69,67 ± 12,26	54,72 ± 14,84	<b>&lt; 0,0001</b>
	Centrale mémoire	15,01 ± 6,728	25,64 ± 15,37	0,1171	15,42 ± 7,926	11,76 ± 5,104	0,2652	4,12 ± 0,3111	6,175 ± 2,114	<b>&lt; 0,0001</b>
	Effecteur mémoire	6,373 ± 2,446	7,26 ± 3,012	0,3654	7,878 ± 4,071	7,603 ± 2,962	0,4381	6,71 ± 0,9899	12,03 ± 1,195	<b>&lt; 0,0001</b>
	Effecteur mémoire F	7,48 ± 5,308	5,748 ± 5,152	0,2669	9,552 ± 4,502	10,21 ± 4,645	0,2159	17,86 ± 10,25	24,16 ± 16,88	<b>&lt; 0,0001</b>
Taille de l'échantillon		7	6		5	7		2	2	
CD8 <sup>+</sup>	Totaux	5,01 ± 3,448	5,198 ± 1,635	0,3141	5,038 ± 2,751	6,447 ± 3,83	0,3194	7,99 ± 4,087	11,13 ± 5,72	<b>&lt; 0,0001</b>
	Naïfs	79,17 ± 8,34	73,84 ± 6,998	0,1830	75,46 ± 4,464	81,1 ± 6,01	0,1010	77,56 ± 8,464	46,89 ± 10,76	<b>&lt; 0,0001</b>
	Centrale mémoire	4,469 ± 1,852	8,178 ± 3,493	<b>0,0256</b>	4,074 ± 2,204	3,33 ± 1,963	0,3421	0,49 ± 0,0707	1,35 ± 0,3394	<b>&lt; 0,0001</b>
	Effecteur mémoire	2,671 ± 0,6327	2,967 ± 1,567	0,4726	5,14 ± 0,8635	3,433 ± 1,252	<b>0,0025</b>	1,855 ± 0,1061	14,12 ± 14,5	<b>&lt; 0,0001</b>
	Effecteur mémoire F	7,55 ± 4,45	6,688 ± 4,834	0,3654	14,41 ± 5,477	10,48 ± 4,969	0,1717	16,64 ± 4,646	35,83 ± 5,869	<b>&lt; 0,0001</b>
Taille de l'échantillon		7	6		5	7		2	2	

Moyenne ± écart-type en %. Légende : **Différence significative**, **Tendance**, \* : Charge virale maternelle (copies d'ARN / ml de plasma)