



HAL
open science

Étude de l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-G : rôle dans le phénomène de tolérance immunitaire au cours de l'infection palustre

Tania Carenne Djidemi Ayemouwa d'Almeida

► **To cite this version:**

Tania Carenne Djidemi Ayemouwa d'Almeida. Étude de l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-G : rôle dans le phénomène de tolérance immunitaire au cours de l'infection palustre. Santé publique et épidémiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066051 . tel-01591888

HAL Id: tel-01591888

<https://theses.hal.science/tel-01591888v1>

Submitted on 22 Sep 2017

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : **ÉPIDÉMIOLOGIE**

École doctorale 393 Pierre Louis de santé publique :
Épidémiologie et sciences de l'information biomédicale

Présentée par

Tania Carene Djidémi A. d'ALMEIDA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Étude de l'antigène du complexe majeur
l'histocompatibilité HLA-G : Rôle dans le phénomène de
tolérance immunitaire au cours de l'infection palustre**

Soutenue le 24 janvier 2017

devant le jury composé de :

Monsieur	André GARCIA	Directeur de thèse
Madame	Laurence AMIOT	Rapporteur
Madame	Sandrine LEROY	Rapporteur
Madame	Laurence FOIX-L'HELIAS	Examineur
Monsieur	Christophe ROGIER	Examineur
Monsieur	Eric CAUMES	Examineur

Résumé

Les femmes enceintes et les enfants sont les populations à haut risque pour le paludisme. Chez les premières, l'infection peut entraîner une infection placentaire (IP). Les enfants nés d'une mère ayant une IP seraient plus à risque de développer une infection palustre rapidement après la naissance. Un phénomène de tolérance immunitaire est évoqué mais aucune explication n'est émise. Nous proposons une explication basée sur l'implication de HLA-G, protéine de la tolérance immunitaire.

Nous avons pu montrer que les niveaux élevés de HLA-G chez les enfants étaient associés à un risque élevé de paludisme et au faible poids de naissance. Il existe une très forte ressemblance mère-enfant au cours de la grossesse et durant les 2 premières années de vie de l'enfant avec une probabilité très élevée chez les enfants d'avoir le même profil que leur mère. Les femmes ayant une IP présentent un risque plus élevé d'avoir des enfants ayant des niveaux de HLA-G soluble élevé, et le délai de 1^{ère} infection palustre est plus court pour les enfants nés de mères ayant un niveau de HLA-G élevé en début de grossesse. Ces résultats confirment que HLA-G est associée à l'infection palustre. Ils montrent que le rôle de HLA-G dans l'IP est très complexe. Face à la ressemblance mère-enfant et le délai de 1^{ère} infection, il serait intéressant d'envisager le dosage de HLA-G maternel en début de grossesse afin de confirmer son rôle prédictif. HLA-G pourrait alors être un outil de santé publique intéressant pour identifier de potentiels futurs enfants à risque.

Abstract

Pregnant women and children are populations at high risk for malaria. Malaria infection in pregnancy can lead to placental malaria (PM). Children born to a mother with PM have an increased risk of malaria infection during the first years of life. To explain this phenomenon related to an immune tolerance, we suggest an explanation based on the implication of HLA-G, an immune tolerance protein.

We show that high levels of soluble HLA-G in children were associated with malaria risk and low birth weight. There is a very strong mother/child resemblance during pregnancy and the first 2 years of life of the child with a very high probability in children of having the same profile as their mother. Women with PM have a higher risk to give birth to a child with high levels of soluble HLA-G, and children born to mothers with high HLA-G levels have an increased risk of malaria in early pregnancy. These results confirm that HLA-G is associated with malaria infection. They show that the role of HLA-G in PM is very complex. According to the maternal-child resemblance and the delay onset the first infection, it would be interesting to consider the dosage of maternal HLA-G in early pregnancy in order to confirm its predictive role. HLA-G could then be an interesting public health tool to identify potential children at risk.

.

Sommaire

Abréviations	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	xi
Introduction	14
Chapitre 1 : Généralités et problématique	20
1. Généralités sur le paludisme	21
1.1 Définition et épidémiologie du paludisme	21
1.2 Transmission du paludisme.....	23
1.3 Physiopathologie du paludisme	28
1.4 Manifestations et symptômes du paludisme	31
1.5 Prise en charge du paludisme.....	40
1.6 Quelques particularités du paludisme grave chez l'enfant.....	44
1.7 Le paludisme de la femme enceinte, paludisme gestationnel	46
2. Généralités sur HLA-G	55
2.1 Présentation du complexe majeur d'histocompatibilité ou système HLA.....	55
2.2 HLA-G : molécule du CMH	58
2.3 HLA-G en situation physiologique : la grossesse.....	66

2.4	HLA-G et pathologies	69
Chapitre 2 : Méthodologie et résultats		86
1.	Cadre général	87
2.	L'étude TORI-BOSSITO	92
2.1	Matériel et méthode	92
2.2	Résultats	107
3.	L'étude TOLIMMUNPAL	133
3.1	Matériel et méthode	133
3.2	Résultats	150
Chapitre 3 : Discussion		202
1.	Comparaison des deux études et méthodes d'analyses	203
2.	Évolution de HLA-G soluble au cours de la grossesse	212
3.	Évolution de HLA-G soluble au cours des deux premières années de vie	216
4.	Ressemblance mère/enfant	221
5.	HLA-G et faible poids de naissance	223
6.	HLA-G soluble et infection palustre	225
7.	HLA-G et infection placentaire.....	229
Conclusion		234
Références.....		236

Annexes.....	272
Annexe 1.....	272
Annexe 2.....	280

Abréviations

°C	Degré Celsius
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANR	Agence nationale de la recherche
ARF	Acute renal failure
BIC	Bayesian information criterion
CE/FSS	Comité d'éthique de la Faculté des Sciences de la Santé
CCDE/IRD	Comité consultatif d'éthique et de déontologie de l'Institut de Recherche pour le développement
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CR1	Complement receptor 1
CSA	Chondroïtin sulfate A
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DP	Densité parasitaire
EDCTP	European and Developing Countries Clinical Trials Partnerships
EIR	Entomological inoculation rate

FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FPN	Faible poids de naissance
GE	Goutte épaisse
HLA	Human leukocyte antigen
HR	Hazard ratio
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interféron
IL	Interleukine
ILT	Immunoglobulin-like transcript
KIR2DL4	Killer-cell immunoglobulin-like receptor 2DL4
LILRB	Leukocyte immunoglobulin-like receptor B
MII	Moustiquaire imprégnée d'insecticide
MIPPAD	Malaria in pregnancy preventive alternative drug
MQ	Méfloquine
MQFD	Méfloquine full dose
MQSD	Méfloquine split dose
N	Azote
NK	Natural killer

NO	Oxyde Nitrique
npRBC	Globule rouge non parasité
O	Oxygène
OMS	Organisation mondiale de la santé
OR	Odd ratio
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PMA	Procréation médicalement assistée
PNLP	Programme national de lutte contre le paludisme
PR	Parasite rate
pRBC	Parasited red blood cell
Q25	1 ^{er} quartile, valeur divisant la distribution en 2 parties : 25% et 75%
Q50	2 ^{ème} quartile, médiane de la distribution
Q75	3 ^{ème} quartile, valeur divisant la distribution en 2 parties : 75% et 25%
RES	Reticuloendothelial system
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RGPH	Recensement général de la population et de l'habitation
SA	Semaine d'aménorrhée

sHLA-G	Soluble human leukocyte antigen-G
SNC	Système nerveux central
SP	Sulfadoxine-pyriméthamine
SR	Spleen rate
TDR	Test de diagnostic rapide
THA	Trypanosomose humaine africaine
TNF	Tumor necrosis factor
Tolimmunpal	Tolérance immunitaire et paludisme
TPI	Traitement préventif intermittent
TSP	Thrombospondin
UTR	Untranslated region
URR	Upstream regulatory region
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine acquise

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des niveaux d'endémicité du paludisme (Organisation Mondiale de la Santé 2013)

Tableau 2 : Évolution des indicateurs de lutte contre le paludisme au Bénin (Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) 2011, Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) 2014, Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) 2015)

Tableau 3 : Caractéristiques de la population d'étude à Tori-Bossito

Tableau 4 : Distribution des nouveau-nés et du critère BIC en fonction du nombre de trajectoires

Tableau 5 : Facteurs associés à l'évolution de HLA-G chez les enfants de 3 à 12 mois : analyse univariée du modèle à 3 classes

Tableau 6 : Facteurs associés à l'évolution de HLA-G chez les enfants de 3 à 12 mois : analyse multivariée du modèle à 3 classes

Tableau 7 : Facteurs associés à l'évolution de HLA-G chez les enfants de 3 à 12 mois : analyse multivariée du modèle à 4 classes

Tableau 8 : Distribution des 165 enfants de l'échantillon en fonction des différentes trajectoires

Tableau 9 : Caractéristiques de la population d'étude (Tolimmunpal)

Tableau 10 : Niveau de HLA-G à chaque mois de grossesse

Tableau 11 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble en début de grossesse (TPI₁), Allada : modèles univarié et multivarié

Tableau 12 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble en milieu de grossesse (TPI 2), Allada : modèles univarié et multivarié

Tableau 13 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble en fin de grossesse (à l'accouchement), Allada : modèles univarié et multivarié

Tableau 14 : Évolution du niveau de HLA-G soluble en fonction de l'âge de l'enfant, par un modèle mixte univarié

Tableau 15 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble de la naissance à 24 mois chez les enfants, Allada : modèles univarié et multivarié

Tableau 16 : Coefficient de corrélation de Spearman entre le niveau de HLA-G maternel et de l'enfant à chaque visite

Tableau 17 : Quartiles de la distribution de HLA-G chez les enfants et les mères pendant tout le suivi de l'étude

Tableau 18 : Niveaux moyens de HLA-G dans les profils maternels et de l'enfant pendant le suivi global

Tableau 19 : Facteurs associés au profil HLA-G soluble de 6 à 24 mois chez les enfants, Allada : modèles univarié et multivarié

Tableau 20 : Facteurs maternels ou de l'enfant associés au délai de survenue de la première infection palustre chez l'enfant

Tableau 21 : Comparaison des caractéristiques des enfants perdus de vue à 12 mois dans l'étude Tolimmunpal à l'échantillon de départ

Tableau 22 : Comparaison des caractéristiques des enfants perdus de vue à 24 mois dans l'étude Tolimmunpal à l'échantillon de départ

Tableau 23 : Distribution des polymorphismes du gène *HLA-G* au sein de notre échantillon

Liste des figures

Figure 1 : Évolution de la susceptibilité au paludisme en fonction de l'âge dans les zones de transmission modérée (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014)

Figure 2 : Répartition des vecteurs potentiels du paludisme à travers le monde (Kiszewski, Mellinger et *al.* 2004).

Figure 3 : Évolution de la prévalence de l'infection par *Plasmodium falciparum* en fonction du taux d'inoculation entomologique annuel dans les populations africaines (Beier, Killeen et *al.* 1999)

Figure 4 : Stabilité de la transmission du paludisme à travers le monde (Kiszewski, Mellinger et *al.* 2004)

Figure 5 : Cycle du *Plasmodium* à l'intérieur de l'homme et du moustique infectés (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014)

Figure 6 : Mécanismes de l'anémie palustre (N: azote; O: oxygène; pRBCs: globules rouges parasités; npRBCs: globules rouges non parasités; RES: système réticulo-endoplasmique)

Figure 7 : Mécanismes physiopathologiques du paludisme grave (ARF : acute renal failure ou insuffisance rénale aigüe, DIC : disseminated intravascular coagulation ou CIVD : coagulation intravasculaire disséminée (Barsoum 2000)

Figure 8 : Localisation et organisation du système HLA sur le chromosome 6 (Klein and Sato 2000)

Figure 9 : Structure des molécules HLA de classe I et de classe II (Chatenoud and Bach 2012)

Figure 10 : Différentes isoformes de HLA-G (Donadi, Castelli et al. 2011)

Figure 11 : Représentation schématique de la structure des isoformes de HLA-G (HoWangYin, Loustau et al. 2012)

Figure 12 : Fonctions immunitaires de HLA-G (Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015)

Figure 13 : Carte du Bénin indiquant la commune de Tori Bossito et la commune d'Allada (Le Port, Cottrell et al. 2012)

Figure 15 : Cartographie de la commune de Tori-Bossito (Pierrat 2010)

Figure 16 : Diagramme de flux de l'étude Tori-Bossito

Figure 17 : Distribution des concentrations brutes de HLA-G maternel à l'accouchement

Figure 18 : Distribution des concentrations brutes de HLA-G dans le sang du cordon à la naissance

Figure 19 : Évolution du niveau de HLA-G chez tous les enfants de 3 à 12 mois.

Figure 20 : Évolution du niveau moyen de HLA-G soluble de 3 à 12 mois chez les enfants

Figure 21 : Modèle à deux classes latentes

Figure 22 : Modèle à trois classes latentes

Figure 23 : Modèle à quatre classes latentes

Figure 24 : Cartographie de la commune de Allada (ERAILS 2014)

Figure 25 : Évolution du niveau de HLA-G soluble au cours de la grossesse chez 400 femmes enceintes de la commune d'Allada, Bénin

Figure 26 : Évolution du niveau moyen de HLA-G soluble chez 400 enfants de 0 à 24 mois à Allada

Figure 27 : Évolution du niveau moyen de HLA-G soluble observé chez les enfants de poids de naissance normal et les enfants de faible poids de naissance

Figure 28 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « très bas »
Figure 29 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « bas »

Figure 29 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « bas »

Figure 30 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « haut »

Figure 31 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « très haut »

Figure 32 : Évolution de la courbe de survie en fonction des niveaux de HLA-G maternel à l'inclusion en début de grossesse

Figure 33 : Répartition des enfants sortis de l'étude Tolimmunpal après 12 mois de suivi

Figure 34 : Évolution comparée des niveaux de HLA-G soluble entre Tori-Bossito et Allada

Introduction

Les principales causes de mortalité dans le monde sont diversement réparties. Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2012, la plupart des décès dans les pays à revenus élevés ou intermédiaires seraient d'origine cardiovasculaire. Dans les pays à faible revenu par contre, la mortalité est essentiellement liée aux maladies infectieuses telles que les infections des voies respiratoires, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine acquise (VIH) et le paludisme (World Health Organization. 2015). En Afrique sub-saharienne, le paludisme est en 2015 l'une des principales causes de mortalité et un enfant meurt de paludisme toutes les deux minutes (World Health Organization. 2015). Les réponses cliniques des personnes infectées sont très diverses et de nombreux facteurs interviennent dans cette variabilité. Ils peuvent être environnementaux (Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012, Reiner, Geary et *al.* 2015), liés à l'hôte comme son patrimoine génétique (Lelliott, McMorran et *al.* 2015), au parasite (espèce, diversité génétique) ou encore aux pathologies associées (Naing, Sandhu et *al.* 2016). D'après l'OMS, les femmes enceintes, les enfants de moins de cinq ans, les sujets infectés par le VIH et les personnes non immunisées sont les populations les plus à risque et peuvent développer les formes graves de la maladie. Chez les femmes enceintes, la survenue d'une infection palustre au cours de la grossesse est responsable d'une augmentation de la mortalité périnatale. Elle peut entraîner une anémie sévère ou aggraver une anémie préexistante, provoquer une fausse couche et dans certains cas une infection palustre placentaire (Desai, ter Kuile et *al.* 2007, Uneke 2007). L'infection palustre (périphérique ou placentaire) de la mère est souvent associée à un risque élevé de faible poids de naissance survenant soit par retard de croissance intra-utérin et/ou

par une naissance prématurée (Cottrell, Mary et *al.* 2007, Moya-Alvarez, Abellana et *al.* 2014, Huynh, Cottrell et *al.* 2015). Les conséquences sont extrêmement graves puisque dans les pays en développement 60 à 80% des nouveau-nés qui décèdent durant la période néonatale sont des enfants nés avec un FPN (Lawn, Cousens et *al.* 2005). Dans certains cas, le nouveau-né peut présenter une infection palustre congénitale ou une anémie durant les premiers mois de vie (Uneke 2007, Uneke 2007, Moya-Alvarez, Abellana et *al.* 2014, Accrombessi, Ouedraogo et *al.* 2015). L'infection palustre pendant la grossesse participe ainsi de manière importante à l'augmentation de la mortalité et de la morbidité péri et post-natales.

Mais le paludisme gestationnel peut avoir des conséquences à plus long terme sur l'enfant. Plusieurs auteurs rapportent que les enfants nés d'un placenta infecté par *P. falciparum* seraient plus sensibles à l'infection palustre, sensibilité qui s'exprime par un délai de première infection plus court que pour les enfants nés de mères non infectées pendant la grossesse (Le Hesran, Cot et *al.* 1997, Mutabingwa, Bolla et *al.* 2005, Schwarz, Adegnika et *al.* 2008, Le Port, Watier et *al.* 2011). Bien évidemment les conditions environnementales, en tête desquelles le risque de piqûre par le vecteur, peuvent jouer un rôle prépondérant dans ces différences, mais il a été montré récemment que l'effet de l'infection placentaire demeurerait, malgré une prise en compte très précise de ce risque environnemental, confirmant la réalité de ces deux facteurs de risque (Le Port, Watier et *al.* 2011, Le Port, Cottrell et *al.* 2013). L'hypothèse d'une tolérance immunitaire au paludisme induite par cette infection placentaire a largement été évoquée pour expliquer cette sensibilité accrue du nouveau-né à l'infection (Le Hesran, Cot et *al.* 1997, Malhotra, Dent et *al.* 2009, Le Port, Watier et *al.* 2011). Néanmoins, le mécanisme de cette tolérance immunitaire reste encore flou et peu documenté.

La tolérance immunitaire se définit par la capacité d'un système immunitaire à ne manifester aucune réaction agressive vis-à-vis d'un antigène avec lequel il a été au préalable en contact (Chatenoud and Bach 2012). Elle existe naturellement dans l'organisme humain et permet le non-rejet des antigènes du soi. La situation où l'existence de cette tolérance immunitaire est indéniable est la grossesse puisque c'est ce phénomène qui permet le maintien de l'allogreffe fœtale et le déroulement d'une grossesse normale. La principale molécule, connue jusque là responsable de cette tolérance immunitaire materno-foetale est une molécule HLA de classe I non classique, HLA-G : Human Leukocyte Antigen G (Carosella, Dausset et al. 1999, Carosella, Rouas-Freiss et al. 1999, Rouas-Freiss, Khalil-Daher et al. 1999, Kamishikiryo and Maenaka 2009, Amodio, de Albuquerque et al. 2014, Carosella 2014, Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015). Elle a donc été amplement décrite chez la femme enceinte, dans la tolérance foeto-maternelle, processus grâce auquel le produit de conception d'une grossesse n'est pas rejeté par le système immunitaire de la mère (Rouas-Freiss, Kirszenbaum et al. 1997, Hunt, Petroff et al. 2005, Hviid 2006, Rizzo, Andersen et al. 2009, Carosella 2014, Dahl, Djurisic et al. 2014, Abediankenari, Farzad et al. 2015). L'expression élevée de HLA-G est donc indispensable à la mise en place d'une grossesse et constitue un important indicateur du pronostic de cette grossesse. En médecine de la reproduction, le dosage de HLA-G est très souvent utilisé dans la prise en charge des troubles de la fertilité, notamment comme facteur de réussite des fécondations *in vitro* (FIV) (Roussev and Coulam 2007, Warner, Lampton et al. 2008, Kotze, Kruger et al. 2013). En dehors du processus physiologique de la grossesse, HLA-G a été également étudié dans de nombreuses situations pathologiques au cours desquelles une tolérance immunitaire est décrite. HLA-G représente ainsi un important facteur de surveillance en transplantation d'organes, où sa production est souvent associée à bonne acceptation des greffes

d'organe (Deschaseaux, Delgado et al. 2011, Rebmann, Nardi et al. 2014). La protéine HLA-G a été étudiée dans plusieurs cancers (Amiot, Ferrone et al. 2011, Rouas-Freiss, Moreau et al. 2014), maladies auto-immunes et inflammatoires (Rizzo, Bortolotti et al. 2014). En infectiologie, diverses investigations ont été réalisées concernant les pathologies bactériennes et virales (Amiot, Vu et al. 2014, Rizzo, Bortolotti et al. 2014), alors que les études sur le rôle de HLA-G dans les infections parasitaires sont peu nombreuses et sont surtout axées sur la toxoplasmose. Dans le cas du paludisme et des autres maladies infectieuses tropicales, très peu d'études existent.

Compte tenu du rôle important que joue HLA-G dans la tolérance immunitaire et son implication dans nombre de pathologies, il nous est apparu important d'explorer le rôle éventuel de cette protéine dans la tolérance immunitaire associée à l'infection palustre placentaire de la mère.

Une des questions qui se posent est celle de la spécificité de cette tolérance dans le cadre de l'infection palustre placentaire. Cette interrogation est d'autant plus pertinente qu'une étude a montré que les enfants nés d'un placenta infecté par *P. falciparum* sont non seulement plus susceptibles aux infections palustres, mais également plus à risque face aux infections non palustres (Rachas, Le Port et al. 2012). Un phénomène similaire est décrit pour les infections helminthiques puisque des femmes enceintes porteuses d'helminthes donnent également naissance à des nouveau-nés plus sensibles aux infections helminthiques durant leur jeune âge (Mehta, Rodriguez et al. 2012). Les conclusions de ces différentes études convergent vers une modification du développement immunitaire fœtal. Étant donné le rôle majeur joué par la molécule HLA-G dans le contrôle de la réponse immunitaire

(Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015) l'hypothèse selon laquelle HLA-G pourrait jouer un rôle dans ces phénomènes doit être explorée.

Notre hypothèse de travail est que chez certaines femmes enceintes, l'infection placentaire ou périphérique par *P. falciparum* déclencherait une surexpression de HLA-G entraînant une inhibition de sa réponse immune spécifique. Cette inhibition, partielle, entraînerait une diminution du niveau d'anticorps (Ac) spécifiques de *P. falciparum* et donc une transmission moins importante de ses Ac vers son fœtus. Corollaire de cela le nouveau-né sera plus sensible aux infections durant les premiers mois de vie, comme cela a été montré. Dans certains cas, la surexpression de HLA-G chez la mère peut entraîner une transmission plus élevée de HLA-G soluble qui serait responsable d'une inhibition de la réponse immune du nouveau-né, entretenant ainsi une plus grande sensibilité à l'infection. Enfin, le polymorphisme du gène *HLA-G* pourrait également être responsable du maintien de cette surexpression et entretenir aussi une plus grande sensibilité à l'infection au cours des premières années de vie.

Si notre hypothèse de travail se confirmait, l'infection placentaire, conséquence d'une infection palustre au cours de la grossesse, pourrait n'être que le marqueur d'un phénomène biologique non spécifique de *P. falciparum* et plus étendu.

L'objectif général de cette thèse, sera de déterminer le rôle de la protéine HLA-G dans la tolérance immunitaire induite par le paludisme gestationnel. De manière plus spécifique nous prévoyons :

1. D'étudier l'évolution de HLA-G soluble chez la femme au cours de la grossesse, et les différents facteurs associés,
2. D'étudier l'évolution de HLA-G soluble chez l'enfant au cours des premières années de vie, et les différents facteurs associés et

3. De rechercher l'association entre la molécule HLA-G et le paludisme de la mère au cours de la grossesse et des deux premières années de vie de l'enfant.

Les analyses pour atteindre ces différents objectifs ont été réalisées sur des populations issues de deux cohortes suivies dans le sud du Bénin.

Dans ce document, seront abordées dans un premier chapitre, une présentation du paludisme et de la protéine HLA-G, ainsi que la problématique de la thèse. Dans les deuxième et troisième chapitres, nous présenterons successivement les deux cohortes, avec pour chacune d'elle la description de la méthodologie utilisée et les résultats obtenus. La dernière partie sera consacrée à la discussion générale des résultats.

Chapitre 1 : Généralités et problématique

Dans ce premier chapitre, nous présenterons quelques généralités sur le paludisme, son épidémiologie, ses manifestations cliniques et les modalités de prise en charge de la maladie. Nous terminerons par le cas particulier qu'est le paludisme gestationnel et notamment le paludisme placentaire et ses conséquences chez le nouveau-né. En effet, c'est sur le couple mère-enfant que portent nos travaux et plus spécifiquement sur le concept de tolérance immunitaire qui semble induite par l'infection placentaire. Ainsi, à la suite de ces généralités sur le paludisme nous aborderons ce concept de tolérance immunitaire et notamment le rôle de HLA-G, molécule tolérogène reconnue, dans ce phénomène. Nous terminerons ce chapitre par une présentation de la problématique scientifique de cette thèse.

1. Généralités sur le paludisme

1.1 Définition et épidémiologie du paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse parasitaire, causée par des parasites du genre *Plasmodium* (*P.*). Il est endémique dans de nombreuses régions intertropicales et quatre espèces parasitaires sont généralement à l'origine de cette infection chez le sujet humain. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malaria*, *P. ovale* (Crutcher and Hoffman 1996, White, Pukrittayakamee et al. 2014). Depuis les années 2000, une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi*, est retrouvée chez l'homme (Singh, Kim Sung et al. 2004). Initialement décrite dans le paludisme chez le singe, elle est de plus en plus incriminée en Asie du sud-est (Sabbatani, Fiorino et al. 2010, William, Jelip et al. 2014, Cramer 2015, Brock, Fornace et al. 2016). Parmi les diverses espèces plasmodiales, *P. falciparum* et *P. vivax* sont responsables de la majorité des infections, 80% et 15% respectivement (McFee 2013). *Plasmodium falciparum* est responsable des formes les plus graves de la maladie, mais de plus en plus la virulence de *Plasmodium vivax* est démontrée (Milner, Montgomery et al. 2008, Gething, Patil et al. 2011, Battle, Gething et al. 2012).

Le paludisme demeure la parasitose la plus répandue et la plus meurtrière dans le monde. En 2015, l'OMS estimait encore à 3,5 milliards le nombre de personnes à risque d'infection palustre sur la planète. Au cours de l'année 2015, un total de 214 millions de nouveaux cas a été répertorié, répartis dans 106 pays. Malgré la diminution de l'incidence du paludisme de 37% et du taux de la mortalité liée à la maladie de 60% de l'année 2000 à l'année 2015 dans le monde, et l'éradication de l'infection dans certains pays, le paludisme constitue toujours un problème majeur de

santé publique. Environ 438 000 décès sont toujours attribués au paludisme en 2015.

Le continent africain est le plus affecté par le paludisme devant l'Asie et la région méditerranéenne. En effet, 88% du nombre total des nouveaux cas et 90% des décès liés au paludisme surviennent sur le continent (World Health Organization. 2015) où *Plasmodium falciparum* est le parasite le plus rencontré (Crawley, Chu et al. 2010, Gething, Patil et al. 2011, Autino, Noris et al. 2012).

Les nourrissons et les enfants de moins de 5 ans sont les plus fragiles face au paludisme (White, Pukrittayakamee et al. 2014) (Figure 1). Les femmes enceintes, les personnes infectées par le VIH et les sujets non immunisés (voyageurs) (Schlagenhauf, Steffen et al. 2003) ont également un risque plus élevé d'infection et représentent les populations à risque. En 2015, 306 000 décès ont été recensés chez les enfants de moins de 5 ans, dont 292 000 en Afrique et en 2014, 28 millions de femmes enceintes étaient à risque de paludisme (World Health Organization. 2015).

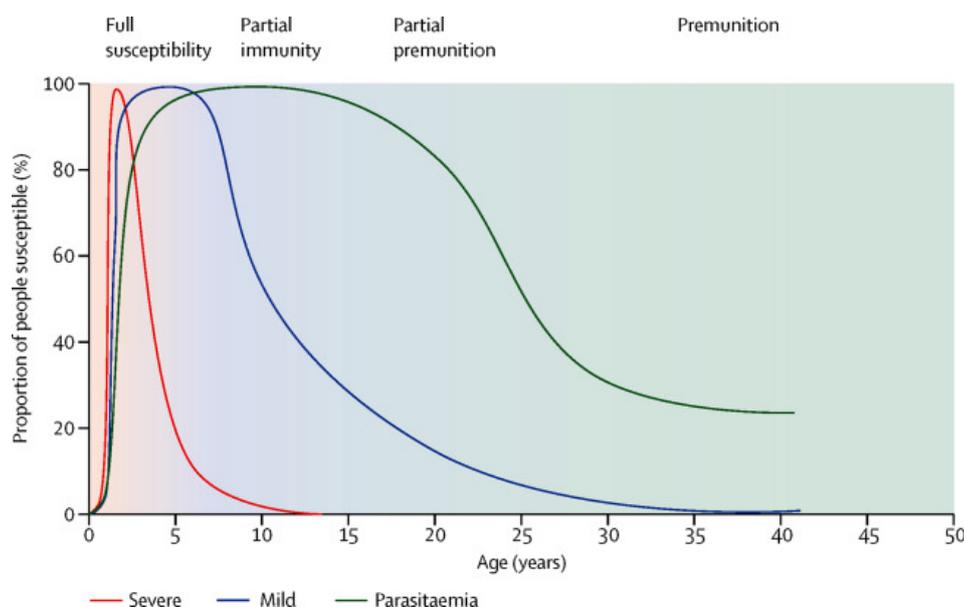


Figure 1 : Évolution de la susceptibilité au paludisme en fonction de l'âge dans les zones de transmission modérée (White, Pukrittayakamee et al. 2014)

1.2 Transmission du paludisme

Dans la plupart des cas, le paludisme se transmet par la piqûre d'un vecteur, le moustique femelle du genre *Anopheles*, (Kuhn, Campbell-Lendrum et al. 2002, Coetzee 2004, Levine, Peterson et al. 2004, Manguin, Garros et al. 2008). Différentes espèces existent dans le monde et peuvent potentiellement transmettre le paludisme (Kiszewski, Mellinger et al. 2004) (Figure 2). En Afrique, les espèces du complexe *Anopheles gambiae* sont les plus représentées (*Anopheles gambiae* s. s. et *Anopheles arbiensis*) (White, Pukrittayakamee et al. 2014) mais *Anopheles funestus* est également présent (Kiszewski, Mellinger et al. 2004). D'autres formes de transmission existent, plus rares : il s'agit de la transfusion par des produits sanguins infectés, ou encore de la transmission materno-fœtale, responsable de paludisme congénital (Trampuz, Jereb et al. 2003, Crawley, Chu et al. 2010).

La transmission du paludisme est un phénomène très complexe et d'intensité variable. Cette variabilité dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être liés à l'hôte (activités nocturnes, mouvements migratoires, activités forestières par exemple), au parasite (différentes espèces, sensibilité aux médicaments, durée du cycle de reproduction), au moustique (densité, durée de vie, site de reproduction) et à l'environnement (végétation, climat, proximité d'un cours d'eau) (Autino, Noris et al. 2012, Rossati, Bargiacchi et al. 2016). Bien évidemment ces différents facteurs interagissent fortement expliquant ainsi la complexité évoquée.

La mesure de la transmission palustre est indispensable pour déterminer le niveau d'endémicité d'une région, ainsi que pour mesurer son évolution et les différentes modifications survenant au cours du temps. Elle permet ainsi de cibler les zones et les périodes où le risque est élevé et d'améliorer ou adapter la prise en charge préventive et curative de l'infection.

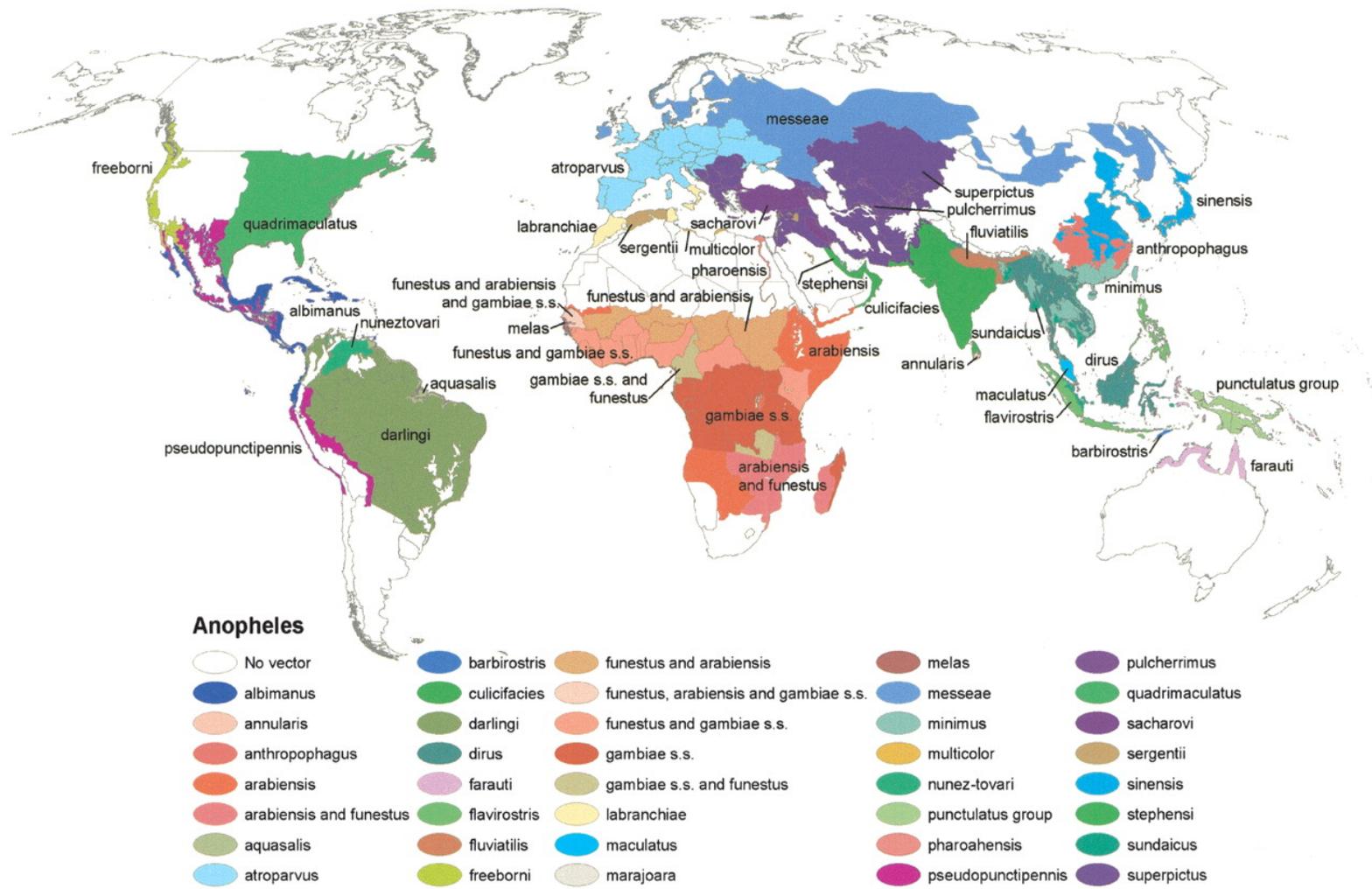


Figure 2 : Répartition des vecteurs potentiels du paludisme à travers le monde (Kiszewski, Mellinger et al. 2004).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer la transmission du paludisme : elles se basent sur différents indicateurs : (i) la prévalence d'individus présentant une splénomégalie clinique palpable dans la population (indice splénique ou *spleen rate* ou *SR*) ; (ii) la prévalence d'infections confirmées en laboratoire (indice plasmodique ou *parasite rate* ou *PR*) ; (iii) le nombre de piqûres infestantes de moustiques par personne (taux d'inoculation entomologique ou *entomological inoculation rate* ou *EIR*) ou encore (iv) le nombre de cas de paludisme confirmés par la microscopie, en une année par unité de population (*annual parasite incidence* ou *API*) (Hay, Smith et *al.* 2008, Autino, Noris et *al.* 2012). Les deux premières méthodes sont généralement évaluées chez les sujets de 2 à 9 ans. Toutefois, leur usage comme indicateur de transmission a été abandonné au profit des mesures entomologiques (Hay, Smith et *al.* 2008, Shukla, Singh et *al.* 2011, Autino, Noris et *al.* 2012, Organisation Mondiale de la Santé 2013). En effet, actuellement, la mesure de la transmission du paludisme se base préférentiellement sur le taux d'inoculation entomologique (Kelly-Hope and McKenzie 2009). Ce paramètre estime le nombre moyen de piqures de moustiques infectés par personne et par unité de temps (Macdonald 1956, Macdonald 1957, Beier, Killeen et *al.* 1999, Kelly-Hope and McKenzie 2009). Il est très variable en Afrique, allant de moins de 1 à plus de 1000 piqures de moustiques infectés par personne et par an en fonction des zones et est fortement corrélé à la prévalence de l'infection par *Plasmodium falciparum* (Beier, Killeen et *al.* 1999) comme le montre la Figure 3.

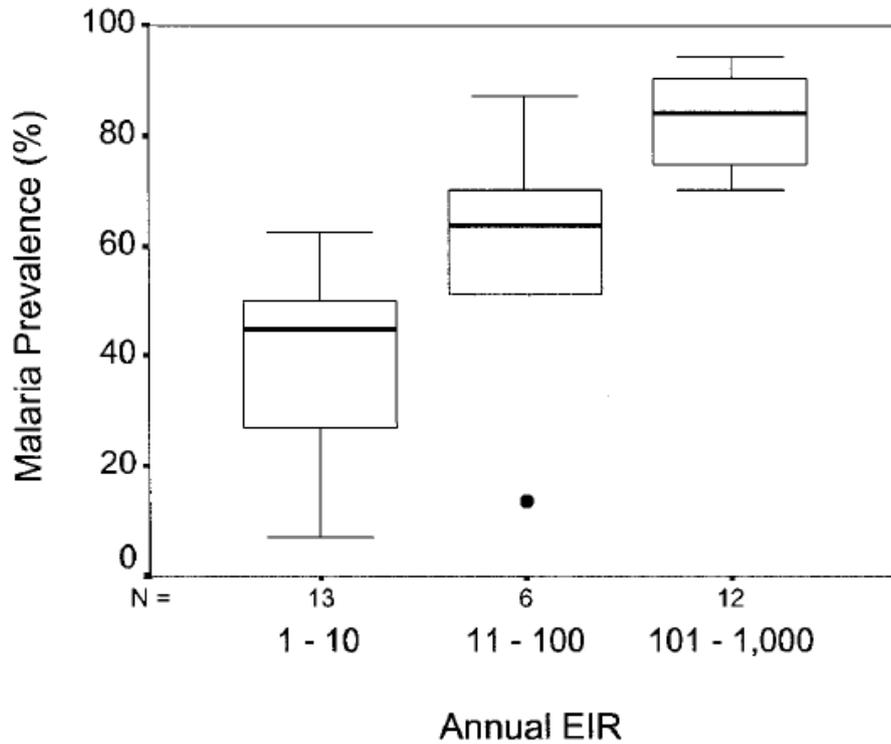


Figure 3 : Évolution de la prévalence de l'infection par *Plasmodium falciparum* en fonction du taux d'inoculation entomologique annuel dans les populations africaines (Beier, Killeen et al. 1999)

Ces différents outils permettent de distinguer quatre niveaux de transmission du paludisme (Organisation Mondiale de la Santé 2013) :

- les zones holoendémiques : la transmission est la plus élevée, survenant toute l'année avec un degré élevé d'immunité dans la population, particulièrement chez les adultes
- les zones hyper-endémiques : la transmission est saisonnière intense, et la maladie présente dans toutes les tranches d'âge ;

- les zones mésoendémiques : l'intensité de la transmission est variable au cours de l'année et cette fluctuation entraîne une prédisposition des populations à des épidémies fréquentes ;
- les zones hypoendémiques : la transmission et le risque sont très faibles.

Une autre classification de la transmission du paludisme existe, basée sur la stabilité de la transmission. Elle permet d'identifier trois zones de transmission :

- les zones sans paludisme,
- les zones de paludisme instable ou épidémique avec des fluctuations annuelles et
- les zones de paludisme stable ou endémique avec une transmission élevée.

Ces deux types de classifications se superposent et sont résumées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Classification des niveaux d'endémicité du paludisme (Organisation Mondiale de la Santé 2013)

Critère	Hypoendémicité	Mésoendémicité	Hyperendémicité	Holoendémicité
Indice splénique chez les 2-9 ans	0-10%	11-50%	Constamment >50-75% (également élevé chez l'adulte et >25%)	Constamment >75% (mais faible chez l'adulte <25%)
Indice plasmodique chez les 2-9 ans	0-10%	11-50%	Constamment >50-75%	Constamment >75% chez les nourrissons âgés de 0-11 mois
Stabilité	Instable	Instable	Stable	Stable
Taux d'inoculation entomologique	<0,25	0,25-10	11-140	>140

Les régions tropicales, notamment la région intertropicale africaine, constituent les lieux où la transmission du paludisme est la plus stable dans le monde (Kiszewski, Mellinger et *al.* 2004), et par conséquent les lieux de prévalence élevée (Figure 4).

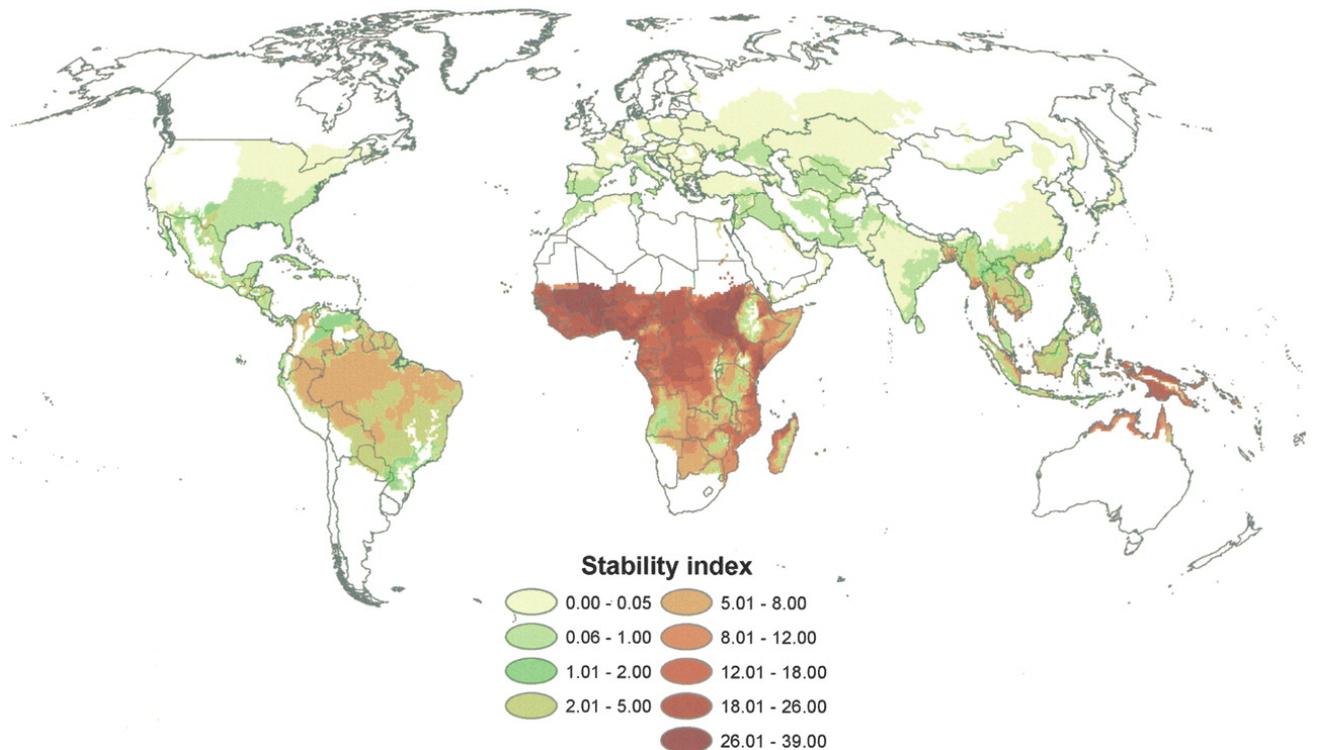


Figure 4 : Stabilité de la transmission du paludisme à travers le monde (Kiszewski, Mellinger et *al.* 2004)

1.3 Physiopathologie du paludisme

Elle décrit les mécanismes biologiques associés à la présence de *Plasmodium* à l'intérieur de l'organisme. Le cycle de vie de *Plasmodium* se répartit en deux phases principales et successives : une à l'intérieur de l'homme (hôte), puis la deuxième chez le moustique vecteur (hôte définitif)(Figure 5).

1.3.1 Chez l'homme

Le moustique femelle infecté transmet le paludisme à l'homme au cours d'un repas sanguin, en injectant des parasites dans le sang veineux sous la forme de sporozoïtes. Ceux-ci passent dans le compartiment hépatique environs trente minutes après (Biamonte, Wanner et *al.* 2013), puis ils se multiplient à l'intérieur des cellules hépatiques (ou hépatocytes) pour donner des cellules filles appelées mérozoïtes. On obtient ainsi des schizontes hépatiques (ou corps bleus) qui éclatent plus tard, en libérant les mérozoïtes dans la circulation sanguine (Miller, Good et *al.* 1994, Biamonte, Wanner et *al.* 2013, White, Pukrittayakamee et *al.* 2014). C'est la phase de schizogonie hépatique. Chaque sporozoïte peut produire en 5-8 jours 10 000 à 30 000 mérozoïtes (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014). Chez les espèces *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*, les sporozoïtes peuvent rester quiescents à l'intérieur des cellules hépatiques, sans se transformer en schizontes : ce sont des hypnozoïtes (Biamonte, Wanner et *al.* 2013, Richter, Franken et *al.* 2016). Ils se réactivent plus tard et génèrent des accès de reviviscence de l'infection. Ce mécanisme est également décrit pour *Plasmodium malariae* et aussi de façon exceptionnelle pour *Plasmodium falciparum* (Richter, Franken et *al.* 2016). La phase hépatique a une durée variable de 5 à 10 jours (Biamonte, Wanner et *al.* 2013).

Une fois libérés dans le sang, les mérozoïtes envahissent les globules rouges. C'est le début de la phase érythrocytaire asexuée. Les mérozoïtes se multiplient rapidement, puis se transforment en trophozoïtes. Il en résulte des schizontes érythrocytaires qui éclatent et libèrent de nouveaux mérozoïtes capables d'infecter de nouveaux globules rouges (Biamonte, Wanner et *al.* 2013, White, Pukrittayakamee et *al.* 2014). Un cycle de schizogonie érythrocytaire dure environ 48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*, 72 heures pour *Plasmodium malariae*, et

seulement 24 heures pour *Plasmodium knowlesi*. Une semaine environ (6 à 8 jours) après le passage des parasites du foie vers la circulation sanguine, ils deviennent détectables à la microscopie (White, Pukrittayakamee et al. 2014).

Au cours d'une infection par *Plasmodium falciparum*, les globules rouges infectés par le parasite ont la capacité d'adhérer aux cellules endothéliales, entraînant leur agrégation et leur séquestration dans la microcirculation sanguine. Cette spécificité des globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum*, est due à la présence d'antigènes parasitaires de type PfEMP1, ayant une grande affinité pour des récepteurs vasculaires de type CD36 (cluster determinant 36), ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), TSP (thrombospondin), CR1 (complement receptor 1), et CSA (chondroïtin sulfate A) (Kraemer and Smith 2006, Pasternak and Dzikowski 2009, Hviid and Jensen 2015). Cette cyto-adhérence est responsable de la virulence de cette espèce plasmodiale et des complications qu'elle génère (Miller, Good et al. 1994, Newbold, Craig et al. 1999, Chakravorty, Hughes et al. 2008, Pasternak and Dzikowski 2009).

Après plusieurs cycles de reproduction asexuée, certains parasites se différencient en cellules sexuelles, les gamétocytes mâles ou femelles, pouvant infecter le moustique (Miller, Good et al. 1994, Biamonte, Wanner et al. 2013, White, Pukrittayakamee et al. 2014).

1.3.2 Chez le moustique

Les gamétocytes sont ingérés par un nouveau moustique. Les gamètes mâle et femelle fusionnent dans le tube digestif de celui-ci, forment un œuf ou zygote qui se transformera successivement en ookinète (forme mobile) puis en oocyste (forme fixée à la paroi digestive). L'oocyste se développe et libère des sporozoïtes qui rejoignent

les glandes salivaires du moustique, d'où ils seront rejetés pour infecter un nouveau sujet chez lequel le cycle se poursuivra (Biamonte, Wanner et al. 2013, White, Pukrittayakamee et al. 2014).

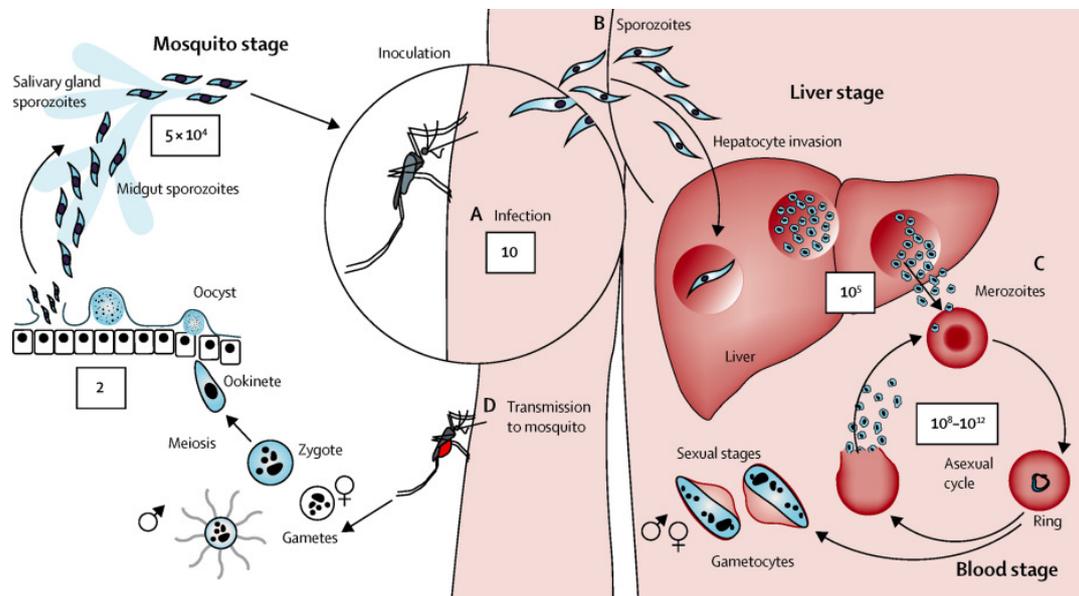


Figure 5 : Cycle du *Plasmodium* à l'intérieur de l'homme et du moustique infectés (White, Pukrittayakamee et al. 2014)

1.4 Manifestations et symptômes du paludisme

Les manifestations cliniques du paludisme découlent de la physiopathologie de la maladie. La période d'incubation est variable et les signes surviennent en moyenne une semaine après la piqûre de moustique (Pasvol 2005, Walker, Nadjm et al. 2010, Bartoloni and Zammarchi 2012). Après l'infection, les manifestations cliniques du paludisme apparaissent progressivement et l'évolution naturelle théorique de la maladie se fait suivant la chronologie suivante: infection, parasitémie asymptomatique, paludisme simple, paludisme grave et décès (World Health Organization 2014). Toutefois, le risque d'infection palustre et les manifestations cliniques dépendent de plusieurs facteurs comme l'âge, le degré d'immunité, l'espèce plasmodiale en cause, mais aussi de l'accessibilité et de la mise en route d'un

traitement efficace (World Health Organization 2000, World Health Organization 2014).

1.4.1 L'accès palustre simple ou paludisme non compliqué

1.4.1.1 Signes cliniques

Le paludisme simple ou accès palustre simple est la forme clinique la plus fréquente. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques et sont fréquemment à l'origine d'erreur de diagnostic. Ils imitent généralement un tableau pseudo-grippal et sont la conséquence de la rupture des schizontes et de la destruction des globules rouges (Trampuz, Jereb et *al.* 2003, Bartoloni and Zammarchi 2012). La manifestation clinique la plus commune du paludisme est la fièvre, inconstante, qui peut être absente à l'examen clinique (Walker, Nadjm et *al.* 2010, White, Pukrittayakamee et *al.* 2014). Elle est souvent associée à une absence de bien-être ou une sensation de malaise général, des frissons, de la fatigue, des céphalées, des douleurs musculaires et/ou articulaires, une perte d'appétit, et un inconfort abdominal. Il peut être évoqué une notion de signes digestifs (nausées, vomissements ou diarrhées), des signes respiratoires (toux) ou un ictère (Pasvol 2005, White, Pukrittayakamee et *al.* 2014, Lalloo, Shingadia et *al.* 2016). A l'interrogatoire, le patient décrit une fièvre, survenant généralement sous forme d'épisodes paroxystiques rythmés : l'épisode démarre par une sensation de froid accompagnée de frissons, puis s'en suit une fièvre élevée, parfois supérieure à 40 degrés Celsius (°C). Cet épisode s'achève par une phase de transpirations avec sueurs. Les épisodes surviennent à une fréquence de 48 à 72 heures en fonction des espèces : 48 heures (fièvre tierce) pour les infections par

P. falciparum, *P. vivax* et *P. ovale* et 72 heures (fièvre quarte) pour *P. malariae* (Ashley, McGready et al. 2006).

L'examen clinique peut objectiver la fièvre, la présence d'une hépatomégalie ou d'une splénomégalie (surtout chez les enfants), une tachycardie, un ictère, une pâleur cutanéomuqueuse ou une hypotension orthostatique (Trampuz, Jereb et al. 2003, Lalloo, Shingadia et al. 2016). L'examen peut retrouver aussi une fièvre isolée (Trampuz, Jereb et al. 2003). Le diagnostic de paludisme doit être suspecté devant ces signes, notamment en zone d'endémie palustre, et doit motiver la réalisation d'examens biologiques permettant de confirmer ou d'infirmer la présence de parasites. Chez les sujets non originaires des zones endémiques, on doit systématiquement rechercher une notion de voyage récent en zone d'endémie palustre.

1.4.1.2 Diagnostic biologique

Devant un tableau clinique évocateur d'infection palustre, des examens complémentaires biologiques doivent être réalisés. Plusieurs méthodes sont utilisées.

La plus classique et la plus utilisée, demeure le diagnostic microscopique. Il consiste en la réalisation d'une goutte épaisse (GE). Elle se fait à partir d'une goutte de sang, obtenue en piquant le bout d'un doigt, qu'on étale sur une lame de verre. La lecture se fait après coloration par le Giemsa (Tangpukdee, Duangdee et al. 2009, White, Pukrittayakamee et al. 2014). Cette technique demeure la méthode standard de diagnostic du paludisme. Elle est facile à réaliser, peu coûteuse et permet d'objectiver la présence de parasites, l'espèce en cause ainsi que la densité parasitaire (DP). Un frottis mince peut également être réalisé pour une détermination plus sûre de l'espèce concernée. Néanmoins, la goutte épaisse est peu efficace en cas de très faible

parasitémie et nécessite une mise en œuvre logistique et une maîtrise technique (disponibilité d'un laboratoire et d'un manipulateur) (Tangpukdee, Duangdee et *al.* 2009). Elle détecte une infection en moyenne à partir de 10 à 30 parasites/ μ l de sang (Montoya, Menco et *al.* 2008).

Il existe des tests de diagnostic rapide (TDR), d'utilisation facile qui n'implique pas la présence d'un technicien de laboratoire. Les TDR sont basés sur le principe de détection d'un antigène parasitaire. Celui-ci peut être spécifique d'une espèce plasmodiale donnée ou commun à plusieurs espèces, permettant ainsi le diagnostic d'infection palustre mixte. L'utilisation des TDR a permis de grandes avancées car elle réduit le délai de prise en charge du malade, et est d'une grande utilité dans les zones rurales des pays peu avancés, ne disposant souvent pas de laboratoire d'analyse (Tangpukdee, Duangdee et *al.* 2009). Toutefois, même si les TDR ont une bonne sensibilité comparativement à la goutte épaisse, celle-ci diminue en cas de faibles parasitémies (Murray, Gasser et *al.* 2008, Larreche, Rapp et *al.* 2014).

De plus en plus, des méthodes de diagnostic moléculaire telles que la PCR (polymerase chain reaction) sont utilisées pour mettre en évidence le parasite. La PCR est une technique mettant en évidence l'ADN parasitaire qui est plus sensible et donc plus efficace que les précédentes en cas de faibles parasitémies et d'infection mixte. Elle est utilisée fréquemment lors de l'étude de la réponse thérapeutique et de la résistance aux médicaments antipaludiques. La spécificité et la sensibilité de cette méthode restent les plus performantes actuellement, permettant la détection d'une densité parasitaire de 1 à 5 parasites/ μ l de sang (Tangpukdee, Duangdee et *al.* 2009). Toutefois cette méthode n'est de nos jours pas utilisable en diagnostic de routine dans un laboratoire simplement équipé.

D'autres méthodes sont parfois utilisées : tests sérologiques, spectrométrie de masse, cytométrie en flux (Tangpukdee, Duangdee et al. 2009).

Une fois le diagnostic de paludisme établi, un traitement doit être mis en place rapidement. Dans le cas contraire, l'accès simple peut évoluer vers des formes graves de paludisme (Pasvol 2005, Ashley, McGready et al. 2006).

1.4.2 Le paludisme grave ou sévère

Les formes cliniques graves de l'infection palustre sont causées par *P. falciparum* la plupart du temps, parfois par *Plasmodium vivax* ou par *Plasmodium knowlesi* (Trampuz, Jereb et al. 2003, Bartoloni and Zammarchi 2012, Naing, Whittaker et al. 2014). En zone de transmission palustre élevée, le paludisme grave touche surtout les enfants de moins de 5 ans et beaucoup moins les autres tranches de la population, chez qui l'immunité anti-palustre partielle a eu le temps de se mettre en place. Dans les régions de transmission instable, les adultes et les enfants peuvent tous développer une infection grave (World Health Organization 2000, Trampuz, Jereb et al. 2003). Une autre population à risque est constituée par les sujets non immuns vivant habituellement en territoire indemne de paludisme. Mais si les enfants et les adultes peuvent tous être atteints, il existe des différences liées à l'âge (Dondorp, Lee et al. 2008).

Un sujet atteint de paludisme, qui se trouve dans l'incapacité de suivre une médication orale, a un grand risque de présenter des signes de défaillance vitale. Les critères de gravité du paludisme ont été identifiés et mis à jour par l'OMS en 2000 (World Health Organization 2000). Le paludisme sévère est suspecté devant des signes cliniques évocateurs associés à un ou plusieurs symptômes (Pasvol 2005) dont les plus fréquents sont un coma et/ou une anémie sévère.

Un coma profond est témoin d'une infection cérébrale ou neuropaludisme. Le neuropaludisme doit être évoqué après l'élimination de toutes autres causes infectieuses et non infectieuses de perte de conscience. Le coma peut être associé à des crises convulsives généralisées et répétitives (au moins deux crises en 24 heures). Le paludisme cérébral survient plusieurs jours après le début de la maladie chez les adultes alors que chez les enfants l'installation peut être plus rapide (World Health Organization 2000). Il s'agit d'une encéphalopathie diffuse qui se manifeste par une crise convulsive généralisée suivie d'une longue perte de la conscience (World Health Organization 2000, Hora, Kapoor et *al.* 2016). Le tableau clinique du neuropaludisme peut varier en fonction de l'âge du malade (Olliaro 2008). La mortalité liée au paludisme cérébral peut être très élevée et les séquelles en cas de guérison peuvent être importantes (Bartoloni and Zammarchi 2012, Hora, Kapoor et *al.* 2016). Les manifestations du neuropaludisme découlent de différents mécanismes physiopathologiques. Une première explication est l'adhérence des globules rouges infectés aux cellules endothéliales cérébrales, via un certain nombre de récepteurs spécifiques, responsable de leur agglutination et de leur séquestration au niveau des micro-vaisseaux. La diminution de la perfusion sanguine entraîne une hypoxie du cerveau et est favorable à la prolifération des parasites *in situ* (Dondorp, Kager et *al.* 2000, Hora, Kapoor et *al.* 2016). D'autres mécanismes interviendraient également dans ce tableau clinique comme la perte d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, garant de l'homéostasie et de l'intégrité du système nerveux central, (Brown, Hien et *al.* 1999, Brown, Rogerson et *al.* 2001, Medana and Turner 2006). L'interruption de la barrière hémato-encéphalique s'accompagne du passage de substances, normalement absentes telles que les toxines parasitaires, à l'intérieur du compartiment cérébral. De nombreux autres mécanismes sont impliqués à savoir l'activation des cellules endothéliales, l'activation des plaquettes et la formation

d'agrégats plaquettaires, des phénomènes inflammatoires avec une perturbation de la production de cytokines (Mackintosh, Beeson et *al.* 2004, Ioannidis, Nie et *al.* 2014, Hora, Kapoor et *al.* 2016). Le paludisme cérébral est associé à une mortalité importante. Son diagnostic peut être post-mortem avec la mise en évidence, à l'autopsie, de lésions et d'hémorragies méningées et de globules rouges séquestrés dans les vaisseaux capillaires (World Health Organization 2000, Storm and Craig 2014).

L'anémie sévère liée au paludisme est définie par une anémie normocytaire avec un hémocrite inférieur à 15% ou un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g/dl, associée à une parasitémie supérieure à 10 000 parasites/ μ l. C'est l'une des complications les plus fréquentes en Afrique qui témoigne d'une parasitémie importante (World Health Organization 2000). Les causes de l'anémie dans l'infection palustre sont multiples. Elle est due à la fois à une augmentation de la destruction des globules rouges, soit par lyse des hématies parasitées, soit par destruction au niveau de la rate, et/ou à une diminution de leur production liée à un dysfonctionnement de la moelle osseuse associé à l'action de protéines de l'inflammation (Mackintosh, Beeson et *al.* 2004, McDevitt, Xie et *al.* 2004). Toutes ces étiologies peuvent s'imbriquer et interagir avec des infections bactériennes ou virales concomitantes (Perkins, Were et *al.* 2011). Il faut par ailleurs noter que les sujets vivants en zone d'endémie palustre sont très souvent porteurs d'un déficit en fer et/ou d'hémoglobinopathies, constituant eux-mêmes des causes majeures d'anémie (Nweneka, Doherty et *al.* 2010, Perkins, Were et *al.* 2011). Un autre mécanisme, faisant intervenir l'oxyde nitrique (NO) est décrit avec une altération du métabolisme cellulaire du fer, participant ainsi à l'anémie du paludisme (Pradhan 2009). La Figure 6 présente un récapitulatif des mécanismes connus de l'anémie due à l'infection palustre.

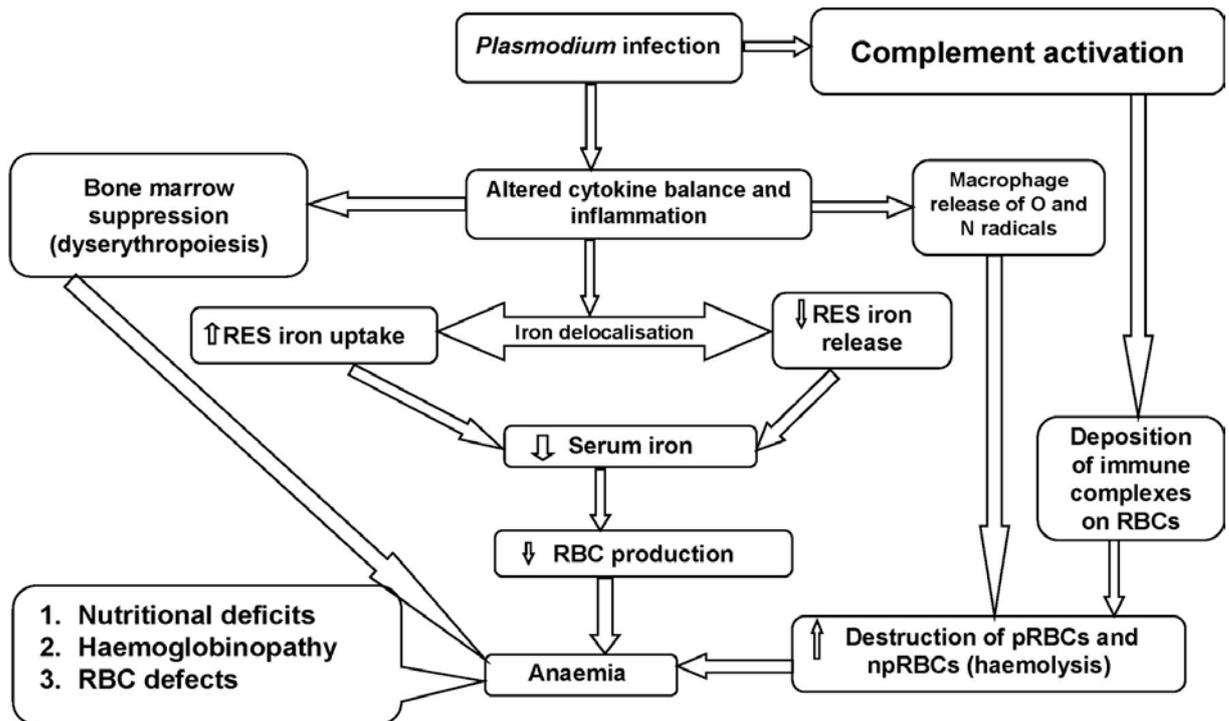


Figure 6 : Mécanismes de l’anémie palustre (N: azote; O: oxygène; pRBCs: globules rouges parasités; npRBCs: globules rouges non parasités; RES: système réticulo-endoplasmique) (Nweneka, Doherty *et al.* 2010)

A côté de ces deux tableaux cliniques majeurs, d’autres signes associés à une infection palustre doivent faire porter le diagnostic de paludisme sévère. Il s’agit d’une hyperparasitémie (>4% d’hématies parasitées chez le sujet non immun et > 20% en zone d’endémie), d’une insuffisance rénale aiguë, d’un œdème pulmonaire ou d’un syndrome de détresse respiratoire, d’une hypoglycémie, d’un état de choc, d’une coagulation intra-vasculaire disséminée, d’une acidose métabolique, d’une hémoglobinurie macroscopique. On peut également rencontrer parfois des troubles de la conscience sans coma, un ictère, une hyperlactatémie (World Health Organization 2000).

La confirmation du diagnostic doit impérativement se faire par la mise en évidence de parasites dans le sang.

La physiopathologie du paludisme est donc extrêmement complexe. De nombreux mécanismes interviennent et interagissent entretenant une sorte de cercle vicieux de l'infection. Ils sont résumés dans la Figure 7. Cependant, le mécanisme prédominant et central dans l'infection par *P. falciparum* reste la cyto-adhérence des hématies parasitées, conduisant à des troubles de la circulation et une réponse inflammatoire importante, fortement impliqués dans les formes sévères (Hviid and Jensen 2015).

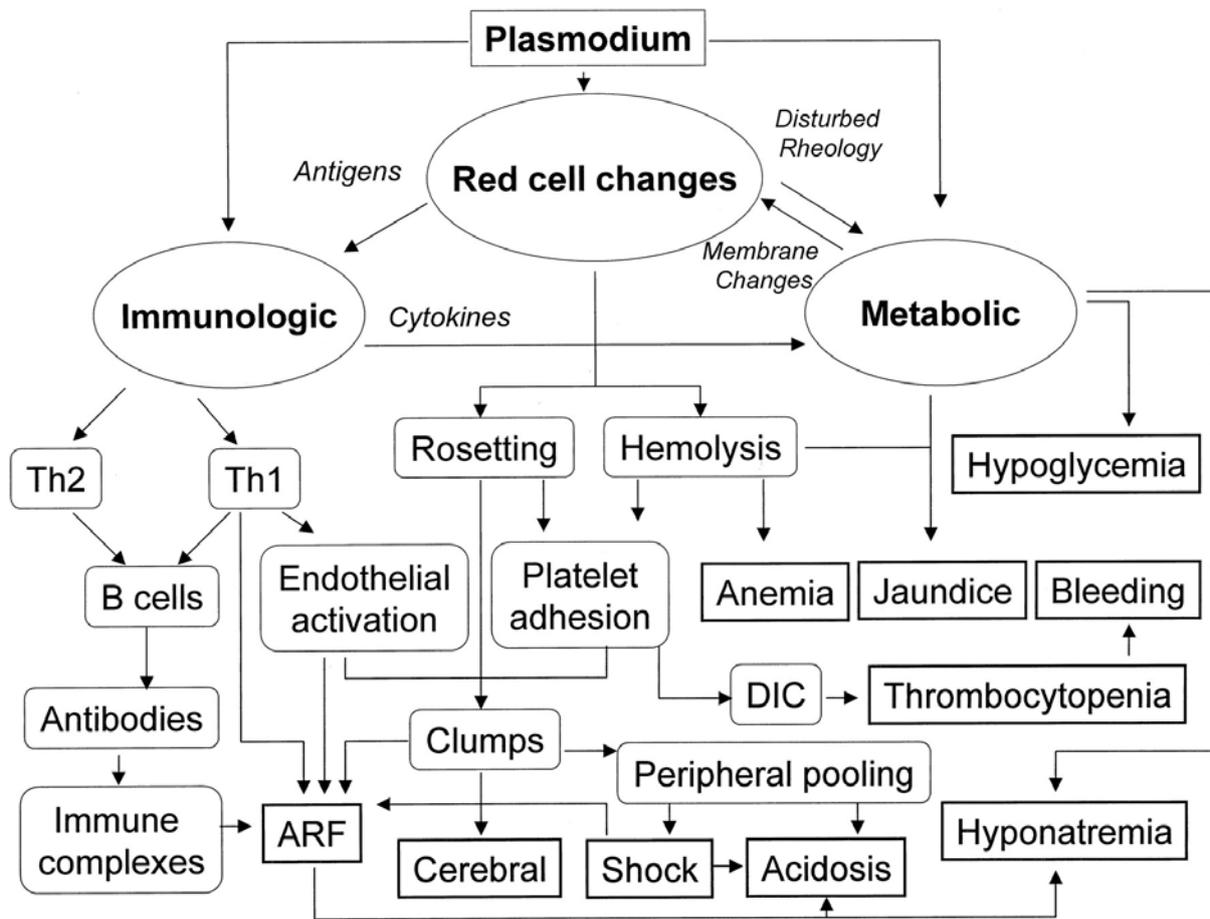


Figure 7 : Mécanismes physiopathologiques du paludisme grave (ARF : acute renal failure ou insuffisance rénale aigüe, DIC : disseminated intravascular coagulation ou CIVD : coagulation intravasculaire disséminée (Barsoum 2000)

Si le paludisme est une pathologie pouvant toucher toutes les tranches d'âge, certaines catégories de personnes restent plus fragiles quel que soit le niveau de transmission. C'est le cas des enfants et des femmes enceintes qui seront abordés à la fin de ce chapitre.

1.5 Prise en charge du paludisme

1.5.1 Traitement curatif

Le traitement du paludisme dépend de la gravité de l'infection. En cas de paludisme simple, l'OMS recommande un traitement avec des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014) sauf chez la femme enceinte (World Health Organization 2015). Les présentations disponibles contiennent un dérivé de l'artémisinine (artésunate, artéméther, or dihydro-artémisinine) et un autre antipaludéen à dose fixe (luméfántrine, amodiaquine, pipéraqúine par exemple). Ils sont administrés en un traitement de trois jours. La résistance à l'artémisinine est déjà notifiée en Asie du Sud Est et il est impératif d'intensifier la recherche de nouvelles molécules (Pantaleo, Pau et *al.* 2015). Il existe par ailleurs d'autres associations médicamenteuses telles que la combinaison Atovaquone–proguanil qui sont efficaces (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014).

Le traitement du paludisme doit être une urgence médicale. En cas de paludisme grave, le traitement se fait par voie parentérale. La molécule de choix est l'artésunate, remplacée par l'athéméther ou la quinine lorsqu'elle n'est pas disponible (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014, World Health Organization 2015). La prise en charge doit être pluridisciplinaire à cause de l'atteinte multi-organique.

1.5.2 Mesures préventives

L'utilisation de mesures préventives contre l'infection du paludisme a largement montré son efficacité, tant au niveau individuel qu'au niveau collectif. Les mesures préventives passent essentiellement par la lutte anti-vectorielle. Pour y parvenir, l'Organisation Mondiale de la Santé recommande l'usage de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides. La mise en œuvre de ces mesures a montré son efficacité, notamment chez les enfants (White, Pukrittayakamee et *al.* 2014) et les femmes enceintes (Takem and D'Alessandro 2013) avec une baisse significative du taux de mortalité. En Afrique sub-saharienne 55% de la population dormirait sous MII (World Health Organization. 2015). Malgré le développement de la résistance des vecteurs aux insecticides, l'usage des moustiquaires n'est pas totalement inefficace.

A la lutte anti-vectorielle, s'ajoutent les traitements de prévention. Ils ont préconisés par l'OMS chez la femme enceinte et, chez les enfants de moins de cinq ans, en cas de paludisme saisonnier (World Health Organization. 2015). L'antipaludique recommandé est l'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

Pour les femmes enceintes, au début des années 2000, l'OMS a recommandé l'usage d'un traitement préventif intermittent (TPI) du paludisme en remplacement de la chloroquine, sujet à une importante chimiorésistance du parasite, dans les zones de transmission palustre élevée. Les premières recommandations étaient de deux prises de SP à la dose de 1500/75 mg en prise unique. La première prise à partir du second trimestre (au moins à 13 semaines d'aménorrhée) lorsque la mère ressent les premiers mouvements du bébé et la seconde un mois après au plus tôt. Plusieurs questions se posent puisque la SP est d'ores et déjà soumise à une forte résistance de *P. falciparum* (Kumar, Moirangthem et *al.* 2015) d'une part et, d'autre part, car ce

schéma ne prévient pas les infections précoces qui, nous l'avons signalé, peuvent être associées à un faible poids de naissance (Cottrell, Mary et *al.* 2007). Concernant les résistances, peu de molécules de substitution existent. La méfloquine, malgré les questions posées sur son utilisation chez la femme enceinte est l'une d'elles (Briand, Escolano et *al.* 2015). A ce jour deux essais cliniques ont été réalisés pour comparer la méfloquine (MQ) à la SP. La première étude a été réalisée au Bénin de juillet 2005 à avril 2008 et visait à évaluer l'efficacité de la méfloquine pour le traitement préventif intermittent du paludisme pendant la grossesse (Briand, Bottero et *al.* 2009). Un total de 1601 femmes a été randomisé en deux groupes : un groupe de 802 femmes recevant de la méfloquine et un groupe de 799 femmes traitées avec de la sulfadoxine-pyriméthamine. Au cours de cet essai, la prévalence de l'infection placentaire était plus faible dans le groupe MQ (1,7%) que dans le groupe SP (4,4%) ($p=0,005$) de même que la prévalence des infections palustres (26 cas versus 68 pour 10000 personnes-mois, $p=0,007$). Cependant, les prévalences de l'anémie maternelle à l'accouchement et du faible poids de naissance dans les deux groupes étaient similaires. Ces différents résultats ont permis de conclure à l'efficacité de la méfloquine en tant que traitement équivalent à la SP. Une seconde étude, plus récente et plus importante a été faite dans cinq pays dont le Bénin : il s'agit de l'essai MIPPAD (Malaria in Pregnancy Preventive Alternative Drug) où 4749 femmes enceintes ont été incluses et traitées soit avec de la méfloquine ou de la sulfadoxine-pyriméthamine (Gonzalez, Mombo-Ngoma et *al.* 2014). Dans cette étude, les prévalences de l'anémie maternelle ($p=0,03$) et du paludisme gestationnel non placentaire ($p=0,03$) étaient réduites dans le groupe de femmes traitées avec de la méfloquine. Il n'y avait pas de différence entre les groupes concernant la prévalence de faible poids de naissance chez les nouveau-nés et l'infection placentaire. Malgré son efficacité face au paludisme pendant la grossesse, l'usage de la méfloquine n'a

finalement pas été recommandé à cause des effets indésirables enregistrés dans cette étude (vomissements et vertiges) (Gonzalez, Mombo-Ngoma et *al.* 2014). La SP reste donc la molécule préconisée pour le TPI.

Pour ce qui est du schéma de prise du TPI à la SP une étude a été menée toujours au Bénin en 2014 par Huynh et *al.*. Elle a montré que la survenue d'une infection palustre au cours de la grossesse avant 4 mois était associée à une diminution du poids de naissance ($p=0,03$) d'environ 100g et à un risque élevé d'anémie maternelle ($p=0,03$). Par ailleurs, l'administration de la première dose du TPI-SP serait plus efficace à 4 mois que plus tard, car associée à une réduction de 50% du risque de FPN ($p=0,01$). Il apparaît clairement que le début de la grossesse est une période primordiale que la prévention du paludisme doit nécessairement prendre en compte, ce qui n'est pas le cas avec le schéma actuel.

Afin de tenir compte de ces différents problèmes, des recommandations ont été mises à jour en octobre 2012 (WHO 2012, World Health Organization 2013). L'OMS recommande 4 visites prénatales avec administration du TPI à la SP à la dose de 1500/75 mg en prise unique, à partir du deuxième trimestre de grossesse (au moins 13 semaines d'aménorrhée) jusqu'à l'accouchement, en doses espacées d'au moins un mois. Ce traitement continue d'être efficace, malgré l'augmentation de la résistance à la SP, avec une réduction de la prévalence de paludisme gestationnel (périphérique et placentaire), une diminution des cas d'anémie maternelle et des conséquences du paludisme pendant la grossesse (WHO 2012). Cependant, même ce nouveau schéma ne protège toujours pas des infections au cours du premier trimestre.

Le TPI est également préconisé par l'OMS, chez les enfants de moins de cinq ans, dans les régions de paludisme saisonnier, et plusieurs études confirment son efficacité lorsqu'il est administré au moment des vaccinations recommandées par

l'OMS ou de façon mensuelle (Aponte, Schellenberg et al. 2009, Wilson and Taskforce 2011, Matangila, Mitashi et al. 2015).

Une prophylaxie est recommandée chez les sujets vivant en zone non endémique avant que ceux-ci ne se rendent dans les régions impaludées. La molécule préconisée est la combinaison atovaquone/proguanil. La doxycycline (antibiotique de la famille des cyclines) peut également être utilisée. Cependant, sa prise chez les enfants de moins de huit ans, les femmes enceintes et les femmes qui allaitent est proscrite. La doxycycline peut entraîner une baisse d'efficacité des pilules contraceptives, donc des précautions supplémentaires sont recommandées pour les femmes en âge de procréer.

1.6 Quelques particularités du paludisme grave chez l'enfant

Les trois quarts de la mortalité liée au paludisme concernent les enfants de moins de cinq ans, majoritairement en Afrique sub-saharienne (World Health Organization. 2015). Les enfants de moins de cinq ans sont des cibles privilégiées, compte tenu d'une part d'un système immunitaire moins développé (Schumacher and Spinelli 2012), et d'autre part parce que cette tranche d'âge est fragilisée par des infections bactériennes, parasitaires et virales très fréquentes dans ces zones où les co-infections sont la règle générale. Autre facteur aggravant, les enfants sont très souvent porteurs d'une anémie, du fait des habitudes alimentaires, des infections fréquentes et des déficits en micronutriments, (Lartey 2008, Perkins, Were et al. 2011) qui peut être aggravée lors d'un accès palustre.

Chez les sujets les plus jeunes, la non spécificité des signes cliniques rend encore plus difficile le diagnostic, ce d'autant que le tableau clinique de l'infection palustre peut

être très varié. Il est similaire à celui rencontré au cours de nombreuses maladies infantiles et peut simuler une gastro-entérite, une méningite ou une encéphalite, voire une pneumonie. La fièvre reste le symptôme principal, et chez les enfants elle peut être associée lorsqu'elle est élevée à des convulsions. Les vomissements sont fréquents, empêchant le traitement par voie orale (Schumacher and Spinelli 2012). L'évolution d'une infection palustre peut être rapidement défavorable chez le jeune enfant et les signes de gravité apparaissent très rapidement après le début de l'infection (Newton and Krishna 1998). Lorsque la parasitémie est supérieure à 4-5%, le risque d'infection palustre sévère augmente rapidement chez l'enfant (Crawley, Chu et al. 2010).

Les signes de gravité décrits précédemment ne sont pas spécifiques du paludisme mais communs à de nombreuses infections graves, accentuant ainsi la difficulté diagnostique. La mise en place très rapide d'un traitement adapté est, chez le jeune enfant, primordiale. En effet, les signes peuvent régresser très vite lorsque le diagnostic est posé et que le traitement démarre rapidement alors que l'état du sujet jeune peut dégénérer et aboutir au décès dans un délai assez court si la prise en charge n'est pas rapide.

On estime que 90% des cas de paludisme grave et mortel surviennent chez les enfants (Maitland 2015), et cette infection demeure une principale cause de morbidité et de mortalité infantile malgré les progrès réalisés (World Health Organization 2000, World Health Organization. 2015). En 2015, 306 000 décès ont été recensés chez les enfants, essentiellement en Afrique sub-saharienne. Parmi les malades qui guérissent et survivent, 10% gardent des séquelles neurologiques liées au neuropaludisme (Maitland and Marsh 2004, Crawley, Chu et al. 2010) .

1.7 Le paludisme de la femme enceinte, paludisme gestationnel

1.7.1 Caractéristiques générales

Le paludisme gestationnel se définit comme une infection palustre périphérique ou placentaire chez la femme enceinte. Les femmes enceintes sont plus à risque de contracter une infection palustre même en zone de transmission stable. Ceci est probablement dû à divers facteurs comme des modifications hormonales et immunologiques mais aussi à l'attractivité des moustiques pour les femmes enceintes (Lindsay, Ansell et *al.* 2000, Ansell, Hamilton et *al.* 2002, Takem and D'Alessandro 2013).

Les caractéristiques cliniques du paludisme chez la femme enceinte et ses effets sont variables et dépendent du niveau d'endémicité. En zone de transmission stable, les infections sont asymptomatiques et les manifestations cliniques sont rares quand bien même la prévalence est élevée. Dans ces zones en effet les femmes ont en général développé une forte immunité contre le paludisme (Lagerberg 2008). L'infection augmente le risque d'anémie chez la femme enceinte pendant toute la grossesse et des cas d'anémie sévère sont observés aussi bien chez les primigestes que chez les multigestes (Kalilani, Mofolo et *al.* 2010, Huynh, Fievet et *al.* 2011, Takem and D'Alessandro 2013). Lorsque la transmission est instable, l'infection palustre en cours de grossesse est aussi associée à l'anémie maternelle, mais celle-ci prédomine chez les primigestes. Les fausses couches sont fréquentes, et peuvent également être la conséquence de la fièvre qui constitue l'un des principaux symptômes (Takem and D'Alessandro 2013). En effet, comme l'immunité anti-palustre est précaire, contrairement aux zones à transmission stable les manifestations cliniques,

notamment les accès fébriles, sont plus fréquentes et le risque de paludisme grave et de décès est accru (Lagerberg 2008).

La particularité du paludisme gestationnel en zone de transmission stable vient essentiellement du fait que l'infection peut également avoir des conséquences chez le nouveau-né (Moya-Alvarez, Abellana et *al.* 2014). Parmi les conséquences du paludisme gestationnel on note un risque accru de faible poids de naissance par retard de croissance intra utérin. Cette problématique est extrêmement importante en termes de santé publique dans les pays en développement, puisque globalement 60 à 80% des nouveau-nés qui décèdent durant la période néonatale sont des enfants nés avec un FPN majoritairement lié à un RCIU (Lawn, Cousens et *al.* 2005). S'il a longtemps été estimé que cette association entre le paludisme gestationnel et le FPN était essentiellement due à l'infection placentaire, des études plus récentes montrent que des infections de la femme enceinte au début de la grossesse peuvent aussi avoir de telles conséquences. Ainsi, en 2007 Cottrell et *al.* ont montré au Burkina Faso que des infections survenant avant le quatrième mois de grossesse étaient associées avec une diminution moyenne du poids de naissance de 68g ($p=0,08$) (Cottrell, Mary et *al.* 2007). Plus récemment au Bénin un suivi de plus de 1000 femmes a montré que les infections au premier trimestre étaient associées significativement ($p=0,03$) à une perte de près de 100g du poids de naissance (Huynh, Fievet et *al.* 2011). En 2015, une autre étude démontre que même les infections sub-microscopiques en début de grossesse, détectables uniquement par PCR étaient associées à un risque accru de faible poids de naissance, surtout chez les primigestes avec un odd ratio (OR) de 6,09 (Cottrell, Moussiliou et *al.* 2015). Ces différents résultats montrent donc que l'infection palustre gestationnelle même précoce représente un risque important pour le nouveau-né et le jeune enfant.

Parfois cependant le paludisme gestationnel se traduit par une infection placentaire caractérisée par la présence d'hématies parasitées dans le placenta. (Lagerberg 2008, Moya-Alvarez, Abellana et *al.* 2014). Cette infection placentaire représente un tableau très particulier du paludisme sur lequel nous allons insister.

1.7.2 L'infection placentaire

En effet, dans certains cas d'infection par *P. falciparum*, les globules rouges infectés présentent à leur surface des antigènes parasitaires de type PfEMP1 ayant une affinité très forte pour des récepteurs spécifiques. Parmi ces antigènes, l'antigène le plus important au cours de l'infection placentaire est VAR2CSA qui a une affinité pour les molécules de chondroïtine sulfate A localisées au niveau du placenta. Cet antigène spécifique du placenta, se lie rarement aux autres récepteurs non placentaires, et diffère des antigènes observés chez les personnes non enceintes (Takem and D'Alessandro 2013, Ayres Pereira, Mandel Clausen et *al.* 2016). Il est également le seul à se lier aux récepteurs placentaires. VAR2CSA est donc l'élément déterminant dans la pathogénie du paludisme placentaire puisqu'il est responsable de la cyto-adhérence et de la séquestration des hématies au niveau du placenta ainsi que de la réaction inflammatoire qui s'en suit. Les niveaux d'anticorps contre ces antigènes augmentent avec le nombre de grossesses, expliquant pourquoi ce phénomène concerne beaucoup plus souvent les primigestes dans les zones de transmission pérenne (Salanti, Dahlback et *al.* 2004, Tutterrow, Avril et *al.* 2012, Ndam, Denoeud-Ndam et *al.* 2015). Leur présence serait alors protectrice, associée à un pronostic favorable de la grossesse caractérisée par une réduction du risque d'infection palustre placentaire. En effet, en 2012, Tutterrow et *al.* ont retrouvé une corrélation positive entre les niveaux élevés de différents anticorps anti-VAR2CSA sériques pendant toute

la grossesse et l'absence d'infection placentaire chez les femmes enceintes à l'accouchement au Cameroun (Tutterrow, Avril et *al.* 2012). Le même constat a été fait par Ndam et *al.* qui ont montré que les niveaux élevés d'anticorps anti VAR2CSA en début de grossesse chez des femmes béninoises étaient associés à une plus faible prévalence de l'infection placentaire à l'accouchement, et de toutes les infections palustres pendant la grossesse (Ndam, Denoeud-Ndam et *al.* 2015). Le rôle protecteur des anticorps anti-VAR2CSA font de cet antigène spécifique de l'infection placentaire un candidat vaccin potentiel (Tuikue-Ndam and Deloron 2015). Un essai vaccinal de phase Ib est d'ailleurs actuellement en cours au Bénin et au Burkina Faso (Fried, Avril et *al.* 2013, Tuikue-Ndam and Deloron 2015, Chene, Houard et *al.* 2016). Les phénomènes de cyto-adhérence et de séquestration ont également été rapportés dans des cas d'infection par *Plasmodium vivax* (Carvalho, Lopes et *al.* 2010, Chotivanich, Udomsangpetch et *al.* 2012).

1.7.2.1 Infection placentaire et faible poids de naissance du nouveau-né

L'association entre l'infection placentaire et le FPN est étayée par de nombreuses études. En 1995, au cours d'un essai clinique étudiant l'efficacité de la chloroquine versus un placebo au Cameroun chez 266 femmes enceintes, il a été décrit une association entre l'infection placentaire et le faible poids du nouveau-né à la naissance. Dans cette étude, les enfants nés de placentas sains avaient en moyenne 358 g de plus que les enfants nés de mères infectées (Cot, Le Hesran et *al.* 1995). En 2006 au Sénégal, N'Dao et *al.* ont démontré dans un échantillon de plus grande taille (8 273 femmes) que le risque de faible poids à la naissance était augmenté chez les enfants nés de mères ayant une infection placentaire à l'accouchement avec un OR=2,06 (IC92% : 1,72-2,57) (N'Dao, N'Diaye et *al.* 2006). Au cours de la même

année, une autre étude sénégalaise sur un échantillon de 692 enfants, a retrouvé une diminution du poids moyen de naissance en cas d'infection placentaire ($2,684 \pm 67g$ versus $3,085 \pm 66 g$ dans le groupe sans infection (Sarr, Marrama et *al.* 2006). Toutes ces études ont été réalisées à une période où la chloroquino-résistance était très importante. Malgré l'abandon de cette molécule et la modification de la prise en charge préventive des femmes enceintes contre le paludisme, l'effet de l'infection placentaire sur le FPN persiste. En 2013, dans une étude qui s'est déroulée au Nigéria alors que le TPI à la SP est d'ores et déjà mis en place, Oraneli et *al.* mettent en évidence une différence entre le poids des enfants de mères non infectées ($2\ 990 \pm 521.6g$) et celui des enfants en cas d'infection placentaire ($2\ 522 \pm 399.4 g$) ($p < 10^{-3}$). De plus, au cours de cette même étude il a été noté que la prévalence du FPN était significativement plus élevée chez les femmes ayant une infection placentaire que chez les autres : 32,1% versus 5,5% respectivement ($p < 10^{-3}$) (Oraneli, Okeke et *al.* 2013). Notons que dans cette étude, aucune précision n'a été faite par rapport à l'administration ou non du TPI pendant la grossesse. En Papouasie Nouvelle Guinée, une étude réalisée en 2015 confirme une fois de plus le risque accru de FPN lié à l'infection placentaire (Stanisic, Moore et *al.* 2015).

1.7.2.2 Infection placentaire et susceptibilité au paludisme pendant l'enfance

Autre conséquence importante du paludisme gestationnel, les enfants naissant d'un placenta infecté semblent plus sensibles au paludisme au cours des premiers mois de vie. Cette sensibilité s'exprime par un délai de première infection plus court comparé aux enfants nés d'un placenta indemne d'infection. A notre connaissance ce phénomène n'a pas été étudié chez des enfants nés d'un placenta non infecté mais dont la mère aurait été infectée au niveau périphérique.

L'association entre placenta infecté et infection précoce chez le nouveau-né a tout d'abord été décrite au Cameroun par Le Hesran et *al.* en 1997 dans une zone de forte endémie (Le Hesran, Cot et *al.* 1997). A ce moment, la protection des femmes enceintes reposait sur la prophylaxie à la chloroquine probablement déjà très peu efficace et la prévalence de l'infection placentaire était élevée (21,3%). Dans cette étude, 197 enfants ont été suivis de la naissance à 24 mois et les enfants nés d'un placenta infecté semblaient plus à risque d'infection entre le 5^{ème} et le 8^{ème} mois (Le Hesran, Cot et *al.* 1997). A la suite de cette étude d'autres groupes se sont intéressés à cette problématique. En Tanzanie tout d'abord où 453 enfants ont été suivis 12 mois (Mutabingwa, Bolla et *al.* 2005). La prévalence de l'infection placentaire était dans ce cas beaucoup plus faible (15%). Comparés aux enfants nés d'un placenta non infecté, les enfants nés de placenta infecté avaient un risque significativement plus élevé (OR=1.41, 95% CI 1.01–1.99) de faire une infection durant les 12 premiers mois de vie. Cependant l'association entre le délai de première infection et l'infection placentaire ne semblait pas aussi nette que dans l'étude camerounaise et il semblait exister une interaction entre l'infection placentaire et la gestité. En effet les enfants nés de mères primigestes infectées semblaient paradoxalement protégés par l'infection placentaire comparés aux enfants nés de multigestes avec une infection placentaire qui pour leur part étaient plus à risque d'infection précoce (Mutabingwa, Bolla et *al.* 2005). Le même type d'interaction et de résultat quelque peu paradoxal a été mis en évidence au Gabon cette fois par Schwarz (Schwarz, Adegnika et *al.* 2008). Ici encore les enfants nés de mères primigestes infectées n'avaient pas significativement plus de risque d'infection pendant le suivi (Hazard Ratio HR=1,5 (95% CI= 0,6–3,8), alors que les enfants nés de multigestes avaient un ratio deux fois plus élevé (HR=2,6 ; 95% CI= 1,3–5,3). Les raisons de ces résultats discordants et surprenants n'ont guère été analysées. La plus faible prévalence d'infection

placentaire et la mauvaise prise en compte du risque environnemental de transmission pourraient intervenir. En effet dans une étude plus récente réalisée au Bénin, une association entre l'infection placentaire et le délai de première infection est retrouvée dans une cohorte de 600 enfants suivis 18 mois. La particularité de cette étude est l'exceptionnelle qualité des données environnementales puisqu'une modélisation statistique a permis d'attribuer à chaque enfant en fonction de sa date et de son lieu de naissance un risque entomologique variable dans le temps (Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012). Dans cette étude, les auteurs montrent que la prise en compte précise du risque environnemental renforce l'association entre l'infection placentaire et le délai de survenue de première infection (Le Port, Watier et *al.* 2011). En 2016, une étude réalisée en Tanzanie dans une population de 206 mères/enfants avec 20% d'infection placentaire a montré que l'infection placentaire de la mère était associée à un délai de première infection plus courte (32 semaines versus 37 semaines chez les enfants non exposés, $p=0,003$), un risque d'infection plus élevé (OR=4,79, $p<0,05$) et un nombre moyen d'infection plus élevé chez les enfants (0,51 en cas d'infection versus 0,30, $p=0,038$) (Sylvester, Gasarasi et *al.* 2016).

Les résultats précédents montrent clairement que les conséquences de l'infection placentaire sur le nouveau-né, que ce soit en termes de poids de naissance ou de sensibilité palustre, sont complexes. Dans le cas de la sensibilité aux premières infections, les différents auteurs évoquent un phénomène de tolérance immunitaire à l'origine de modifications du développement immunitaire du nouveau-né. Si ces modifications ont bien été établies (Le Hesran, Cot et *al.* 1997, Mutabingwa, Bolla et *al.* 2005, Cairo, Longinaker et *al.* 2014) ainsi que leurs conséquences en termes de sensibilité aux infections (Dauby, Goetghebuer et *al.* 2012, Cairo, Longinaker et *al.* 2014) ou de réponses vaccinales (Labeaud, Malhotra et *al.* 2009, Walther, Miles et *al.*

2012, Cairo, Longinaker et *al.* 2014), une compréhension totale de ce phénomène de tolérance manque encore. Par exemple une question se pose concernant le caractère « spécifique » de cette tolérance immunitaire, à savoir si ce phénomène ne concerne que le paludisme ou bien s'il s'agit-il d'un processus plus complexe mettant en jeu l'immunité globale du nouveau-né. En effet, il a été montré sur la même cohorte béninoise précédemment citée que les enfants nés d'un placenta infecté étaient également plus souvent porteur d'une fièvre dont l'origine non palustre est avérée (Rachas, Le Port et *al.* 2012), résultat consistant avec une vision plus globale de la tolérance immunitaire. Cette thématique, au centre de notre thèse, sera reprise ultérieurement dans ce chapitre.

Ces généralités sur le paludisme n'avaient pas la prétention d'être exhaustives tant est complexe cette maladie infectieuse. Rappelons cependant un certain nombre d'éléments qui sont primordiaux dans le cadre de nos travaux de thèse. Ces éléments montrent que l'infection palustre périphérique de la femme enceinte, même précoce, peut avoir des conséquences en termes de faible poids de naissance mais que l'effet de ces infections précoces sur la sensibilité du nouveau-né à l'infection n'a pas été étudié. L'effet de l'infection placentaire à la fois sur le poids de naissance et la sensibilité au paludisme du nouveau-né semble bien étayé, même si certaines études ne concluent pas totalement. Les auteurs réfèrent à l'existence d'une tolérance immunitaire pour expliquer cette sensibilité. Même si des modifications du développement immunitaire du nouveau-né ont été montrées, aucune hypothèse explicative de cette tolérance n'est actuellement admise. En effet ce processus pourrait être bien plus complexe, comme en témoignent les résultats de Rachas et *al.* (Rachas, Le Port et *al.* 2012) ainsi que l'existence d'un phénomène un peu similaire en cas d'infection de la femme enceinte par les helminthes. Ainsi, il a été montré que

des enfants nés de mères infectées par les helminthes au cours de la grossesse seraient plus à risque d'infections helminthiques (Dauby, Goetghebuer et *al.* 2012, Mehta, Rodriguez et *al.* 2012) et auraient des réponses vaccinales modifiées (Gebreegziabiher, Desta et *al.* 2014).

Si l'on évoque la possibilité d'un processus de tolérance immunitaire plus général il nous apparaît indispensable d'évoquer le rôle potentiel de HLA-G. Cette molécule est identifiée comme à la base de la tolérance materno-fœtale au cours d'une grossesse normale mais de plus en plus d'éléments montrent que son implication dans des processus pathologiques, y compris infectieux, pourrait être importante.

Nous allons dans les prochains paragraphes présenter la molécule HLA-G qui est identifiée comme à l'origine du phénomène de tolérance fœto-maternelle permettant le maintien chez la femme enceinte de l'allogreffe fœtale. Cependant, progressivement les évidences s'accumulent pour montrer que cette molécule tolérogène pourrait intervenir au cours de processus pathologiques d'origines diverses, en particulier infectieux. A la suite de la présentation de cette molécule et du gène qui la code, nous présenterons son rôle physiologique au cours de la grossesse puis son implication dans diverses pathologies en insistant sur les infections.

Nous formulerons ensuite l'hypothèse générale sur laquelle repose notre thèse.

2. Généralités sur HLA-G

2.1 Présentation du complexe majeur d'histocompatibilité ou système HLA

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez le sujet humain ou Human Leukocyte Antigen (HLA), est localisé sur le bras court du chromosome 6 (Figure 8). Il a été décrit pour la première fois en 1958 (Thorsby 2009). Le complexe HLA constitue le plus important système de compatibilité tissulaire entre donneur et receveur d'organes (Chatenoud and Bach 2012). Il comporte plus de 200 gènes, dont plus de 40 qui codent pour des antigènes leucocytaires (Klein and Sato 2000, Chinen and Buckley 2010). Ces antigènes ou molécules HLA sont des glycoprotéines de la surface cellulaire et sont porteurs de l'identité biologique de l'individu (Chatenoud and Bach 2012). Ils sont indispensables pour la reconnaissance du « soi » et du « non-soi » généralement représenté par un agent pathogène (Brown and Eklund 1994) et jouent ainsi un rôle déterminant dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Ces gènes et molécules interviennent dans la présentation d'antigènes, la transplantation d'organes et conditionnent la susceptibilité ou la résistance à de nombreuses maladies, notamment auto-immunes (Chatenoud and Bach 2012, Djurisic and Hviid 2014).

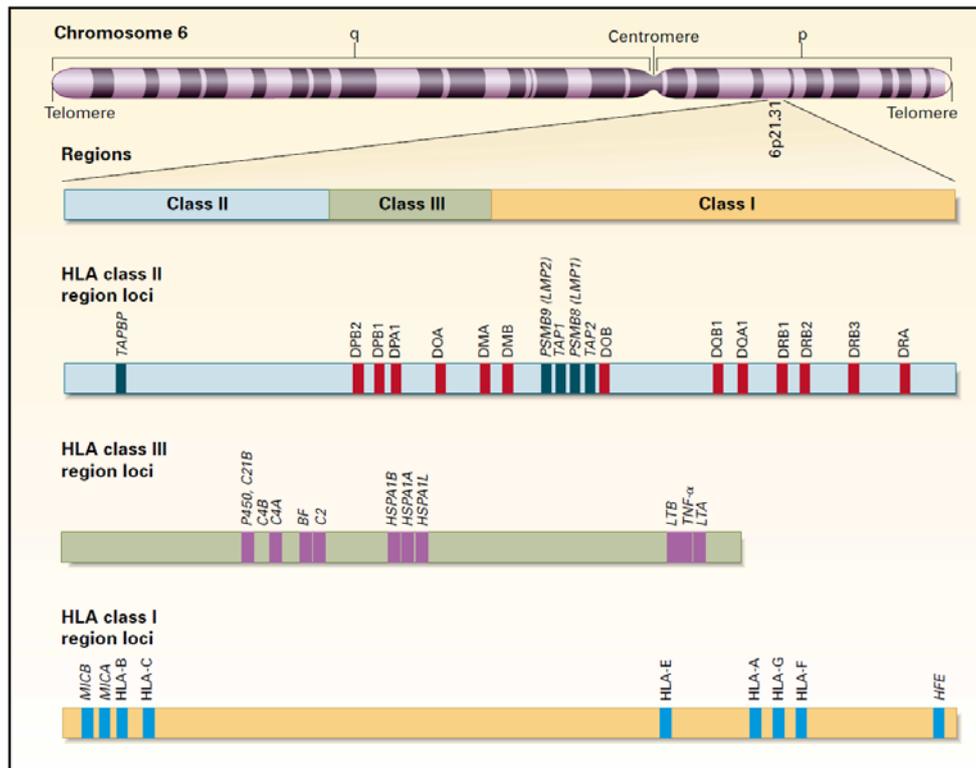


Figure 8 : Localisation et organisation du système HLA sur le chromosome 6 (Klein and Sato 2000)

Le complexe HLA est constitué de trois principales régions dont les gènes codent pour des protéines qui diffèrent par leur structure, leur régulation et leur fonction : la région HLA I en position télomérique, la région HLA II centromérique et une région centrale dite de classe III (Klein and Sato 2000, Chatenoud and Bach 2012) (Figure 8). Les gènes et les molécules du système HLA, intervenant dans la régulation de la réponse immunitaire, sont regroupés au sein des deux premiers groupes : les classes I et II.

La région I contient des gènes classiques (ou HLA de classe Ia) HLA-A, HLA-B, HLA-C et des gènes non classiques (ou HLA de classe Ib) tels que HLA-G, HLA-E ou HLA-F (Chatenoud and Bach 2012, Gallegos, Michelin et al. 2016).

Les gènes HLA de classe I sont les plus polymorphes dans le génome humain, et sont responsables de la capacité de ce système à se lier et à présenter une grande variété de peptides antigéniques (Rene, Lozano et *al.* 2016). Ces gènes de classe I sont organisés en huit exons codants respectivement pour une séquence signal (exon 1), trois domaines externes (exons 2, 3, 4), un domaine transmembranaire (exon 5), un domaine cytoplasmique (exons 6 et 7) et une région 3' non traduite (exon 8). Les exons sont séparés par 7 introns non codants (Le Bouteiller and Lenfant 1997). Les antigènes HLA de classe I sont exprimés à l'état normal par toutes les cellules nucléées de l'organisme (Chinen and Buckley 2010, Gallegos, Michelin et *al.* 2016) à l'exception des cellules sexuelles mâles (spermatozoïdes), les cellules nerveuses et les cellules fœtales (Brown and Eklund 1994, Le Bouteiller and Lenfant 1997). En dehors des conditions physiologiques, cette expression peut être modifiée par divers mécanismes (Rene, Lozano et *al.* 2016).

Les molécules de classe I appartiennent à la famille des immunoglobulines et sont constituées d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère, β 2-microglobuline (β 2m). La chaîne α est constituée d'une région extracellulaire (avec 3 domaines α 1, α 2, α 3), une région transmembranaire et une région intra-cytoplasmique (Figure 9) (Chatenoud and Bach 2012). La région HLA II abrite trois principaux gènes HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP ainsi que d'autres gènes (DO, DM) (Figure 8). Les molécules de classe II ont une distribution plus limitée que celles de la classe I. Elles sont retrouvées au niveau de certains types cellulaires tels que les lymphocytes B, les lymphocytes T activés, les macrophages et les cellules dendritiques (Brown and Eklund 1994, Chinen and Buckley 2010). Les molécules de classe II sont constituées de chaînes lourdes α et d'une chaîne légère β toutes deux liées à la membrane cellulaire. Chacune des chaînes est organisée en 2 domaines extracellulaires (α 1, α 2

pour la chaîne α et β_1 , β_2 pour la chaîne β), un domaine membranaire et un dernier intra-cytoplasmique (Figure 9). Cette structure des molécules de classe II leur confère une organisation similaire à celle de la classe HLA I (Chatenoud and Bach 2012).

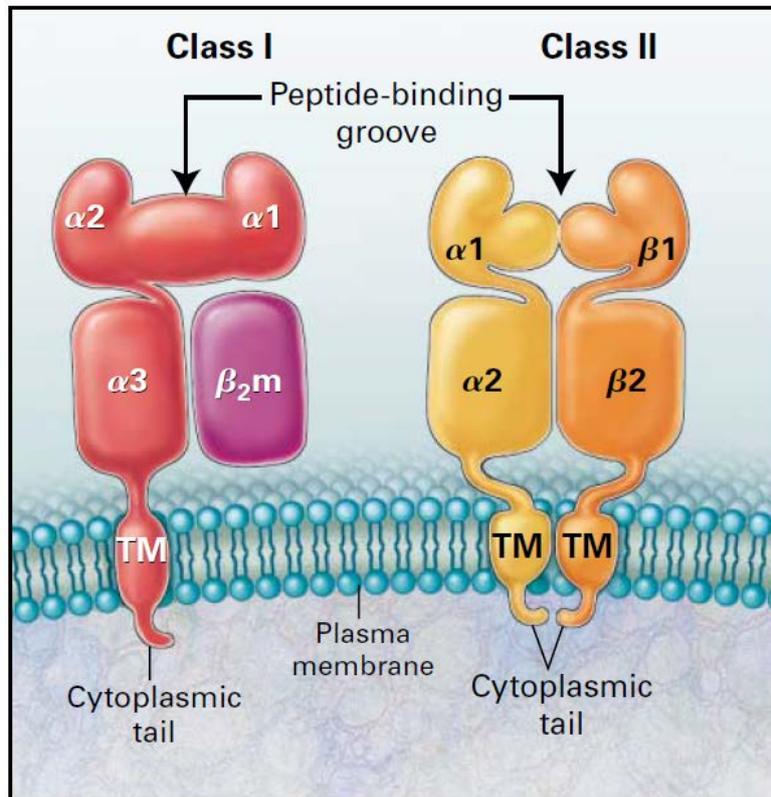


Figure 9 : Structure des molécules HLA de classe I et de classe II (Chatenoud and Bach 2012)

2.2 HLA-G : molécule du CMH

HLA-G est une molécule non classique du système HLA, de classe Ib. La protéine HLA-G provient de la transcription du gène *HLA-G* localisé sur la région du CMH entre les gènes *HLA-A* et *HLA-F* et présentant la même structure que les autres gènes HLA de classe I (Le Bouteiller and Lenfant 1997, Klein and Sato 2000). Contrairement aux autres molécules HLA de classe Ia dites « classiques », HLA-G est caractérisé par son faible polymorphisme et son expression restreinte à certains types

cellulaires. Cette protéine est également particulière de par ses fonctions immunosuppressives et son rôle dans la tolérance immunitaire (Alegre, Rizzo et al. 2014, Amodio, de Albuquerque et al. 2014, Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015). Elle existe sous sept configurations différentes ou isoformes : quatre sont membranaires (HLA-G1, -G2, -G3 et -G4) et trois sont solubles (HLA-G5, -G6 et -G7) (Amodio, de Albuquerque et al. 2014, Dahl, Djurisic et al. 2014). Ces isoformes résultent d'épissages alternatifs d'un ou de plusieurs exons (pour les membranaires) et/ou de l'absence d'épissages qui bloque la traduction des domaines transmembranaires et/ou cytoplasmiques, conduisant à la production de molécules solubles tronquées (Le Bouteiller 2001, Chatenoud and Bach 2012) (Figure 10).

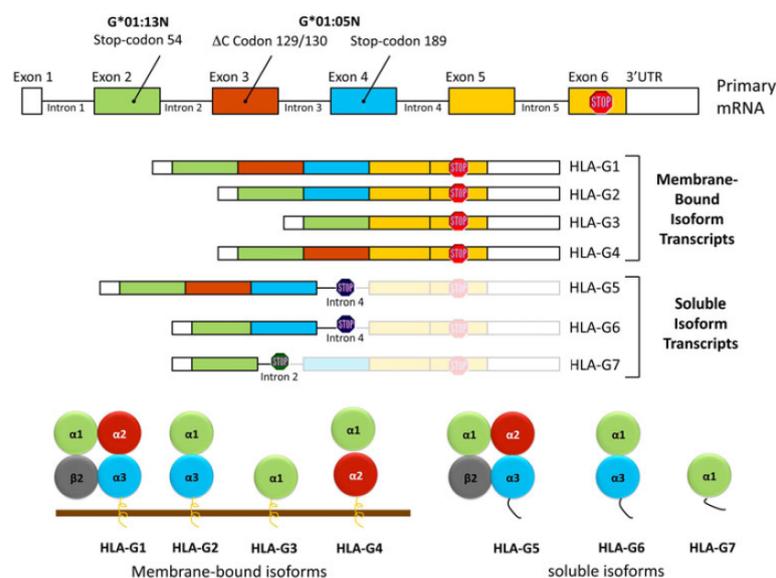


Fig. 3 Isoforms of HLA-G produced by alternative splicing of the primary mRNA. The HLA-G heavy chain domains ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, transmembrane portion and cytoplasmic tail) are encoded by the *HLA-G* gene (chromosome 6), and the light $\beta 2$ -microglobulin molecule is encoded by a gene at chromosome 15. Exon 7 is always spliced out. The final portion of exon 6 and exon 8 is always transcribed, however, never translated due to the presence of a premature stop codon at the beginning of exon 6 (red stop signal), and has been considered as the 3'untranslated region of the gene (3'UTR). The primary transcript may be spliced out into 7 isoforms, HLA-G1 to -G7. HLA-G1 is the full-length HLA-G molecule, HLA-G2 lacks exon 3, HLA-G3 lacks exons 3 and 4, and HLA-G4 lacks exon 4. HLA-G1 to -G4 are membrane-bound molecules due to the presence

of the transmembrane and cytoplasmic tail encoded by exons 5 and 6. HLA-G5 is similar to HLA-G1 but retains intron 4, HLA-G6 lacks exon 3 but retains intron 4, and HLA-G7 lacks exon 3 but retains intron 2. HLA-G5 and -G6 are soluble forms due to the presence of intron 4, which contains a premature stop codon at exon 4 (blue stop signal), preventing the translation of the transmembrane and cytoplasmic tail. HLA-G7 is soluble due to the presence of intron 2, which presents a premature stop codon (green stop signal). The G*01:13N allele is probably not expressed due to the presence of a premature stop codon at exon 2 (codon 54). A deletion of a cytosine (ΔC) at exon 3 of the G*01:05N allele changes the reading frame, leading to a stop codon at exon 4

Figure 10 : Différentes isoformes de HLA-G (Donadi, Castelli et al. 2011)

En conséquence, la structure classique des molécules de classe I n'est plus respectée dans tous les cas : si la chaîne extracellulaire α est toujours représentée par au moins un de ses domaines (α_1 présent dans toutes les isoformes), la chaîne β_2m par contre n'existe que pour les isoformes HLA-G1 et HLA-G5 (HoWangYin, Loustau et *al.* 2012) (Figure 11). Ces deux dernières isoformes sont les seules à présenter la structure classique des molécules HLA de classe I. HLA-G peut également exister sous des formes solubles (différentes des précédentes) provenant d'un clivage protéolytique, à la surface de la cellule, possible en théorie pour toutes les isoformes de HLA-G (Rebmann, LeMaout et *al.* 2007, Carosella, Gregori et *al.* 2011). Les isoformes les plus étudiées (HoWangYin, Loustau et *al.* 2012) et les plus exprimées sont HLA-G1 et HLA-G5 (Rizzo, Vercammen et *al.* 2011).

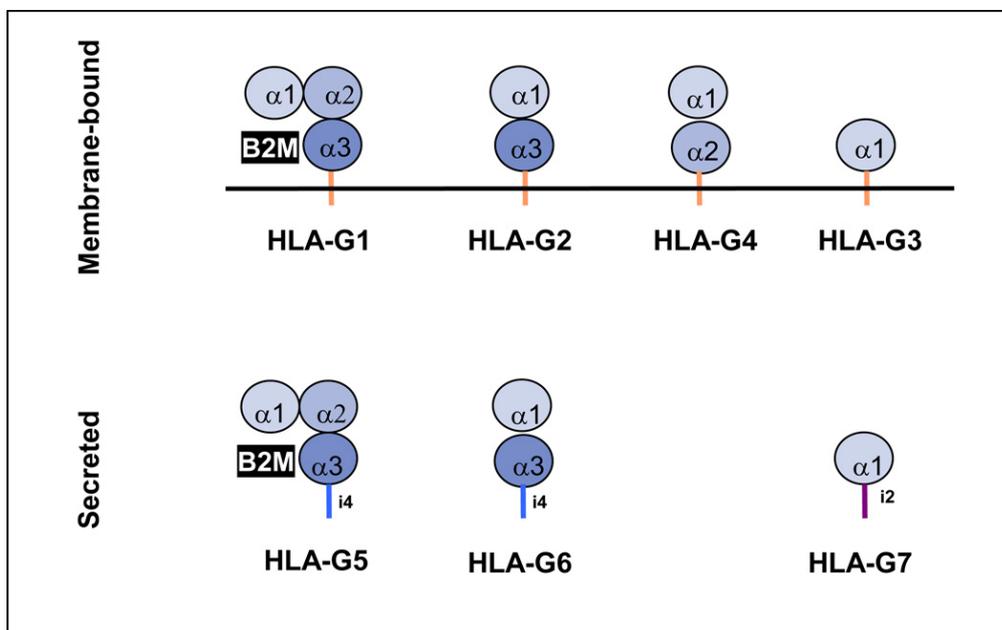


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des isoformes de HLA-G (HoWangYin, Loustau et *al.* 2012)

2.2.1 Polymorphismes de HLA-G

La protéine HLA-G provient de la transcription du gène du même nom localisé au niveau du chromosome 6 (Klein and Sato 2000, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). Le gène *HLA-G* est constitué de trois parties principales : une région non codante ou région 3'UTR (untranslated region), une région codante constituée de 8 exons comme les gènes HLA I classiques, et une région promotrice ou 5'URR (upstream regulatory region) (Le Bouteiller and Lenfant 1997, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). Quand bien même ce gène non classique est caractérisé par son faible polymorphisme en comparaison aux gènes de classe Ia, il présente une certaine variabilité. La variabilité du gène peut concerner les différentes régions et il peut s'agir de la variation d'un ou de plusieurs allèles. Une cinquantaine de variants sont décrits (Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). Ces variants ou polymorphismes peuvent avoir un effet aussi bien sur la structure des différentes isoformes, sur leur fonctionnalité et sur leur régulation. Plusieurs polymorphismes sont ainsi impliqués et associés à différentes pathologies infectieuses et non infectieuses (Donadi, Castelli et *al.* 2011, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015) et ceux de la région 3'UTR semblent majoritaires. Les polymorphismes sont diversement répartis dans la population mondiale et peuvent avoir des effets différents (van der Ven, Skrablin et *al.* 1998, Sabbagh, Luisi et *al.* 2014).

2.2.2 Expression de HLA-G

Contrairement aux molécules HLA de classe Ia classiques présentes sur la presque totalité des cellules de l'organisme humain sous forme membranaire, la molécule HLA-G a une expression limitée en situation non pathologique.

La molécule HLA-G est présente chez la femme enceinte avec des niveaux élevés dans les tissus foetaux (Amodio, de Albuquerque et *al.* 2014, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). Elle a été initialement décrite dans le trophoblaste foetal (Kovats, Main et *al.* 1990, Apps, Gardner et *al.* 2008, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). La protéine est aussi retrouvée dans le placenta (Hviid, Larsen et *al.* 2004), les cellules amniotiques (Li, Koike-Soko et *al.* 2015), dans l'embryon avant l'implantation dans l'utérus (Jurisicova, Casper et *al.* 1996, Fuzzi, Rizzo et *al.* 2002), dans le liquide amniotique (Rebmann, Pfeiffer et *al.* 1999) et dans le plasma de la femme pendant la grossesse (Hunt, Jadhav et *al.* 2000, Rizzo, Andersen et *al.* 2009, Biyik 2014, Klitkou, Dahl et *al.* 2015).

Chez le sujet adulte, la protéine est également exprimée en petite quantité par certaines cellules particulièrement dans les tissus lymphoïdes tels que le thymus (Crisa, McMaster et *al.* 1997), la cornée (Le Discorde, Moreau et *al.* 2003) le pancréas (Cirulli, Zalatan et *al.* 2006) ou la matrice unguéale (Ito, Ito et *al.* 2005). Les monocytes, les kératynocytes ainsi que les précurseurs érythroïdes peuvent également produire HLA-G (Moreau, Flajollet et *al.* 2009). Des formes solubles de HLA-G sont retrouvées dans le plasma en dehors de la grossesse chez les femmes non enceintes, et même chez les sujets masculins (Rebmann, Pfeiffer et *al.* 1999). Il en est de même dans certains tissus du système génital masculin et dans le liquide séminal (Larsen, Bzorek et *al.* 2011).

En dehors de son expression physiologique, la production de HLA-G peut être induite dans de nombreuses situations pathologiques et dans des tissus où elle n'est normalement pas exprimée. Cette expression de HLA-G peut être régulée par des facteurs génétiques ou non (Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). C'est ce qui est observé en présence des facteurs de croissance, de certaines cytokines intervenant

dans les processus de l'inflammation (interleukine (IL)-10 par exemple), de certaines hormones comme la prolactine et la progestérone (Moreau, Adrian-Cabestre et *al.* 1999, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015) et de certains polymorphismes du gène *HLA-G* (Hiby, King et *al.* 1999, Hviid, Rizzo et *al.* 2006, Iversen, Nguyen et *al.* 2008, Jeong, Park et *al.* 2014). L'expression de *HLA-G* peut par ailleurs être régulée par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN qui s'observe dans certaines tumeurs dans lesquelles le défaut d'expression de *HLA-G* serait liées à une méthylation de certaines parties de la région promotrice du gène (Seliger 2016).

2.2.3 Fonctions de HLA-G

Une fois exprimée, la protéine exerce son effet par sa liaison directe avec principalement trois types de récepteurs inhibiteurs : le récepteur *ILT2* (immunoglobulin-like transcript-2), le récepteur *ILT4* et le récepteur *KIR2DL4* (killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4) (LeMaout, Zafaranloo et *al.* 2005, Shiroishi, Kuroki et *al.* 2006, HoWangYin, Loustau et *al.* 2012). Ils sont encore appelés *CD85j* ou *LILRB1* (leukocyte immunoglobulin-like receptor B1), *CD85d* ou *LILRB2* et *CD158d* respectivement (Shiroishi, Kuroki et *al.* 2006). Les différents récepteurs de *HLA-G* se retrouvent sur plusieurs types cellulaires.

Le récepteur *ILT2* est exprimé par les cellules des lignées lymphoïde et myéloïde (Brown, Trowsdale et *al.* 2004). Il est observé au niveau des lymphocytes B, de certains lymphocytes T et cellules NK (natural killers), des monocytes et des cellules dendritiques (Colonna, Navarro et *al.* 1997, Shiroishi, Kuroki et *al.* 2006, HoWangYin, Loustau et *al.* 2012). Le récepteur *ILT4*, encore appelé *MIR10* (myeloid inhibitory receptor 10) (Brown, Trowsdale et *al.* 2004), est spécifique des cellules myéloïdes et son expression est restreinte aux monocytes et aux cellules dendritiques

(Colonna, Samaridis et *al.* 1998, HoWangYin, Loustau et *al.* 2012). Ces deux récepteurs de la famille LILR reconnaissent les molécules du CMH de classe I, auxquelles ils se lient par les domaines $\alpha 3$ et $\beta 2m$ pour LILRB1 et $\alpha 3$ uniquement pour LILRB2 ; ils ne sont pas spécifiques de HLA-G mais se lient préférentiellement à cette protéine (Brown, Trowsdale et *al.* 2004, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015).

Le récepteur KIR2DL4 est, quant à lui, exprimé uniquement par le sous-ensemble CD56bright des cellules NK (Rajagopalan and Long 1999, HoWangYin, Loustau et *al.* 2012). Il est spécifique de HLA-G (Rajagopalan and Long 2012).

Par ailleurs, HLA-G peut également se lier à des récepteurs non inhibiteurs CD8 (par le domaine $\alpha 3$ et CD160 (Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015).

Ces liaisons HLA-G récepteurs, sont à la base des effets de cette molécule sur le système immunitaire. En effet, la principale fonction de HLA-G consiste à induire le maintien d'une tolérance à divers stades de la réponse immune (différenciation, prolifération, cytolysse ou sécrétion de cytokines) (HoWangYin, Loustau et *al.* 2012). Cette action peut être directe sur les cellules effectrices, ou indirecte. En fonction de la cible cellulaire et du récepteur de cette cellule, les effets de HLA-G sont variés.

L'action directe de HLA-G au niveau des cellules NK fut démontrée dans la muqueuse utérine puis dans le sang périphérique (Rouas-Freiss, Goncalves et *al.* 1997, Rouas-Freiss, Marchal et *al.* 1997). HLA-G agit par l'intermédiaire du récepteur ILT2, en inhibant l'activité cytolytique induite par les cellules NK pour protéger les cellules exprimant la protéine HLA-G. Elle altère également la sécrétion de cytokines, dont l'interféron gamma (IFN- γ , et le chimiotactisme des cellules NK. L'action de la liaison

entre HLA-G et le récepteur KIR2DL4 est encore mal connue (Creput, Durrbach et *al.* 2003, Amodio, de Albuquerque et *al.* 2014, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015).

HLA-G inhibe aussi l'activité cytolytique des lymphocytes CD8+ en induisant une apoptose de ces lymphocytes CD8+ activés. Elle provoque une inhibition de la réponse allogénique proliférative des lymphocytes T CD4+ et induit la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α tumor necrosis factor α), l'IFN- γ ainsi que l'IL-10 (Creput, Durrbach et *al.* 2003, Amodio, de Albuquerque et *al.* 2014, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015).

Au niveau des lymphocytes B, HLA-G inhibe la prolifération puis la différenciation cellulaire, de même que la sécrétion d'anticorps dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes (Amodio, de Albuquerque et *al.* 2014, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015).

Sous l'influence de HLA-G, une inhibition de maturation des cellules myéloïdes a été mise en évidence, empêchant la transformation de cellules immatures en cellules immunes compétentes. HLA-G ne bloque pas uniquement l'immunogénicité des cellules myéloïdes, mais les oriente vers une fonction régulatrice (Amodio, de Albuquerque et *al.* 2014, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). Il a été récemment démontré que HLA-G inhiberait la fonction de phagocytose des neutrophiles (Baudhuin, Migraine et *al.* 2013).

En dehors de son action directe sur les récepteurs des cellules immunitaires, HLA-G peut avoir un effet indirect par l'intermédiaire de cellules régulatrices (Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015). Compte tenu de ses actions immunosuppressives, qui empêchent l'élimination du « non-soi » et permettent son échappement aux cellules effectrices du système immunitaire, la molécule HLA-G est qualifiée de

« tolérogène » et considérée comme la principale molécule de la tolérance immunitaire (Rouas-Freiss, Khalil-Daher et *al.* 1999, Carosella 2011). Les modes d'action de HLA-G sont schématisés dans la Figure 12.

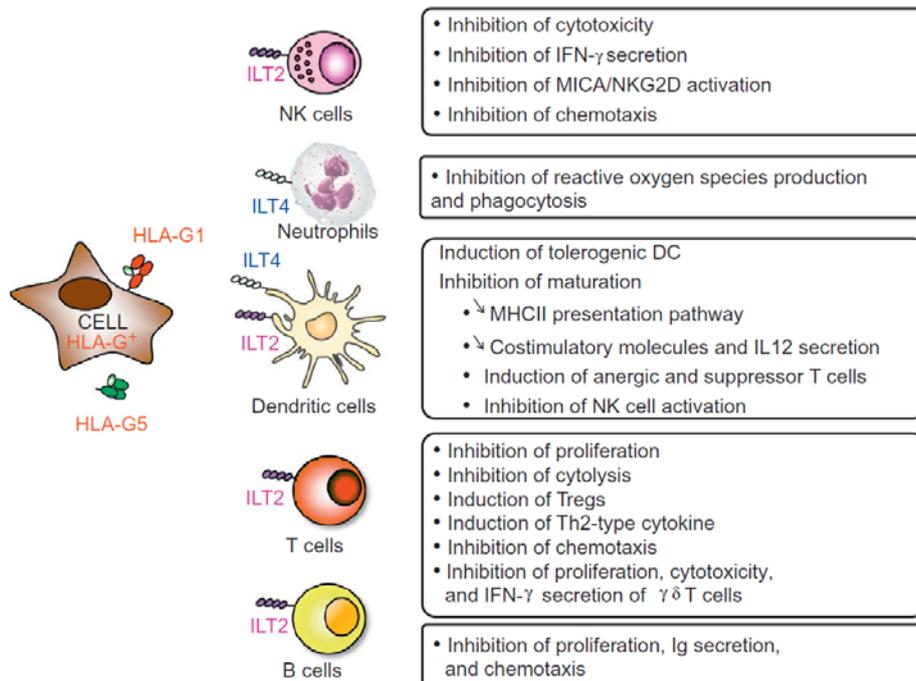


Figure 12 : Fonctions immunitaires de HLA-G (Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015)

2.3 HLA-G en situation physiologique : la grossesse

Pendant longtemps, il a été stipulé que les molécules HLA de classe I n'étaient pas présentes au niveau du trophoblaste, justifiant ainsi le non-rejet du fœtus par l'organisme maternel. Au cours des années 1980, des chercheurs ont identifié un « nouvel antigène » HLA de classe I dans le trophoblaste extra-villeux, différent des autres molécules de classe I connues (HLA-A, B et C) jusque-là (Redman, McMichael et *al.* 1984, Wells, Hsi et *al.* 1984, Ellis, Sargent et *al.* 1986). Ce « nouvel antigène » appelé HLA-G par la suite, n'a été réellement décrit qu'en 1990, dans le

cytotrophoblaste au cours de la grossesse (Ellis 1990, Kovats, Main et *al.* 1990). Depuis ce moment, son expression et son rôle pendant la grossesse ont été amplement étudiés.

La protéine HLA-G a été décrite à l'interface foeto-maternelle, précisément dans le trophoblaste (Kovats, Main et *al.* 1990, Yelavarthi, Fishback et *al.* 1991, van Wijk, Griffioen et *al.* 2001), les cellules endothéliales du chorion (Blaschitz, Lenfant et *al.* 1997, Le Bouteiller, Solier et *al.* 1999), le placenta (Hviid, Larsen et *al.* 2004, Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015), l'amnios et le liquide amniotique (Houlihan, Biro et *al.* 1995, Rebmann, Pfeiffer et *al.* 1999, Hackmon, Hallak et *al.* 2004) aussi bien au début qu'en fin de grossesse. HLA-G est également retrouvé dans le sang circulant des femmes enceintes au cours de la grossesse (Rizzo, Andersen et *al.* 2009) et plusieurs études montrent que son expression est plus élevée chez les femmes enceintes que chez les femmes non enceintes (Hunt, Jadhav et *al.* 2000, Alegre, Diaz-Lagares et *al.* 2007, Darmochwal-Kolarz, Kolarz et *al.* 2012). Pendant la grossesse, HLA-G s'exprime sous les formes solubles HLA-G1, HLA-G5 (Rebmann, Pfeiffer et *al.* 1999, Rizzo, Andersen et *al.* 2009, Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014) qui sont les plus abondantes (Rebmann, Nardi et *al.* 2014) et les formes membranaires HLA-G1, HLA-G2 à la surface des cellules (Kovats, Main et *al.* 1990, van Wijk, Griffioen et *al.* 2001, Hunt, Langat et *al.* 2006, Le Bouteiller 2015). L'isoforme soluble HLA-G7 serait également exprimée, mais rarement, de même que HLA-G3 et HLA-G4 (Rizzo, Vercammen et *al.* 2011, Abediankenari, Farzad et *al.* 2015) .

La présence de HLA-G au niveau du tissu foetal est d'une importance capitale. En effet, au cours de la fécondation, la fusion des cellules germinales paternelles et maternelles s'opère constituant ainsi le patrimoine génétique de l'individu. L'œuf ainsi obtenu comporte donc une part de patrimoine provenant du père constituant un

élément « étranger » pour la mère au sein duquel il va se développer. Malgré la présence de cette allogreffe fœtale au sein de l'utérus, la grossesse physiologique poursuit son développement normal, sans être inquiétée par la réaction immunitaire maternelle. Cette « tolérance » du fœtus par la mère, constitue la tolérance fœto-maternelle et HLA-G y joue un rôle primordial. Le trophoblaste est le principal tissu de l'interface materno-fœtale qui se transforme ensuite en placenta. Il exprime préférentiellement la molécule HLA-G, qui par ses propriétés immunosuppressives, inhibe l'immunité cellulaire et humorale normalement déclenchée par les antigènes de classe Ia et II (Rizzo, Vercammen et *al.* 2011). HLA-G permet l'implantation et agit en protégeant le fœtus de la réponse semi-allogénique de la mère, (Roussev and Coulam 2007, Rizzo, Vercammen et *al.* 2011). La molécule inhibe la destruction des cellules trophoblastiques par les cellules NK maternelles et la prolifération des lymphocytes permettant ainsi le « non-rejet » de l'allogreffe fœtale (Rouas-Freiss, Goncalves et *al.* 1997, Yokoyama 1997, Khalil-Daher, Riteau et *al.* 1999, Le Bouteiller, Solier et *al.* 1999, Dorling, Monk et *al.* 2000, Rizzo, Vercammen et *al.* 2011). La présence de HLA-G interagit également avec la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires maternelles in situ (Clark 1997, Le Bouteiller, Solier et *al.* 1999, van der Meer, Lukassen et *al.* 2004). La forte affinité des isoformes de HLA-G avec les cellules placentaires permet également le remodelage vasculaire utérin et veillent au maintien d'un microenvironnement favorable au développement fœtal (Rizzo, Vercammen et *al.* 2011).

Ces fonctions de HLA-G semblent désormais incontestables pour le bon déroulement d'une grossesse normale et sont confortées par les études réalisées en situation de grossesse pathologique et en médecine de la reproduction. En dehors de ce domaine, HLA-G est fortement incriminé dans de nombreuses autres pathologies, non liées à la

grossesse. Dans ces situations pathologiques, HLA-G peut être produit par des tissus ou des cellules, non destinées initialement à l'exprimer.

2.4 HLA-G et pathologies

2.4.1 Troubles de la reproduction et grossesses pathologiques

Le domaine de la reproduction est celui où le rôle de HLA-G a été le plus investigué. L'importance du rôle de la protéine pour le succès d'une grossesse, explique l'intérêt des études dans les grossesses pathologiques.

De nombreuses études se sont intéressées au profil de HLA-G chez des femmes candidates à la procréation médicalement assistée (PMA), notamment par fécondation *in vitro* (FIV). Ainsi, Sher et *al.* ont montré que le dosage du niveau de HLA-G soluble dans le surnageant des embryons obtenus 46 heures après une FIV serait un indicateur potentiel de réussite de la FIV et permettrait de réduire le nombre d'embryons transférés aux femmes (Sher, Keskinetepe et *al.* 2004). Une autre étude réalisée dans des conditions similaires rapporte que les embryons ayant des niveaux élevés de HLA-G soluble dans le surnageant du milieu de culture évolueraient plus favorablement vers une grossesse et propose le dosage de HLA-G soluble comme un marqueur du développement embryonnaire (Noci, Fuzzi et *al.* 2005). Cependant, si ces résultats ont été retrouvés dans d'autres études, confortant le rôle fondamental de HLA-G pour le succès d'une fécondation *in vitro* (Fuzzi, Rizzo et *al.* 2002, Vercammen, Verloes et *al.* 2008), il existe également des travaux contradictoires (Tabiasco, Perrier d'Hauterive et *al.* 2009, Vercammen, Verloes et *al.* 2009).

Le dosage de HLA-G est également possible dans le liquide folliculaire et il a été mis en évidence une association entre le niveau de HLA-G soluble et un taux de fécondation plus élevé (Rizzo, Fuzzi et *al.* 2007). Ainsi, ce dosage est préconisé pour sélectionner les meilleurs ovocytes destinés à la FIV. Il est également décrit que l'expression de HLA-G dans les tissus testiculaires seraient associés à la spermatogénèse (Yao, Shu et *al.* 2014).

Dans les cas de fausses couches récurrentes, des faibles niveaux d'expression de HLA-G sont retrouvés dans le sérum ou dans le plasma sanguin des femmes (Dahl and Hviid 2012), dans la décidua utérine (Papamitsou, Toskas et *al.* 2014) et au niveau des cellules mononuclées du sang périphérique (Abediankenari, Farzad et *al.* 2015). Les mêmes constats ont été faits avec des niveaux sériques de HLA-G bas chez des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (Oztekin, Fenkci et *al.* 2015).

En dehors des troubles de la reproduction liés à la conception ou au développement du fœtus, de multiples études ont été faites dans le cadre de grossesses pathologiques. Ainsi, chez les femmes souffrant de pré-éclampsie, les niveaux de HLA-G mesurés dans le sérum sanguin et dans les tissus placentaires en fin de grossesse sont bas (Colbern, Chiang et *al.* 1994, Yie, Li et *al.* 2004).

Si les niveaux élevés de HLA-G semblent associés à une meilleure issue de la grossesse, cela n'est pas toujours le cas dans d'autres maladies pour lesquelles l'expression de HLA-G peut tantôt être bénéfique, tantôt délétère. Nous allons brièvement présenter certaines d'entre elles et insisterons particulièrement sur les associations entre HLA-G et les infections.

2.4.2 HLA-G et maladies non infectieuses

De part son action inhibitrice du système immunitaire, la protéine HLA-G a été montrée associée à un certain nombre de pathologies impliquant l'immunité. Les domaines où le rôle de HLA-G a été le plus exploré sont la transplantation d'organe, la cancérologie et les infections, notamment virales. HLA-G semble également impliqué dans d'autres situations comme les allergies (Ciprandi, Corsico et *al.* 2014, Ciprandi and DeAmici 2014, Murdaca, Contini et *al.* 2016) ou encore des conditions générant une hypoxie (Bourguignon, Yaghi et *al.* 2010) et des maladies auto-immunes comme la maladie cœliaque (Fabris, Segat et *al.* 2011, Catamo, Zupin et *al.* 2015), la maladie de Crohn (Zidi, Ben Yahia et *al.* 2015), le lupus érythémateux disséminé (Lee, Bae et *al.* 2015), la polyarthrite rhumatoïde (Kim, Chung et *al.* 2012, Catamo, Addobbati et *al.* 2014, Veit, de Lima et *al.* 2014), la sarcoïdose (Hviid, Milman et *al.* 2006). Dans ce paragraphe nous présenterons plus spécifiquement certaines études concernant les greffes d'organes et les cancers. Puis nous nous attarderons sur les infections.

2.4.2.1 HLA-G et transplantation

La complication majeure, redoutée après toute transplantation d'organe d'un sujet donneur à un autre sujet receveur (allogreffe) est le rejet de l'organe greffé. Le rejet d'une greffe traduit une réaction immunitaire protectrice normale du sujet receveur face à des antigènes étrangers apportés par l'organe provenant du donneur. Cette réaction fait intervenir les cellules immunitaires de l'hôte et les antigènes du greffon dont les antigènes HLA de classe I et II (Brick, Atouf et *al.* 2011).

Toutes les cellules immunitaires impliquées dans la réaction de l'hôte envers le greffon (notamment les cellules NK, les lymphocytes T CD4+ et CD8+), présentent une affinité pour la protéine HLA-G, et étant donné le rôle inhibiteur de HLA-G on comprendra bien qu'une forte expression de HLA-G puisse être associée à un meilleur pronostic de la greffe.

Deux études réalisées chez des transplantés cardiaques ont montré une association entre la présence de HLA-G dans les biopsies du muscle cardiaque (Lila, Carpentier et *al.* 2000) et dans le sérum sanguin des sujets transplantés (Lila, Amrein et *al.* 2002) et l'absence de rejet et une corrélation entre cette expression et le pronostic de la greffe cardiaque. Dans une autre étude réalisée dans le cadre de la surveillance immunologique survenant après la réalisation de greffes cardiaques, il a été mis en évidence chez un groupe de patients des niveaux élevés de HLA-G dans le sérum après l'administration d'un immunosuppresseur, associés à un meilleur pronostic de la greffe (Luque, Torres et *al.* 2006).

En néphrologie, les mêmes observations entre HLA-G et le succès/rejet de greffe rénale ont été faites. En 2006, la présence de HLA-G soluble dans le sérum des sujets ayant bénéficié d'une transplantation rénale a été associée à une meilleure acceptation de l'organe greffé. Dans la même étude, il a été suggéré une corrélation positive entre la concentration sérique de HLA-G soluble et l'effet protecteur qui en découle avec une notion de dose-effet (Kaneku 2006). Des résultats similaires sont décrits par d'autres études et confortent l'hypothèse selon laquelle HLA-G induirait une tolérance immunitaire après une greffe rénale (Qiu, Terasaki et *al.* 2006, Crispim, Duarte et *al.* 2008, Bardi, Sfar et *al.* 2011, Jin, Li et *al.* 2012, Xiao, Zhou et *al.* 2013, Ezeakile, Portik-Dobos et *al.* 2014, Farid, Al-Wedaie et *al.* 2015, Polakova, Bandzuchova et *al.* 2015).

Ces résultats ont d'ailleurs motivé la recommandation de HLA-G en traitement dans certaines greffes. L'utilisation de HLA-G à des fins thérapeutiques avait été préconisée par LeMaoult et *al.* en 2013 qui ont testé deux molécules synthétiques de HLA-G et obtenu une meilleure tolérance des greffes de peau chez la souris (LeMaoult, Daouya et *al.* 2013). L'efficacité thérapeutique de HLA-G recombiné a été également testée chez le rat après une transplantation intestinale. Dans le groupe traité, il a été observé une inflammation locale moins importante qu'en absence d'un traitement par HLA-G recombiné (von Websky, Kitamura et *al.* 2016).

Des constats similaires ont été faits dans les transplantations hépatiques (Basturk, Karakayali et *al.* 2006, Zarkhin, Talisetti et *al.* 2010, Hu, Wu et *al.* 2014), pulmonaires (Brugiere, Thabut et *al.* 2015), pancréatiques (Rebmann, Bartsch et *al.* 2009) et de cellules mésenchymateuses (Du, Wu et *al.* 2008, Le Maux, Noel et *al.* 2008, Biedron, Rybka et *al.* 2015).

Tous ces résultats poussent certains auteurs à préconiser le dosage de HLA-G comme élément de surveillance de survenue et de sévérité des rejets dans différents domaines (Rizzo, Campioni et *al.* 2008, Liu, Chen et *al.* 2013, Biedron, Rybka et *al.* 2015).

En dehors de l'influence de l'expression de la molécule HLA-G, certains polymorphismes du gène ont été décrits comme associés à divers pronostics au cours des greffes d'organes. Ainsi, le polymorphisme HLA-G*01:06~UTR2 serait associé à une faible production de HLA-G sérique, à un mauvais pronostic et à la survenue d'un rejet suite à une transplantation pulmonaire dans une étude française (Di Cristofaro, Reynaud-Gaubert et *al.* 2015). Le polymorphisme HLA-G 14-bp insertion/deletion (I/D) est également associé au pronostic dans la greffe rénale : le génotype 14-pb I/I

serait associé à un risque plus élevé de rejet alors que le génotype 14-pb D/D serait associé à une survie meilleure (Misra, Prakash et *al.* 2013). Ce dernier résultat confirme celui de Crispim et *al.* en 2008 dans une population brésilienne (Crispim, Mendes-Junior et *al.* 2008).

2.4.2.2 HLA-G et cancers

Au cours des maladies cancéreuses, les cellules tumorales utilisent des mécanismes d'échappement au système immunitaire pour pouvoir se développer. Ces mécanismes vont parfois de l'altération des molécules HLA classiques (A, B et C) à la destruction totale ou complète de celles-ci, leur permettant de ne pas être reconnues par les cellules immunitaires. Certaines cellules tumorales expriment également à la surface de leur membrane des molécules HLA-G, qui semblent indispensables à la croissance et à l'invasion tumorales (Wilczynski 2006).

Plusieurs études ont été faites en cancérologie et décrivent l'expression ectopique de HLA-G par les tumeurs en comparaison aux tissus normaux (Singer, Rebmann et *al.* 2003, Ye, Yang et *al.* 2007, Yie, Yang et *al.* 2007, Cai, Han et *al.* 2012). De nombreux auteurs démontrent que l'expression importante de HLA-G dans certaines maladies cancéreuses seraient associée à un mauvais pronostic (Schutt, Schutt et *al.* 2010, Yan 2011, Yie and Hu 2011). C'est le cas dans le cancer du poumon (Yie, Yang et *al.* 2007), de l'estomac (Yie, Yang et *al.* 2007), de l'intestin et du rectum (Ye, Yang et *al.* 2007), de l'ovaire (Jung, Kim et *al.* 2009), de la sphère naso-pharyngée (Cai, Han et *al.* 2012), de l'œsophage (Lin, Zhang et *al.* 2011, Zheng, Xu et *al.* 2014), du rein (Li, Lin et *al.* 2009), du sein (Elliott, Jiang et *al.* 2011), de la thyroïde (Nunes, Ayres et *al.* 2013), du foie (Lin, Chen et *al.* 2010, Wang, Ye et *al.* 2011) et de la vessie (El-Chennawi, Auf et *al.* 2005).

Des polymorphismes du gène *HLA-G* sont également décrits associés à certaines tumeurs. Au Brésil, la présence de l'allèle G*0103 est associée à une protection contre le cancer de la vessie chez les sujets non tabagiques, tandis que le groupe allélique G*0104 est associé à un risque de cancer plus élevé chez les fumeurs (Castelli, Mendes-Junior et *al.* 2008). Dans la même étude l'allèle G*0101 et le génotype G*0101/G*0101 étaient associés à un risque élevé de cancer de la vessie. Toujours au Brésil, Teixeira et *al.* ont montré que la présence de la « délétion de 14pb » augmentait significativement la susceptibilité au cancer hépatocellulaire (Teixeira, Mendes-Junior et *al.* 2013), confirmant les analyses de Jiang et *al.* en Chine qui retrouve un effet protecteur de l'« insertion de 14pb » dans le même type de cancer (Jiang, Chen et *al.* 2011). En Pologne, une étude établit plutôt une association entre le génotype -725C>G>T et l'extension des métastases ganglionnaires dans le cancer pulmonaire non à petites cellules : la présence de l'allèle C augmente de 37% le risque de cancer pulmonaire (Kowal, Wisniewski et *al.* 2015).

Ainsi, tout comme dans les transplantations, HLA-G est proposé comme marqueur de l'évolution de la maladie puisque le niveau semble varier en fonction du stade et serait plus élevé en cas de métastases et d'atteintes ganglionnaires. De plus, étant donné les interactions complexes existant entre HLA-G et certaines cellules tumorales exprimant fortement HLA-G, des anticorps anti-HLA-G pourraient par exemple être associés à certains traitements anticancéreux (Zidi and Bartegi 2008, Amiot, Ferrone et *al.* 2011, Yan 2011, Seliger 2013, Gimenes, Teixeira et *al.* 2014).

Dans les tumeurs liquides (tumeurs sanguines essentiellement), l'association entre l'expression élevée de HLA-G et l'évolution de la maladie n'est pas toujours mise en évidence et reste controversée (Rebmann, Nuckel et *al.* 2007, Perez-Chacon, Rosado

et *al.* 2009, Yan 2010, Guo, Chen et *al.* 2011, Guillaume and Marolleau 2013, Attia, Nosair et *al.* 2014).

Il apparait donc que le rôle et l'implication de HLA-G ont été largement documentés pour les pathologies non infectieuses. Concernant les infections, l'activité régulatrice de HLA-G sur le système immunitaire rend son étude absolument indispensable.

2.4.3 HLA-G et maladies infectieuses

La recherche axée sur la protéine HLA-G en pathologie infectieuse, connaît des progrès considérables au cours de ces dernières années. Bien que les infections virales occupent une grande partie de ces travaux, les études se développent rapidement sur les maladies parasitaires. Les infections bactériennes sont quant à elles, beaucoup moins renseignées. Nous allons présenter successivement ces différents aspects en insistant sur les parasitoses tropicales.

2.4.3.1 HLA-G et infections bactériennes

Au cours du choc septique, des niveaux de HLA-G soluble élevés sont observés dans le plasma et au niveau des leucocytes circulants et, dans la même étude, les survivants avaient les niveaux les plus élevés et persistant 7 jours après le début du choc (Monneret, Voirin et *al.* 2007). Dans la tuberculose, les formes cliniques généralisées sont associées à des niveaux plasmatiques de HLA-G plus élevés que dans les formes localisées (Saurabh, Thakral et *al.* 2016). L'infection gastrique par *Helicobacter pylori*, et l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* sont elles aussi associées respectivement à une expression gastrique de HLA-G (Souza, Genre et *al.* 2016) et à

une augmentation de la production de la molécule HLA-G plasmatique (Rizzo, Bergamini et al. 2016).

2.4.3.2 HLA-G et infections virales

Dans l'infection à VIH (virus de l'immunodéficience humaine acquise), il a été rapporté des niveaux de HLA-G soluble élevés dans le liquide cervico-vaginal des femmes infectées (Thibodeau, Lajoie et al. 2011). Cette augmentation est aussi retrouvée dans le plasma des malades et serait proportionnelle à l'évolution de la maladie (Puppo, Brenci et al. 1994, Donaghy, Gros et al. 2007, Lajoie, Fontaine et al. 2009, Huang, Burke et al. 2010, Murdaca, Contini et al. 2011). La molécule proviendrait de la production intracellulaire de HLA-G par les monocytes et les cellules dendritiques (Huang, Burke et al. 2010). De surcroît, la mise en place d'un traitement antirétroviral s'accompagne d'une diminution progressive des niveaux plasmatiques de la protéine, concomitante à une augmentation du taux de CD4+ (Murdaca, Contini et al. 2009, Murdaca, Contini et al. 2011). Du point de vue génétique, des associations entre certains polymorphismes de *HLA-G* et la transmission materno-infantile de l'infection à VIH ont été décrites (Segat and Crovella 2012, Segat, Zupin et al. 2014, Hong, Paximadis et al. 2015). Une étude réalisée en 2013 au Kenya a démontré l'existence de polymorphismes génétiques associés au développement de la maladie : ainsi, le génotype G*010101 serait lié à une protection ou une résistance face au virus VIH-1, alors que le génotype G*010404 serait associé à une plus grande susceptibilité à l'infection (Turk, Kimani et al. 2013).

Concernant les hépatites virales, les niveaux de HLA-G solubles sont élevés et corrélés à l'évolution de la maladie, aussi bien dans l'hépatite B (Shi, Lin et al. 2011, Park, Park et al. 2012, Han, Li et al. 2014) que dans l'hépatite C (Weng, Fu et al.

2011, Murdaca, Contini et al. 2015). On observe une diminution en cas de traitement, celle-ci étant en faveur d'un bon pronostic et constituant un élément de surveillance thérapeutique (Khorrami, Mohammadpour et al. 2015, Ding, Ma et al. 2016). Au niveau cellulaire, l'analyse histo-pathologique du foie révèle une expression de HLA-G au niveau des hépatocytes des sujets malades (Souto, Crispim et al. 2011, Crispim, Silva et al. 2012). Ici encore des polymorphismes génétiques de *HLA-G* sont décrits associés à certaines hépatites, comme par exemple le génotype 14-pb I/I qui serait lié à une plus grande susceptibilité à l'infection par VHB (Laaribi, Zidi et al. 2015).

L'augmentation des niveaux de HLA-G soluble est retrouvée dans d'autres infections virales notamment en cas d'infection par le cytomégalo virus (CMV) dans le plasma, les monocytes et les macrophages (Onno, Pangault et al. 2000, Yan, Lin et al. 2009) ; dans la grippe (LeBouder, Khoufache et al. 2009, Chen, Chen et al. 2011, Foucault, Moules et al. 2011), la rage et l'infection par *Herpes simplex virus* (Lafon, Prehaud et al. 2005). Génétiquement on retrouve aussi des associations entre certains polymorphismes génétiques et l'infection à *Papilloma virus* (Metcalf, Roger et al. 2013, Bortolotti, Gentili et al. 2014, Xu, Shi et al. 2014) ainsi que l'infection à CMV (Jin, Xu et al. 2012).

2.4.3.3 HLA-G et infections parasitaires

En parasitologie quelques données existent mais sont moins nombreuses que dans les infections virales. La recherche axée sur les modifications de HLA-G au cours des infections parasitaires s'intensifie au cours de ces dernières années.

Dans la toxoplasmose, Robert-Gangneux et al. ont étudié le rôle de HLA-G soluble au cours du passage trans-placentaire de *Toxoplasma gondii* entraînant une toxoplasmose congénitale. Les niveaux de HLA-G soluble ont été mesurés dans le

liquide amniotique maternel de trois groupes d'enfants. Un premier groupe était constitué de 12 enfants infectés et nés de mères infectées pendant la grossesse, un deuxième groupe de 49 enfants non infectés nés de mères infectées, puis un dernier groupe contrôle comprenant 24 nouveau-nés sains nés de mères non malades. Le niveau de HLA-G soluble était plus élevé chez les enfants en cas d'infection maternelle que dans le groupe contrôle ($p < 0,001$). En plus de cela, parmi les enfants de mères infectées, ceux qui sont malades ont des niveaux de HLA-G soluble plus élevés que ceux du groupe des enfants non malades ($p < 0,05$). Ces résultats sont compatibles avec le potentiel rôle de HLA-G dans la transmission materno-foetale de la toxoplasmose (Robert-Gangneux, Gangneux et al. 2011). Cette augmentation du niveau de HLA-G soluble est également observée dans le trophoblaste en cas d'infection par *Toxoplasma gondii*, et serait proportionnelle à l'évolution de l'infection (Han, Jiang et al. 2014). En 2007, Donaghy a démontré sur un échantillon de 94 sujets constitué de 31 sujets séropositifs au VIH-1, 7 co-infectés VIH et leishmaniose viscérale, 17 sujets atteints de leishmaniose sans co-infection VIH et sujets sains, qu'en cas de leishmaniose viscérale, la proportion de sujets ayant un niveau de HLA-G soluble plasmatique détectable pouvait être élevée : en effet il montre que la proportion de sujets ayant un niveau de HLA-G soluble détectable serait plus élevée en cas d'infection au VIH (81%), plus qu'en cas de co-infection (57%), leishmaniose isolée (35%) et en absence d'infections (3%). On remarque ainsi qu'en cas de leishmaniose, la production de HLA-G serait plus élevée qu'en absence de leishmaniose, même si dans cette étude, la différence n'est pas significative, probablement liée à la faible taille de l'échantillon d'étude. De la même manière, le niveau de HLA-G soluble dans le plasma serait également plus élevé en cas de leishmaniose que chez les sujets sains (Donaghy, Gros et al. 2007). En 2013, Gangneux et al. rapporte une diminution importante du niveau de HLA-G soluble

dans le sérum de sujets atteints de leishmaniose après trois mois de traitement (Gangneux, Poinsignon et *al.* 2013).

La trypanosomose humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil est due à un trypanosome transmis par la piqûre d'une glossine (mouche tsétsé). Il en existe deux formes, une chronique causée par *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b gambiense*) et une aigüe due à *T.b. rhodesiense*. La forme chronique représente 95 % des cas et évolue en deux phases. Au cours de la phase 1 hématolymphatique le parasite se multiplie dans le sang et la lymphe et les signes cliniques sont non spécifiques. Classiquement, sans traitement, la maladie évolue vers une phase secondaire, neuro-encéphalitique, avec invasion du système nerveux central (SNC) par le parasite et apparition des signes neurologiques qui conduisent, sans traitement, au décès du malade. Aucun élément ne permet de déceler le moment du passage entre la phase 1 et la phase 2. Dans la population exposée, à côté des malades et des sujets sains existe un groupe d'individus présentant une réponse sérologique spécifique de *T.b. gambiense* fortement positive mais chez qui le parasite n'est pas mis évidence malgré des recherches répétées. Certains de ces sujets séropositifs (SERO) vont évoluer vers la maladie (SERO/THA) alors que d'autres vont maintenir cet état, voire dans certains cas contrôler l'infection jusqu'à la disparition des traces sérologiques et donc, une guérison spontanée (Garcia, Jamonneau et *al.* 2000, Jamonneau, Ilboudo et *al.* 2012). Il n'est pas possible à ce jour de distinguer parmi les sujets séropositifs (SERO) ceux qui vont évoluer vers la maladie et, en zone d'endémie ces sujets sont laissés sans traitement avec des consignes de surveillance qui ne sont qu'exceptionnellement suivies. Deux études ont été réalisées concernant l'association HLA-G et la THA. Dans la première, faite en 2013 en République Démocratique du Congo dans une population de 353 individus, il a été montré que l'« insertion de 14 pb » et l'allèle G

en position +3196 étaient associés à un risque élevé de la maladie, toutes phases confondues, ($p=0,008$, et $p=0,022$ respectivement). Inversement, la présence des allèles C en position +3003 et de l'allèle G en position +3010 et +3187 semble associée à une diminution du risque de développer la THA ($p = 0,015$, $p = 0,044$ et $p = 0,037$, respectivement) (Courtin, Milet et *al.* 2013). La seconde étude a analysé les variations des niveaux de HLA-G plasmatiques en fonction de l'évolution de la maladie (Gineau, Courtin et *al.* 2016). Il a été mis en évidence que les niveaux plasmatiques de HLA-G soluble étaient plus élevés dans le groupe de patients THA ($p= 6.10^{-7}$) et dans le groupe SERO/THA, sujets séropositifs développant la maladie ($p= 0,007$) que dans le groupe SERO de sujets contrôlant l'infection. Il n'y avait pas de différence entre SERO/THA et THA (Gineau, Courtin et *al.* 2016). Il semble donc qu'un niveau élevé de HLA-G soluble au moment du diagnostic de séropositivité soit un facteur de risque de développer la maladie pour certains sujets séropositifs. Grâce à ces résultats, il serait envisageable d'utiliser ce dosage de HLA-G plasmatique en tant que marqueur afin d'identifier très précocement, les sujets qui feront la maladie, et leur administrer un traitement adéquat.

Une étude a été faite au Bénin pour explorer l'association entre le niveau de HLA-G soluble et les infections helminthiques au cours de la grossesse. Des femmes enceintes ($n=400$) ont été suivies du début de la grossesse à l'accouchement au Bénin. Les niveaux de HLA-G ont été dosés trois fois au cours de la grossesse. Dans le groupe des femmes ayant eu une infection helminthique, il y avait plus de femmes avec des hauts niveaux de HLA-G soluble plasmatiques que dans le groupe des femmes non infectées. Il serait toutefois intéressant de confirmer ces résultats compte tenu de la faible prévalence d'helminthiases dans cette population (5 à 9%) (Avokpaho 2014).

Dans le cas du paludisme, quatre études ont été publiées. La première a été réalisée en 2005 par Sartelet et *al.* au Sénégal. Chez 30 femmes enceintes dont 15 ayant une infection palustre placentaire, il retrouve une expression trophoblastique de HLA-G plus faible ($p < 0,01$) chez les femmes infectées (Sartelet, Schleiermacher et *al.* 2005). Ce résultat peut sembler étonnant en comparaison aux observations faites dans les autres infections mais il est compatible avec le risque de fausse couche associé à l'infection palustre. Il faut noter que l'échantillon d'étude est très réduit, et qu'il s'agit d'une étude immunohistochimique sans dosage de protéine soluble.

La deuxième étude a été réalisée par Garcia et *al.* en 2013 au Sénégal. Une cohorte de plus de 1000 sujets (enfants et leurs parents) a été suivie pendant 3 ans avec une surveillance rapprochée de l'infection palustre. Il a été montré que l'allèle +3187G et l'haplotype UTR-1 (14 bp-Del /3001C /3003T /3010G /3035C /3052C /3142C /3187G /3196C) étaient associés à un faible nombre d'infections alors que l'haplotype UTR-3 (Del /3001C /3003T /3010C /3035C /3152C /3142G /3187A /3196C) était associé à un nombre d'infections élevé au cours du suivi (Garcia, Milet et *al.* 2013). Cette étude fut la première à évoquer l'existence d'une éventuelle association entre le paludisme et HLA-G. Pour affiner ces travaux, une autre étude génétique a été faite par Sabbagh et *al.* sur une partie de l'échantillon précédent avec 483 individus. L'objectif était d'évaluer l'association entre les polymorphismes de *HLA-G* et la réponse immune spécifique à *Plasmodium falciparum* (Sabbagh, Courtin et *al.* 2013). Les allèles +3010G et +3142C étaient ensemble liés à une augmentation de la réponse IgG1 ($p = 0,039$) et IgG totale ($p = 0,011$) orientées contre l'antigène GLURP du parasite. De la même manière, l'allèle +3196G ressort significativement associés à un haut niveau d'anticorps IgG3 orientés contre l'antigène MSP2. Cette dernière étude renforce l'idée de l'association entre le *HLA-G* et le paludisme.

La dernière étude effectuée dans le cadre de l'exploration de l'association entre HLA-G et paludisme a été faite par Sadissou et *al.* en 2014 au Bénin (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014). Elle a porté sur 165 femmes incluses à l'accouchement et leurs nouveaux-nés suivis de la naissance à 12 mois. Dans cette étude, le niveau maternel de HLA-G soluble a été mesuré à l'accouchement et chez les enfants à la naissance et de manière trimestrielle. Le niveau de HLA-G de l'enfant à la naissance (dans le sang du cordon) était fortement corrélé à celui de la mère ($r=0,74$; $p<10^{-3}$) et cette corrélation persiste au cours de la première année de vie ($p<10^{-3}$). D'un autre côté, les niveaux élevés de HLA-G chez les enfants au cours du suivi étaient significativement associés au faible poids de naissance ($p=0,04$) et à un risque plus élevé de développer une infection palustre au cours des mois suivants ($p=0,022$). Il n'y avait cependant pas d'effet entre l'infection placentaire et le niveau de HLA-G soluble de la mère et de l'enfant. Chez le nouveau-né, la présence d'une infection au moment du prélèvement ou les quelques jours le précédant n'influence pas le niveau de HLA-G soluble. Cette étude apporte donc un argument supplémentaire en faveur du rôle de HLA-G dans l'infection palustre mais souligne également la complexité de cette association. Le point faible de cette étude réside néanmoins en la non-disponibilité des données chez la mère durant la grossesse puisque les femmes ont été incluses à l'accouchement. L'exploration de cette association complexe a été poursuivie et elle fera l'objet d'un chapitre de cette thèse. Le résultat précédent a fait l'objet d'un article publié dans *Malaria Journal* dont nous sommes le second auteur (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014).

Pour conclure ce chapitre sur les infections et notamment parasitaires tropicales, il y a maintenant un certain nombre d'arguments en faveur de l'implication de HLA-G dans la sensibilité à ces infections. Pour ce qui est du paludisme les résultats

précédents sont compatibles non seulement avec une association directe entre HLA-G et la maladie au niveau individuel, mais permettent également de poser la question du rôle éventuel de HLA-G dans les interactions entre la mère et le fœtus au cours du paludisme gestationnel. Rappelons en effet que les deux principales conséquences du paludisme gestationnel sur le nouveau-né sont un faible poids de naissance et une sensibilité accrue au paludisme s'exprimant par un délai de première infection plus court en cas d'infection placentaire. Le mécanisme sous-jacent à cette sensibilité, bien que non totalement élucidé, a été identifié comme une tolérance immunitaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que HLA-G pouvait jouer un rôle majeur dans cette interaction mère-enfant et dans ce phénomène de tolérance immunitaire. Les premiers résultats montrant cette corrélation entre le niveau maternel et celui de l'enfant ainsi qu'une association entre les hauts niveaux de protéine soluble et le risque de paludisme ou de faible poids de naissance sont compatibles avec cette hypothèse.

Cependant, pour explorer de manière plus précise cette hypothèse il était indispensable de disposer de données sur l'ensemble de la grossesse et non pas uniquement à l'accouchement. C'est ce qui a motivé la mise en place du programme Tolimmunpal (Tolérance immunitaire et paludisme) financé par l'ANR (Agence nationale de la recherche française) et qui consistait en un suivi actif d'une cohorte de femmes enceintes et de leurs nouveau-nés. Ce suivi a été réalisé au sud du Bénin et représente le programme principal de notre thèse. Néanmoins, afin d'explorer plus précisément l'association entre HLA-G et le paludisme au niveau individuel nous avons commencé nos travaux par une nouvelle analyse des données exposées précédemment en utilisant une méthodologie particulière, les classes latentes. Cette méthodologie permettra, comme nous le verrons, de déterminer s'il existe dans cette

population d'enfants, des groupes dont le niveau de HLA-G soluble et son évolution se ressemblent.

Dans la suite de ce mémoire nous exposerons successivement ces travaux, en débutant par l'analyse en classes latentes du programme TORI BOSSITO puis par les analyses du programme Tolimmupal. Pour chacun de ces programmes nous présenterons d'abord le matériel et les méthodes utilisés puis exposerons les résultats.

Chapitre 2 : Méthodologie et résultats

Dans cette deuxième partie, nous aborderons donc les différents matériels et méthodes utilisés pour ce travail. Deux études ont été réalisées dans deux localités différentes du Bénin, l'étude « Tori-Bossito » et l'étude « Tolimmunpal ». Nous présenterons brièvement le Bénin, puis nous aborderons successivement ces études en deux grands sous-chapitres. Pour chaque étude, nous exposerons les caractéristiques que sont le site, le type de l'étude, les méthodes de collecte de données sur le terrain, le traitement des données collectées ainsi que les méthodes d'analyse statistiques ayant permis leur exploitation. Nous présenterons ensuite les différents résultats obtenus. La première étude abordée sera l'étude « Tori-Bossito ». A la fin de cette partie, nous ferons un résumé des résultats obtenus avant d'entamer la discussion.

1. Cadre général

Pour déterminer le rôle de la protéine HLA-G dans la tolérance immunitaire face à l'infection palustre, deux études ont été effectuées au Bénin, un pays fortement touché par le paludisme.

Il s'agit d'un pays de l'Afrique occidentale, situé entre le Nigéria à l'est, le Togo et le Burkina-Faso à l'ouest, le fleuve Niger au nord et bordé par l'océan atlantique au sud. Le Bénin s'étend sur une superficie de 114 763 km² et selon les résultats du dernier recensement général de 2013, la population béninoise est estimée à 10 008 749 habitants en 2013 (Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin 2015). Il est subdivisé en douze départements administratifs dont le département de l'Atlantique où se sont déroulées les deux études.

Le Bénin, situé en zone intertropicale au sud du Sahara, se retrouve en pleine zone de transmission palustre stable. Même si la transmission semble continue tout au long de l'année, on observe des périodes de recrudescence pendant les saisons pluvieuses. La transmission du paludisme est inégalement répartie sur le territoire du fait des différences environnementales. Dans le sud du pays où sont réalisées toutes nos études, la transmission est classiquement plus élevée que dans le reste du pays (Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) 2012). Il faut noter qu'il existe toutefois une variabilité importante à une échelle plus fine que régionale. Le climat est subéquatorial et humide avec une alternance de deux saisons sèches (décembre à mars et d'août à septembre) puis deux saisons pluvieuses (avril à juillet et d'octobre à novembre). Les espèces vectrices du paludisme les plus rencontrées sont *Anopheles gambiae s. s.* et *Anopheles arabiensis* (Corbel, N'Guessan et al. 2007, Djogbenou, Pasteur et al. 2010).

Chez les enfants, le taux de mortalité « toutes causes » est estimé à 42‰ en 2013. Avec une prévalence du paludisme cette même année estimée à 40,6% dans la population générale et un taux d'incidence de 16,8%, le paludisme représente la première cause de consultation au Bénin et la première cause d'hospitalisation chez les enfants de moins de cinq ans (44,9%). Dans cette dernière population, les cas de paludisme grave représentent la première cause de décès (37,0%) (Ministère de la santé du Bénin 2014).

La prise en charge nationale du paludisme est assurée par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP Bénin). La politique béninoise de lutte se base sur trois types d'interventions : l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine chez les sujets malades, la lutte anti-vectorielle et le traitement préventif intermittent (TPI) du paludisme chez la femme enceinte, en remplacement de la chimio-prophylaxie à la chloroquine. Le TPI a été réellement implémenté au Bénin à partir de l'année 2006. Le Tableau 2 montre l'évolution de quelques indicateurs de lutte contre le paludisme au cours des dernières années obtenus à partir des données du PNL.

Tableau 2 : Évolution des indicateurs de lutte contre le paludisme au Bénin
 (Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) 2011, Programme national
 de lutte contre le Paludisme (Bénin) 2014, Programme national de lutte contre le
 Paludisme (Bénin) 2015)

Années	Incidence du paludisme	Couverture TPI- SP (1 dose)	Couverture TPI- SP (au moins 2 doses)
2014	17,3%	51,7%	37,0%
2013	16,8%	40,7%	27,6%
2010	16,1%	Non renseigné	45,8%
2008	14,2%	Non renseigné	35,0%
2006	13,7%	Non renseigné	3,0%

Nos travaux ont été réalisés dans le département de l'Atlantique, dans les communes limitrophes de Tori-Bossito et d'Allada.



Figure 13 : Carte du Bénin indiquant la commune de Tori Bossito et la commune d'Allada (Le Port, Cottrell et *al.* 2012)

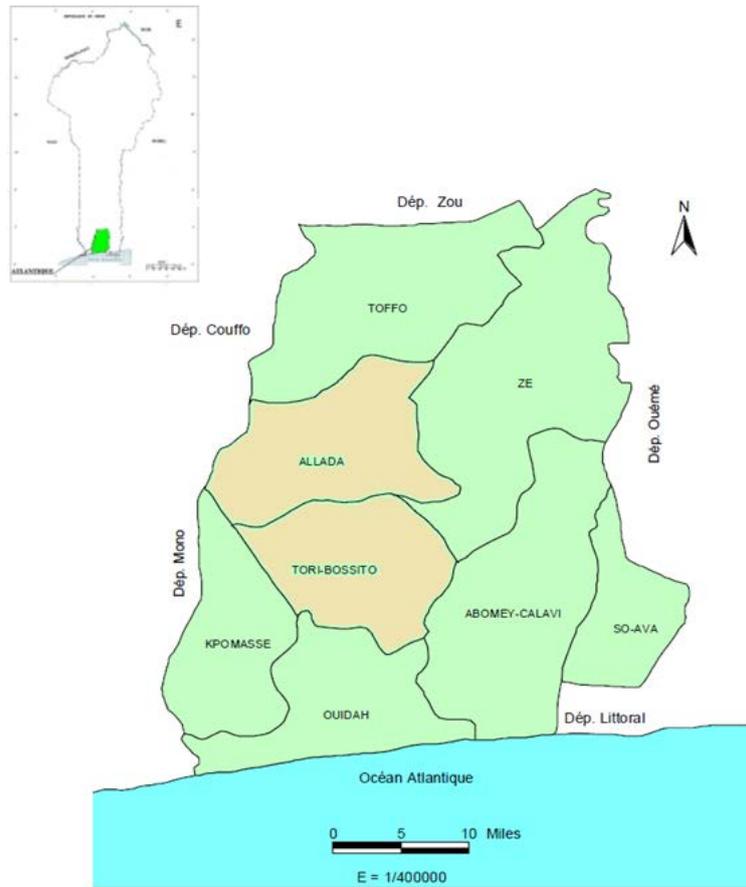


Figure 14 : Localisation des deux zones dans le département de l'Atlantique (Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin 2004)

2. L'étude TORI-BOSSITO

Le but initial de ce programme était d'étudier les facteurs associés au délai d'apparition des premières infections palustres chez des enfants de la naissance à 18 mois. Au départ il n'était pas prévu d'étudier HLA-G dans ce projet et ce n'est qu'une fois les travaux initiaux achevés que nous nous sommes intéressés à cette molécule et à son rôle dans la tolérance immunitaire et la sensibilité au paludisme. C'est pour cette raison que cette partie de nos travaux ne concerne qu'un sous échantillon de la population totale et un temps de suivi plus court de 12 mois. Dans cette partie, notre objectif sera de compléter les travaux antérieurs de Sadissou et *al.* (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014) en appliquant à ces données une méthodologie particulière permettant d'explorer l'existence de différents groupes d'enfants définis selon leurs niveaux de HLA-G entre la naissance et 12 mois.

2.1 Matériel et méthode

2.1.1 Type d'étude

L'étude réalisée a été une étude de cohorte. C'est une étude prospective et descriptive ayant consisté en un suivi longitudinal des enfants de juin 2007 à janvier 2010. Des couples mère-enfant ont été inclus et chaque enfant a été suivi de la naissance jusqu'à ses dix-huit mois. Parmi les enfants de cette cohorte, un sous échantillon a été constitué selon des critères explicités ci-dessous.

2.1.2 Zone d'étude

Tori-Bossito est une commune rurale du sud du Bénin. Elle est localisée dans la plaine côtière, à 40 kilomètres, au nord-ouest de la capitale économique Cotonou (6°25-6°37 Nord et 2°1- 2°17 Est) et se situe dans la dépression de la Lama. La population de Tori-Bossito était constituée de 44 569 habitants en 2002 et de 57 632 habitants en 2013 selon les données des recensements généraux de la population et de l'habitation (RGPH) des années 2002 (RPGH3) et 2013 (RPGH4) (Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin 2004, Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin 2015). La superficie totale de la commune est de 328 km². Elle compte six arrondissements (Avamè, Azohouè-Aliho, Azohouè-Cada, Tori-Bossito, Tori-Cada et Tori-Gare) et 47 villages et quartiers de ville (Ahlonso and Houndonougbo 2005). La première source de revenu dans la localité est l'agriculture. La végétation est faite d'une savane arbustive clairsemée et la commune de Tori-Bossito est traversée par une zone marécageuse (Ahlonso and Houndonougbo 2005). La pluviométrie est d'environ 1300 mm par an.

La région de Tori-Bossito est considérée comme une zone de paludisme méso-endémique avec un taux d'inoculation entomologique de 5,3 piqûres de moustiques infectées/personne/an (intervalle de confiance à 95% IC95%: 1,1-25,9) (Damien, Djenontin et *al.* 2010). La transmission est assurée principalement par *Anopheles gambiae s. s.*, mais *Anopheles funestus* est également présent (Damien, Djenontin et *al.* 2010). Dans cette région, l'espèce parasitaire la plus fréquente est *Plasmodium falciparum*, mais des co-infections peuvent exister avec *P. malariae* et *P. ovale* (Damien, Djenontin et *al.* 2010).

La commune de Tori Bossito a été choisie pour sa proximité avec notre laboratoire à Cotonou. Le site d'étude est constitué de neuf villages (Avamé centre, Gbédjougo,

Houngo, Anavié, Dohinoko, Gbétaga, Tori-Cada Centre, Zébè et Zoungoudo) et de trois centres de santé situés à Tori-Gare, Tori-Cada et Tori-Avamè (Figure 15). Chacun des centres de santé est constitué d'un dispensaire et d'une maternité.

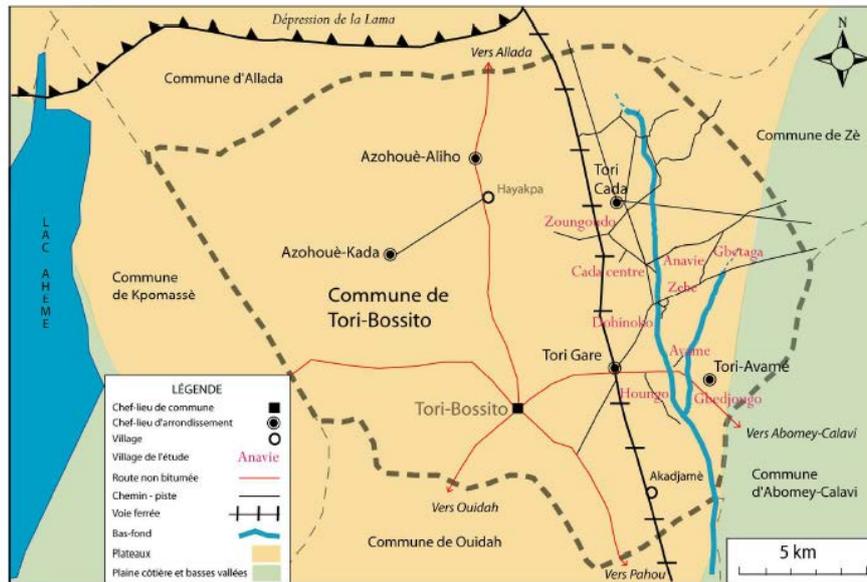


Figure 15 : Cartographie de la commune de Tori-Bossito (Pierrat 2010)

2.1.3 Population d'étude - Critères d'inclusion

La population d'étude est constituée des femmes enceintes et de leurs enfants. Les femmes enceintes sont incluses au moment de l'accouchement, et les nouveau-nés dès la naissance. Pour être inclus dans l'étude, chaque couple mère enfant devait remplir les critères suivants :

- résidence permanente dans l'un des neuf villages de l'étude et ne pas avoir de projet de déménagement,
- accouchement réalisé dans une des maternités des trois centres de santé de Tori-Gare, Tori-Cada et Tori-Avamè,

- consentement éclairé de la femme enceinte. Le protocole de l'étude a été expliqué aux femmes enceintes résidant dans la zone d'étude par une sage-femme, au cours d'une consultation prénatale à partir du septième (7^{ème}) mois de grossesse. Elles bénéficiaient d'un délai de réflexion et de discussion avec leurs conjoints. Des réunions d'explication ont été faites pendant les deux mois précédant le début de l'étude puis pendant toute la période du recrutement des participants. Au moment de l'inclusion, lorsqu'une femme accepte de participer à l'étude, un document écrit (en français et traduit en dialecte local « fon »), expliquant une nouvelle fois le protocole de l'étude et mentionnant le consentement écrit de la mère est signé. Une copie de ce document est remise à la participante. Une fois incluse dans l'étude à l'accouchement, la mère reçoit une carte immatriculée d'un identifiant personnel et unique, permettant l'accès gratuit du nouveau-né aux centres de santé pendant toute la durée du suivi.

Les femmes donnant naissance à des bébés mort-nés, les naissances multiples, les grands prématurés (<28 semaines d'aménorrhée) ainsi que les femmes séropositives au VIH étaient exclues de l'étude.

Un total de 617 femmes enceintes ont été sélectionnées et ont donné naissance à 656 nouveau-nés. Parmi eux 76 enfants ont été exclus dont 25 couples de jumeaux, 3 nouveau-nés triplés, 10 mort-nés et 13 morts néonatales, et les 580 enfants restants ont été inclus dans la cohorte initiale puis suivis pendant plus de 28 jours. Pour constituer l'échantillon de notre étude sur la protéine HLA-G, nous avons sélectionné dans cet ensemble, deux groupes d'enfants :

- le premier groupe est constitué de tous les enfants nés d'une mère ayant un placenta infecté à l'accouchement. Sur un total de 54 enfants dont les mères avaient une infection placentaire, 51 ont pu être sélectionnés et 3 exclus parce que les quantités de plasma disponibles n'étaient pas suffisantes pour le dosage de HLA-G.
- le deuxième groupe a été constitué avec 114 enfants nés de mères sans infection placentaire. Ceux-ci ont été sélectionnés par un tirage au sort aléatoire au sein du groupe des enfants de mères sans infection placentaire ayant suffisamment de matériel biologique pour le dosage de HLA-G. L'échantillon final est constitué de 165 couples mère-enfant (Figure 16).

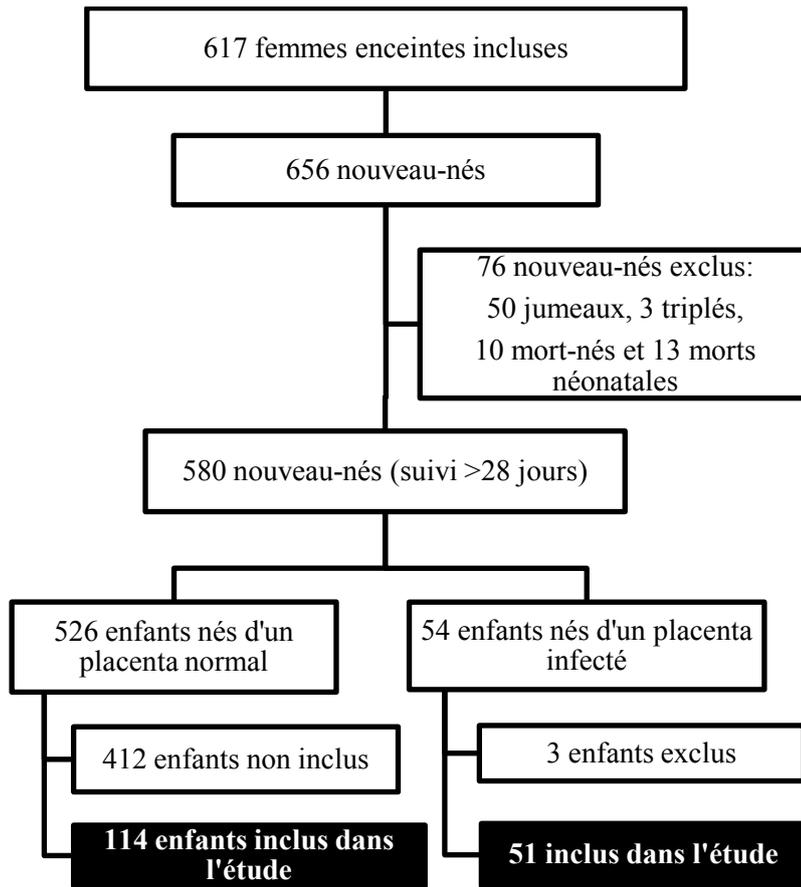


Figure 16 : Diagramme de flux de l'étude Tori-Bossito

2.1.4 Collecte de données maternelles

Les données des mères qui n'ont été suivies qu'à l'accouchement, ont été recueillies ponctuellement par les sages-femmes à la maternité. Un questionnaire a été administré dès l'arrivée pour recueillir les informations sociodémographiques telles que l'âge de la mère, son statut matrimonial (vie maritale ou non, polygamie ou monogamie,...), son appartenance ethnique (Fon, Tori ou autre), ses antécédents gynécologiques et obstétricaux (nombre de grossesses antérieures, fausses couches, mode d'accouchement,...). Le déroulement de la grossesse en cours est renseigné :

suité de la grossesse (nombre de consultations), traitements reçus pendant la grossesse (supplémentation en fer et en acide folique, anti-helminthiques, traitement préventif intermittent du paludisme à la Sulfadoxine Pyriméthamine - SP). Les données de l'examen clinique sont relevées avant l'accouchement. Le terme de la grossesse estimé par la sage-femme à partir de la date des dernières règles ou de la hauteur utérine.

Un prélèvement veineux est effectué avant l'accouchement en vue du dosage de HLA-G, du taux d'hémoglobine et de la réalisation d'une goutte épaisse à la recherche d'une infection palustre périphérique. Le taux d'hémoglobine est lu au moyen d'un appareil HEMOCUE® Les gouttes épaisses (GE) ont été colorées grâce à une solution de GIEMSA à 10%, et la lecture des lames a été faite au microscope par deux opérateurs indépendants. En cas de non concordance, une nouvelle lecture est faite.

Après l'accouchement, une apposition placentaire est réalisée pour rechercher une infection palustre placentaire.

2.1.5 Collecte de données chez les enfants

Les nouveau-nés sont suivis dès leur naissance jusqu'à 18 mois. Les données sont recueillies à la maternité, à domicile et parfois au dispensaire soit par la sage-femme, par les infirmiers du programme ayant reçu une formation spécifique et par des relais communautaires (agents de santé communautaires indépendants du programme).

A la naissance, les mesures anthropométriques du nouveau-né sont effectuées par la sage-femme : la pesée avec un pèse-bébé mécanique SECA® de type 745 de précision de 10 grammes, la taille avec une toise en bois de fabrication locale, d'une précision d'un millimètre. Un prélèvement sanguin veineux ombilical est réalisé afin de doser

l'hémoglobine fœtale et de rechercher la présence de parasites (*Plasmodium*) chez le nouveau-né. Ce prélèvement a également permis le dosage de HLA-G dans le sang du cordon à la naissance.

Pendant les 18 mois suivant la naissance, les enfants sont suivis régulièrement sur divers plans : anthropométrique, nutritionnel, biologique et clinique. La croissance de chaque enfant a été évaluée à travers la mesure mensuelle du poids et de la taille, puis d'un questionnaire alimentaire jusqu'à l'âge de six mois puis à 9, 12, 15 et 18 mois.

Une surveillance active et hebdomadaire des accès palustres a été mise en place dès la naissance : chaque semaine, la température axillaire des enfants était mesurée à leur domicile lors du passage systématique des relais communautaires. Lorsque l'enfant présentait une fièvre (température $\geq 37,5^\circ\text{Celsius}$), ou qu'une notion de fièvre était rapportée depuis la visite précédente, celui-ci était orienté vers le dispensaire de l'un des trois centres de santé du programme. Une fois sur place un examen clinique était fait, accompagné d'une goutte épaisse et d'un test de diagnostic rapide (TDR) ParaScreen®. Le diagnostic d'accès palustre est retenu devant une fièvre ou un épisode fébrile dans les 24 heures associé(e) à une GE positive et/ou TDR positif. Une fois ce diagnostic retenu, l'enfant était traité selon les recommandations du programme national de lutte avec une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine. En dehors de l'accès palustre, un enfant peut par ailleurs présenter une goutte épaisse positive isolée, il s'agit dans ce cas d'une infection asymptomatique. Lorsqu'un enfant fébrile n'est pas conduit au dispensaire comme prévu le jour même ou le lendemain, un relai communautaire est envoyé à son domicile pour rencontrer la mère, jusqu'à ce qu'elle amène l'enfant consulter. Une goutte épaisse systématique mensuelle est réalisée pour chaque enfant, même en

dehors des épisodes fébriles. En cas de toute manifestation ou symptôme clinique survenant entre des visites systématiques, les mères sont invitées à conduire leurs enfants au centre de santé.

Des mesures entomologiques ont été réalisées par capture de moustiques et des données environnementales collectées : nature des sols, végétation, saison climatique, quantité de pluies, proximité d'un cours d'eau. De même des renseignements sont recueillis par questionnaire concernant les habitudes des individus pour se protéger du paludisme (utilisation de moustiquaires, usage de pesticides), leur mode de vie (nombre de personnes par foyer, conditions d'habitation). L'ensemble de ces données entomologiques, environnementales et comportementales ont été utilisées pour modéliser un risque d'exposition au paludisme. Ce travail a permis d'attribuer à chaque enfant du programme un risque d'exposition individuel variant dans le temps et l'espace et dépendant de son lieu de vie et de sa date de naissance (Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012).

A la fin de chaque trimestre, soit à 3, 6, 9, 12, 15 et 18 mois, un prélèvement veineux est effectué pour réaliser différents dosages hématologiques, génétiques et immunologiques dont le dosage de HLA-G soluble.

Dans cette étude, nous ne nous intéresserons qu'au suivi pendant la première année des enfants. Les données collectées ont été enregistrées en double saisie puis validées avec le logiciel Epi Data® après une vérification et une correction des valeurs aberrantes et des incohérences.

2.1.6 Dosage de HLA-G

La mesure de HLA-G a été effectuée dans le sang maternel une seule fois, juste avant l'accouchement. Chez les enfants par contre, les mesures sont réparties sur les 12 premiers mois de vie. Un premier prélèvement veineux est réalisé juste à la naissance, au niveau du cordon ombilical. Les autres prélèvements ont été faits ensuite à 3, 6, 9 et 12 mois. Le dosage de HLA-G dans ces différents prélèvements a été fait par la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) à partir d'anticorps anti HLA-G (MEM-G/9et anti β 2-microglobulin). La méthode utilisée permet la détection des formes solubles HLA-G5 et HLA-G1 shedding (provenant du clivage de l'isoforme membranaire HLA-G1) dans le plasma. Le seuil de détection de la protéine était \sim 1 ng/ml. Chaque échantillon biologique a été traité en double exemplaire. Les niveaux de HLA-G soluble ont été évalués avec une gamme de concentration connue (200 à 12,5 ng/mL). Un contrôle positif a été utilisé : il s'agit du surnageant de culture de cellules de mélanome M8 exprimant HLA-G soluble). Pour la validation d'un dosage, la positivité du contrôle et des points de gamme étaient pris en compte. Lorsque le coefficient de variation excédait 15%, le dosage était systématiquement repris. Des informations plus précises concernant le dosage de HLA-G figurent en annexe (Annexe 1 et Annexe 2).

2.1.7 Définition des variables

La variable d'intérêt est le niveau de HLA-G soluble des enfants pendant le suivi de la naissance à l'âge de un an. Cette variable a été utilisée sous la forme de variable quantitative. Les données brutes de HLA-G ont été transformées en valeurs logarithmiques ($y = \log(\text{HLA-G}) + 1$), afin de se rapprocher d'une distribution normale. Compte tenu de la forte corrélation entre les niveaux de HLA-G soluble de

la mère à l'accouchement et dans le sang du cordon démontrée initialement (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014), nous avons effectué les analyses chez l'enfant en prenant le niveau de HLA-G à partir de 3 mois jusqu'à 12 mois.

Les variables explicatives suivantes ont été utilisées :

- L'infection placentaire : le statut infecté ou non infecté du placenta de la mère est déterminé à l'accouchement après la recherche de parasites dans le sang placentaire. Cette variable a été utilisée sous la forme d'une variable dichotomique, codée présence ou absence (1/0) d'infection placentaire ;
- La gestité : elle est définie par le nombre total de grossesses (y compris les fausses couches). Nous avons distingué deux groupes de femmes : les femmes primigestes dont la première grossesse fait l'objet de l'étude et les femmes multigestes qui ont eu des grossesses antérieures à la grossesse actuelle ; dans le premier cas la variable était codée 1 et 0 dans le second ;
- L'anémie maternelle : elle correspond à un taux d'hémoglobine plasmatique inférieur à 11 g/dl ; elle est codée en présence ou absence d'anémie (0/1) ;
- Le niveau de HLA-G soluble dans le sang circulant maternel : Comme nous le verrons, le niveau de HLA-G soluble présente une grande variabilité. Cette variable a été utilisée sous la forme binaire 1/0, « détection » ou « non détection » de HLA-G soluble dans le sang circulant maternel à l'accouchement. La « non détection » signifie que le taux de HLA-G soluble est sous le seuil de 1 ng/ml ;
- Le niveau de HLA-G soluble dans le sang du cordon ombilical ; comme la précédente, cette variable a été utilisée sous forme binaire.
- Le faible poids de naissance du nouveau-né. Lorsqu'un enfant naît avec un poids inférieur à 2500 grammes à un terme de grossesse au moins égal à 37

semaines d'aménorrhée, l'enfant est considéré ayant un faible poids de naissance (FPN) ; la variable FPN est binaire, codée présence ou absence d'un FPN (1/0) ;

- La prématurité : un nouveau-né est prématuré lorsqu'il naît avant le terme de 37 semaines d'aménorrhée à compter de la date des dernières règles de la mère. Cette variable « prématurité » est une variable binaire, égale à 0 pour une naissance à terme et égale à 1 en cas de naissance prématurée ;
- Le genre du nouveau-né : masculin ou féminin ;
- Le nombre d'infections palustres (fébriles ou non) développées par les enfants pendant tout le suivi (de la naissance à 12 mois). Cette variable quantitative, a été transformée en variable catégorielles pour les analyses. Deux catégories ont été ainsi créées : un nombre d'infections ≤ 1 et un nombre d'infections > 1 ;
- La densité parasitaire palustre, variable quantitative équivalent au nombre de parasites pour 100 leucocytes en cas d'infection palustre ;
- L'âge du nouveau-né en mois,
- Le risque environnemental d'infections. Cette variable quantitative dépendante du temps a été créée à partir des données entomologiques, climatiques et environnementales collectées pendant toute l'étude (Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012). Cette variable permet d'estimer le risque individuel d'exposition à la transmission palustre. Dans ce travail, nous l'avons utilisé en quatre catégories créées à partir des quartiles de la distribution dans notre échantillon. Nous distinguons donc des groupes à très haut risque, à haut risque, à bas risque et à risque très bas d'exposition.

2.1.8 Stratégie d'analyse

Notre objectif étant d'identifier d'éventuels groupes d'enfants ayant des évolutions de leurs niveaux de HLA-G soluble différentes, nous avons réalisé une analyse en classes latentes. En effet, dans les premières analyses faites sur cet échantillon, nous avons utilisé un modèle mixte pour étudier les facteurs pouvant influencer le niveau de HLA-G soluble et voir si cette protéine était associée à l'infection placentaire. L'utilisation d'un modèle mixte suppose que tous les individus proviennent d'une population unique et homogène. L'analyse par classes latentes est une extension des modèles mixtes avec des effets fixes et des effets aléatoires mais qui en plus permet de prendre en compte de façon explicite des variables non observées qu'on appelle classes latentes. Dans le cas présent, nous posons l'hypothèse que cet échantillon d'enfants serait constitué de sous-échantillons, issus de différentes populations ayant chacune des caractéristiques spécifiques. Au sein de ces classes, les sujets se ressemblent plus en termes d'évolution du niveau de HLA-G soluble qu'ils ne se ressemblent d'une classe à l'autre. Comme nous nous intéressons à une variable dépendant du temps (évolution de HLA-G soluble de 3 à 12 mois), les classes sont appelées trajectoires latentes.

Le modèle à classe latente, qui est une extension des modèles mixtes se présente comme suit :

$$y_{it} = \beta_0^j + \beta_1^j Age_{it} + \beta_2^j Age_{it}^2 + \beta_3^j Age_{it}^3 + \alpha_1^j X_{1t} + \dots + \alpha_p^j X_{pt} + \varepsilon_{it}$$

où la variable à expliquer y_{it} est le niveau de HLA-G de l'enfant i à l'instant t , les coefficients β^j sont ceux associés à l'âge de l'enfant dans le groupe j , α^j sont les coefficients associés aux autres covariables dans le groupe j et ε_{it} représente les

résidus du modèle ($\varepsilon_{it} \sim N(0, \sigma^2)$). L'indice t au niveau d'une variable, signifie que cette variable peut dépendre du temps. L'indice i désigne le numéro de l'enfant (1 à 165), t le temps (3 à 12 mois), j le groupe ou la trajectoire d'appartenance de l'enfant (1 à n).

Le déroulement de l'analyse s'est fait en trois grandes phases :

- Premièrement : nous avons modélisé le niveau de HLA-G soluble des enfants de 3 à 12 mois pour déterminer le nombre de trajectoires de HLA-G en utilisant une fonction polynômiale du temps, de degré 3. Dans ce modèle de départ, aucune variable n'est introduite. Nous avons introduit successivement deux puis trois, quatre et cinq trajectoires. Le meilleur modèle en termes de nombre de trajectoires a été déterminé grâce au critère d'information bayésien (BIC). Ce critère quantitatif basé sur la vraisemblance des données et le nombre de paramètres est plus petit pour le meilleur modèle. En plus du BIC, nous avons pris en compte le pourcentage de sujets appartenant aux différents groupes : l'effectif de la trajectoire ne doit pas être trop faible mais suffisant pour une interprétation raisonnable. Pour que ce « critère de suffisance » soit rempli, nous avons considéré que l'effectif d'une trajectoire devrait correspondre à un effectif d'au moins 5% de l'échantillon total, pour être facilement interprétable (Andruff, Carraro et *al.* 2009).
- Deuxièmement : une fois le nombre de trajectoires identifié, nous avons étudié l'effet des différentes variables explicatives sur chaque trajectoire de HLA-G par une analyse univariée puis une analyse multivariée. Au cours de l'analyse univariée, les variables avec un $p > 0.20$ sont sélectionnées pour l'analyse multivariée. Le degré de significativité est fixé au seuil de 0,05. L'effet d'une

co-variable peut être soit identique sur toutes les trajectoires soit variable d'une trajectoire à l'autre. A ce niveau, une importance particulière est accordée à la stabilité des proportions des groupes. Comme le recommande Nagin, lors de l'introduction d'une variable dans le modèle, l'effectif des différentes trajectoires ne doit pas être significativement modifié et rester proche des proportions obtenues dans le modèle vide (Nagin 2005). Une fois le modèle multivarié obtenu, les probabilités a posteriori d'appartenance à un groupe sont calculées pour tous les individus de l'échantillon. Chaque individu a donc une probabilité d'appartenir à chacune des trajectoires et il est « attribué » au groupe pour lequel il a la probabilité d'appartenance la plus élevée. Au sein de chaque groupe, la probabilité à posteriori $\geq 0,70$ d'appartenir à une trajectoire serait un critère raisonnable, et indique une bonne validité du modèle (Andruff, Carraro et *al.* 2009). Nous avons retenu un modèle final grâce à ces divers critères.

Ces deux étapes se complètent et permettent de faire un choix définitif concernant le nombre approprié de trajectoires.

- Dans la troisième et dernière partie, nous avons testé l'effet de prédiction d'appartenance de certaines variables. Il s'agit ici de tester si une variable individuelle permettrait de prédire l'appartenance d'un individu à l'un des groupes. Les variables testées à ce niveau sont des variables maternelles et des variables de l'enfant disponibles dès la naissance. Il s'agit de l'infection placentaire, de la gestité, de l'anémie maternelle, du faible poids de naissance et du niveau de HLA-G soluble dans le sang du cordon ombilical.

Toutes les analyses ont été implémentées avec les versions 12 et 13 du Logiciel Stata®. L'analyse en classe latente a nécessité l'utilisation d'un package spécifique « GLLAMM » destiné aux modèles linéaires généralisés latents et mixtes.

2.1.9 Éthique

Le protocole de l'étude a été approuvé localement par le comité d'éthique de la Faculté des Sciences de la Santé (CE/FSS) de Cotonou au Bénin et par le comité consultatif d'éthique et de déontologie de l'Institut de Recherche pour le développement (CCDE/IRD). Toutes les femmes ayant participé à l'étude ainsi que leurs conjoints ont reçu l'information nécessaire avant la signature de leur consentement. Elles étaient libres de se retirer à tout moment. Les coûts des soins liés à la prise en charge d'un sujet participant à l'étude étaient entièrement couverts par le programme.

2.2 Résultats

2.2.1 Présentation de l'échantillon

L'échantillon d'étude est composé de 165 couples mère-enfant suivis à l'accouchement et pendant la première année pour les enfants. Cet échantillon n'est pas représentatif de la population générale, car constitué de 51 enfants nés d'un placenta infecté (soit 30,91%) et de 114 enfants nés d'un placenta normal, indemne d'infection palustre.

A l'accouchement, 165 dosages de HLA-G solubles ont été réalisés dans le sang maternel périphérique et dans le sang du cordon à la naissance. Pendant le suivi chez les enfants, un total de 445 mesures a été obtenu de 3 à 12 mois, réparties comme

suit : 109/165 à 3 mois, 113/165 à 6 mois, 114/165 à 9 mois et 109/165 à 12 mois ; soit un total de 775 dosages de HLA-G soluble plasmatique pour toute l'étude. Dans la majorité des cas, un prélèvement a été manqué parce que la mère n'a pas conduit son enfant au centre de santé pour le prélèvement trimestriel. Seulement 6,1% des enfants n'ont été présents qu'à une seule visite (n=10) et donc 93,9% ont eu au moins deux visites sur les 4 prévues après la visite à la naissance.

2.2.2 Caractéristiques descriptives de la population

L'âge moyen des femmes de l'étude était de 26,7 ans (IC95% = 25,6 - 27,5), la plus jeune était âgée de 16 ans et la plus âgée avait 49 ans. La majorité était des multigestes (81,2%) et 40% avaient une anémie à l'accouchement.

Chez les enfants, le poids moyen de naissance était de 2964,07 grammes (IC95% = 2895,2 - 3032,9) et 10,9% (n=18/165) des enfants avaient un faible poids à la naissance. Il y avait 88 enfants de sexe féminin (53,3%) et seize bébés prématurés. Durant tout le suivi, la moitié des enfants soit 50,9% (84/165) ont développé au moins une infection palustre et 10% des enfants en ont eu plus de deux. L'enfant le plus infecté a eu au total sept accès palustres pendant le suivi. Les caractéristiques de la population sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques de la population d'étude à Tori-Bossito

Population	Variables	Caractéristiques
Mères (165)	Âge (années)	Moyenne : 26,7 écart-type = 6,3
	Gestité	Primigestes : 18,8% (31) Mutligestes : 81,2% (134)
	Infection placentaire	Oui : 30,9% (51) Non : 69,1% (114)
	sHLA-G maternel	déTECTABLE : 78,2% (129) non détectable : 21,8% (36)
	Ethnies	Tori : 59,4% (98) Fon : 9,1% (15) Autres : 31,5% (52)
Enfants (165)	Poids de naissance (g)	Moyenne : 2964,1 (+/448,3)
	Faible poids de naissance	Oui : 10,9% (18) Non : 89,1% (147)
	Sexe	Filles : 53,3% (88) Garçons : 46,7% (77)
	sHLA-G cordon	déTECTABLE : 60,4% (99) non détectable : 39,6% (65)

2.2.3 Description des niveaux de HLA-G soluble

2.2.3.1 Chez les mères

A l'accouchement, 78,2% des femmes avaient un niveau de HLA-G détectable (n=129/165) et le niveau moyen dans le sang périphérique maternel était de 19,1 ng/ml (IC95% = 15,2 – 23,1). La distribution de HLA-G soluble chez les mères à l'accouchement est illustrée dans la Figure 17.

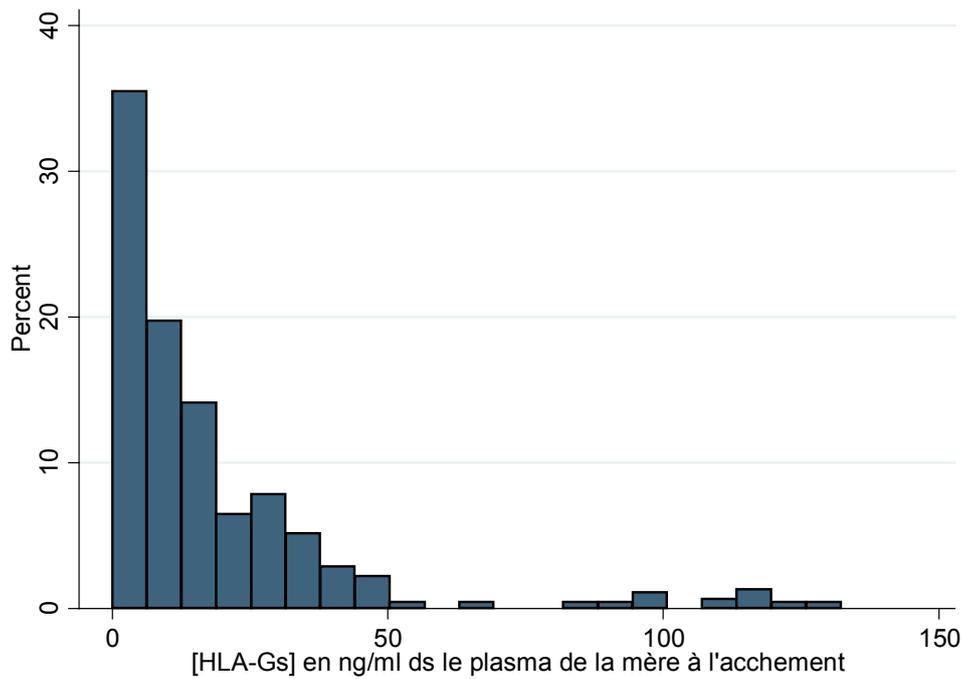


Figure 17 : Distribution des concentrations brutes de HLA-G maternel à l'accouchement

2.2.3.2 Chez les enfants

Dans le sang du cordon, le niveau de HLA-G soluble était détectable chez 99 enfants (60%) et le niveau moyen à la naissance était de 16,2 ng/ml (IC95% = 12,1 – 20,3). La distribution à la naissance est très semblable à la distribution maternelle à l'accouchement (Figure 18).

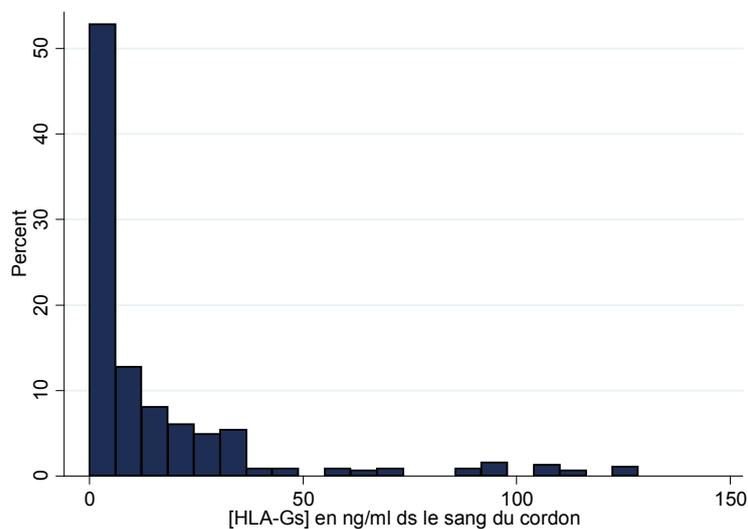


Figure 18 : Distribution des concentrations brutes de HLA-G dans le sang du cordon à la naissance

Au cours des premières analyses réalisées sur cet échantillon, il a été montré qu'il existait une forte corrélation entre les niveaux de HLA-G maternel dans le sang périphérique à l'accouchement et les niveaux de HLA-G soluble dans le sang du cordon à la naissance (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014).

La Figure 19 représente l'évolution individuelle du niveau de HLA-G soluble chez tous les enfants de 3 à 12 mois.

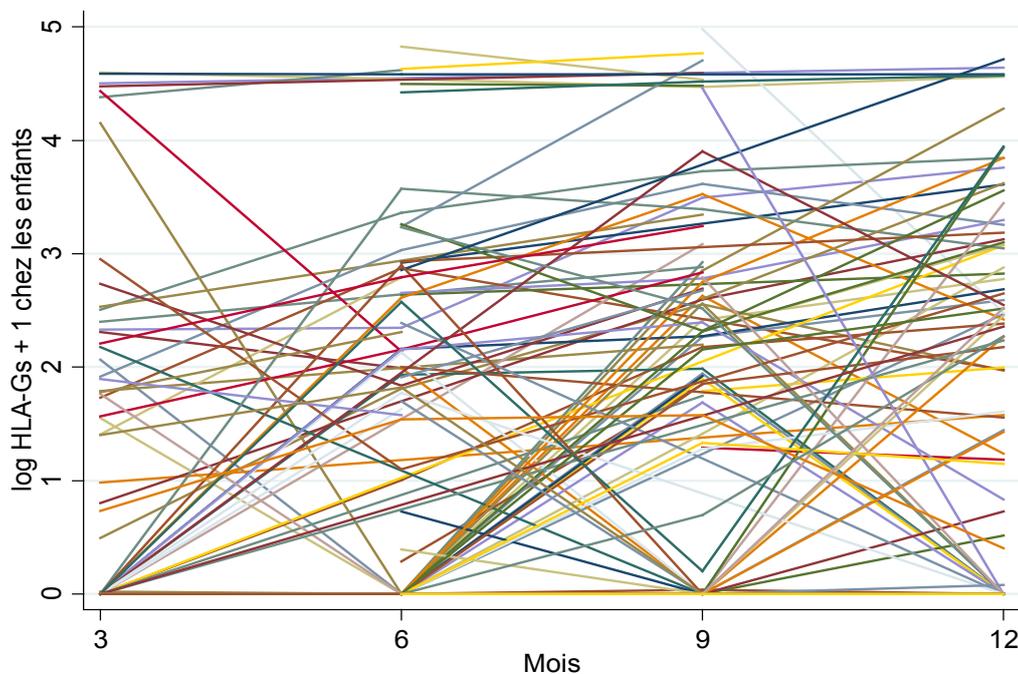


Figure 19 : Évolution du niveau de HLA-G chez tous les enfants de 3 à 12 mois.

L'allure de cette évolution semble variable d'un individu à un autre et il est très difficile d'imaginer à première vue une tendance globale ou des groupes particuliers, même s'il semble que certains enfants restent à des niveaux élevés. L'évolution du niveau moyen par trimestre entre 3 et 12 mois est présentée sur la Figure 20 :

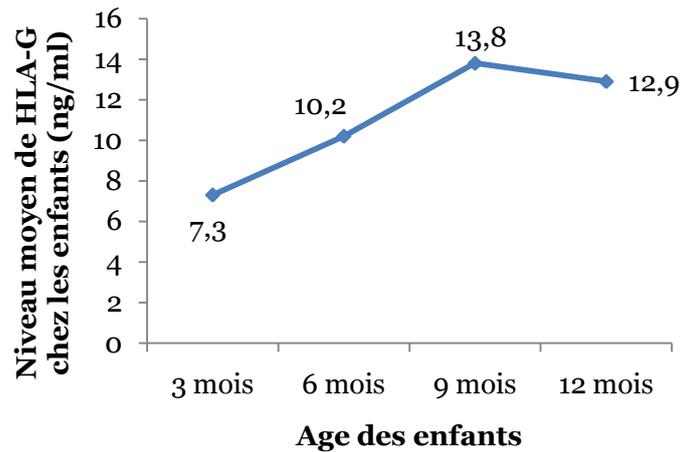


Figure 20 : Évolution du niveau moyen de HLA-G soluble de 3 à 12 mois chez les enfants

Le niveau moyen augmente donc régulièrement entre 3 et 9 mois avant de décroître sur le dernier trimestre étudié ($p < 10^{-3}$), même si cette évolution moyenne ne semble pas très informative sur l'évolution individuelle présentée sur la Figure 19. Il apparaît donc raisonnable de s'interroger sur l'existence de différentes trajectoires pour cette évolution.

2.2.4 Détermination du nombre de trajectoires de HLA-G soluble chez les enfants

Pendant la mise en œuvre de la première étape de notre stratégie d'analyse, nous avons testé des modèles avec deux, trois, quatre et cinq trajectoires. Le Tableau 4 présente les différents critères obtenus pour ces trois modèles.

Tableau 4 : Distribution des nouveau-nés et du critère BIC en fonction du nombre de trajectoires

Nombre de trajectoires	BIC	Pourcentage des groupes					Trajectoire basse
		Trajectoire haute	Trajectoire(s) intermédiaire(s)				
2	1494,6	27,2%	-	-	-	-	72,8%
3	1464,3	16,9%	29,3%	-	-	-	53,8%
4	1438,9	7,7%	21,9%	19,9%	-	-	50,5%
5	1423,1	7,5%	20,5%	18,6%	8,1%	-	45,4%
6	1422,2	6,2%	7,5%	14,9%	19,1%	7,6%	44,7%

Le modèle avec deux trajectoires (Figure 21) comprend un groupe d'enfants avec des niveaux de HLA-G soluble élevés de 3 à 12 mois et un second groupe avec des niveaux de HLA-G soluble bas. Dans le premier groupe constitué de 27,2% de l'échantillon, le niveau de HLA-G soluble est élevé dès 3 mois et reste élevé pendant tout le suivi (trajectoire haute), alors que dans le second groupe comprenant 72,8%, le niveau est toujours bas de 3 à 12 mois (trajectoire basse).

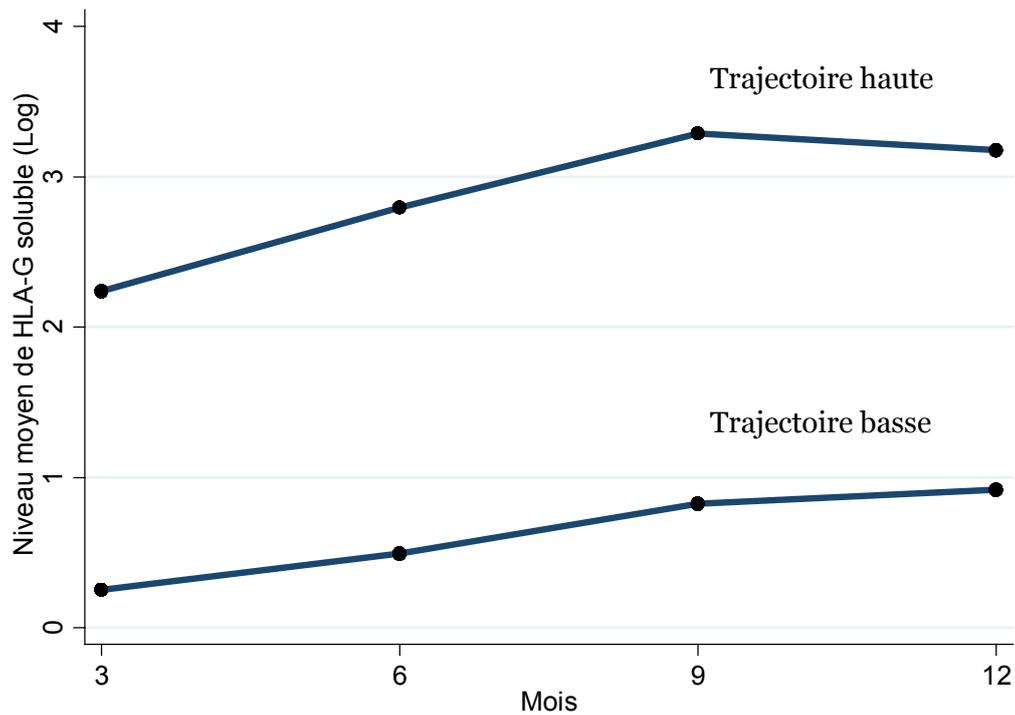


Figure 21 : Modèle à deux classes latentes

Le modèle avec trois trajectoires (Figure 22) comprend deux groupes semblables au modèle à 2 trajectoires : un groupe avec des niveaux de HLA-G soluble toujours bas comprenant 53,8% d'enfants (trajectoire basse), un groupe de 16,9% d'enfants ayant des niveaux toujours élevés (trajectoire haute). En plus de ces deux groupes, il existe un troisième groupe intermédiaire constitué de 29,3% d'enfants. Le niveau moyen de HLA-G soluble dans ce groupe avec une trajectoire intermédiaire, est bas au début du suivi, mais plus élevé que la trajectoire basse, puis augmente progressivement à partir de 3 mois jusqu'à 12 mois.

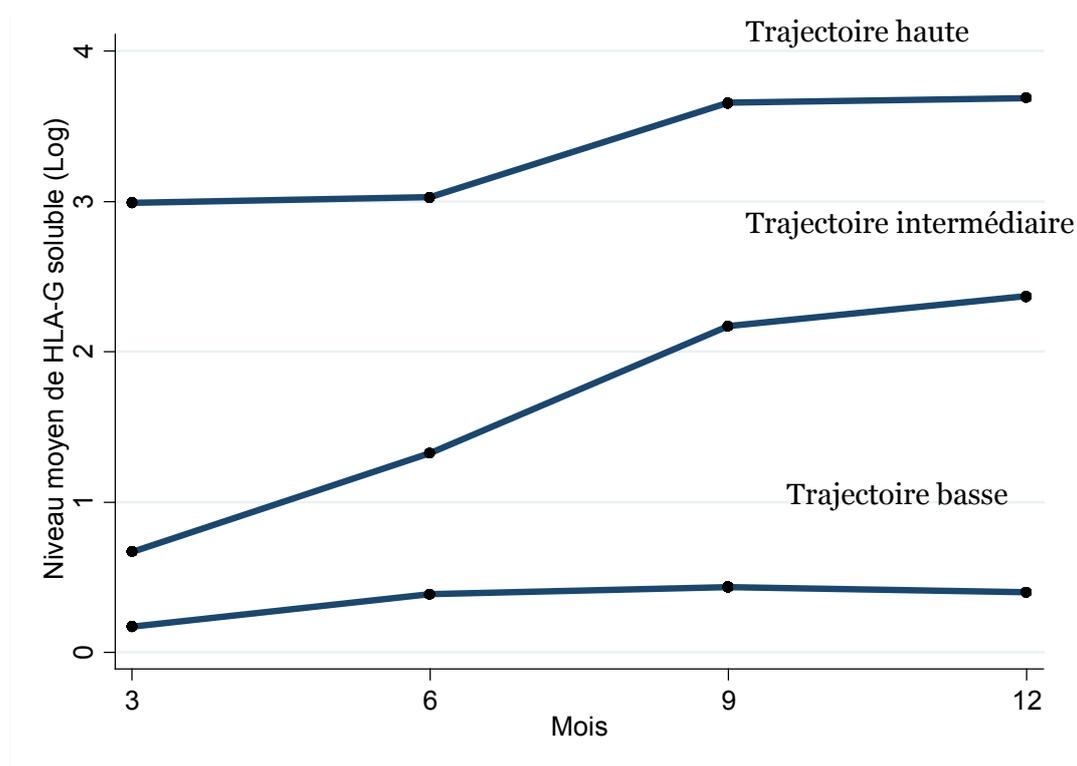


Figure 22 : Modèle à trois classes latentes

Lorsqu'une quatrième trajectoire est rajoutée, on observe l'apparition d'une nouvelle trajectoire intermédiaire en plus de trois trajectoires aux caractéristiques similaires à celles du modèle à trois trajectoires (Figure 23). On observe ainsi une trajectoire haute avec 13,9% d'enfants, une trajectoire basse avec 50,5% d'enfants et deux trajectoires intermédiaires avec des niveaux bas au début puis augmentant par la suite. La différence entre les deux trajectoires est que l'une d'elle reste très basse jusqu'à 6 mois, se confondant pratiquement à la trajectoire basse : c'est la trajectoire intermédiaire basse. La deuxième trajectoire intermédiaire comporte des niveaux un peu plus élevés au début qui augmentent progressivement déjà à 3 mois (trajectoire intermédiaire haute). Ces deux groupes intermédiaires comportent 21,9% et 19,9% d'enfants.

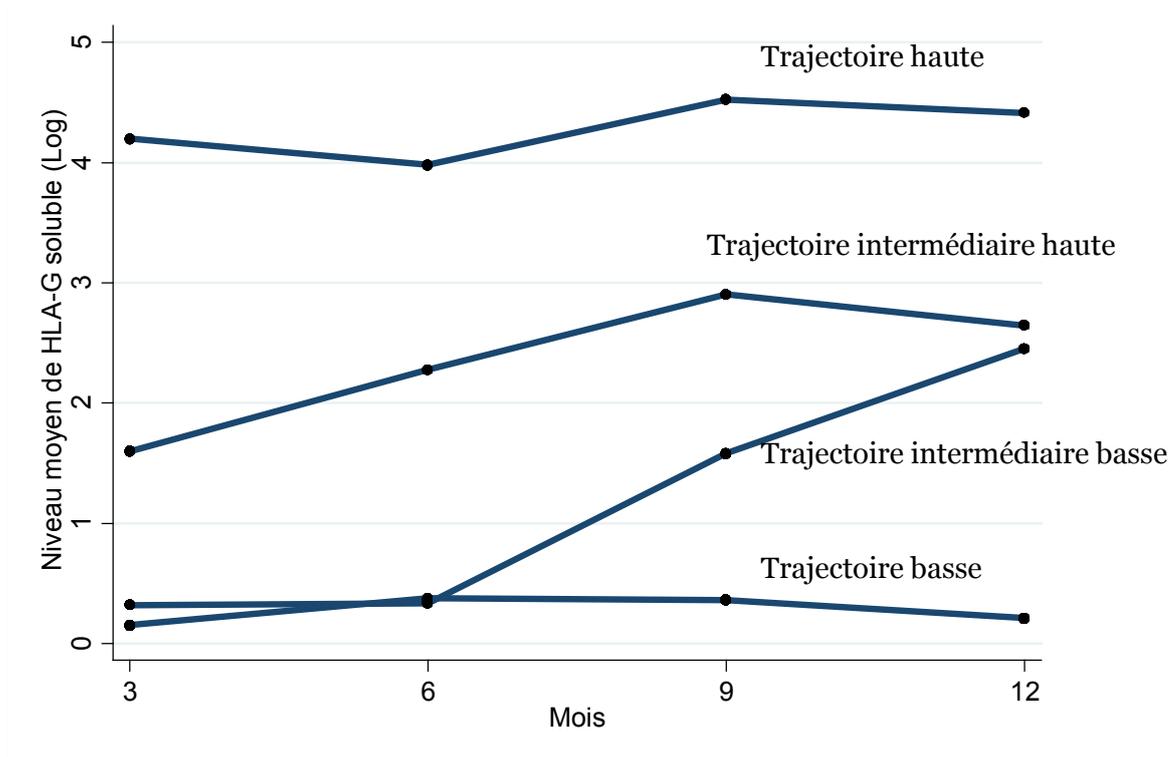


Figure 23 : Modèle à quatre classes latentes

Lorsque nous poursuivons notre analyse avec un modèle à 5 trajectoires ou plus, nous assistons à l'apparition de nouvelles trajectoires intermédiaires : la trajectoire haute et la trajectoire basse restent un peu plus stables en effectifs alors que les trajectoires intermédiaires s'effritent, mais ces nouvelles trajectoires ne nous apportent pas d'informations supplémentaires. Le critère BIC varie également très peu après 4 trajectoires. Nous avons donc décidé de poursuivre l'analyse avec les 3 premiers modèles.

En considérant ces modèles avec 2, 3 et 4 trajectoires, nous remarquons comme l'indique le Tableau 4, que la valeur du BIC diminue lorsque l'on augmente le nombre de trajectoires. En se basant uniquement sur le critère BIC, le modèle à 4 trajectoires semble le meilleur. Par ailleurs, en observant les modèles à 3 et 4 trajectoires, nous remarquons une tendance commune : en dehors des effectifs qui diffèrent, les

trajectoires haute et basse sont conservées. Quant aux trajectoires intermédiaires, elles sont toutes basses au début puis hautes vers la fin du suivi. Elles apportent les mêmes informations en termes de comportement par rapport à HLA-G. Nous décidons de poursuivre nos analyses avec ces deux modèles à 3 puis 4 trajectoires de HLA-G.

2.2.5 Effets des variables sur les trajectoires

L'effet des différentes variables sur l'évolution du niveau de HLA-G soluble a été étudié dans les deux modèles retenus précédemment, par une analyse univariée et une analyse multivariée

2.2.5.1 Modèle à 3 classes

Dans ce modèle, l'analyse univariée montre que l'infection placentaire ($p=0,59$), la gestité ($p=0,31$), le genre de l'enfant ($p=0,95$), la prématurité ($p=0,43$), l'anémie maternelle ($p=0,51$) ainsi que la densité parasitaire ($p=0,52$) n'avaient pas un effet significatif sur l'évolution de HLA-G. Par contre, le faible poids de naissance semble significativement associé à cette évolution : les enfants ayant un faible poids à la naissance ont un niveau de HLA-G soluble significativement plus élevé que les enfants nés avec un poids normal pendant tout le suivi de 3 à 12 mois ($p<10^{-3}$). De la même manière, la présence de HLA-G soluble dans le sang du cordon à la naissance, ou dans le sang circulant de la mère à l'accouchement est significativement associée à des niveaux élevés de HLA-G de 3 à 12 mois, dans tous les groupes ($p<10^{-3}$ dans les deux cas). Un nombre d'infections palustres >1 ou un niveau d'exposition élevé pendant le suivi est également associé à de hauts niveaux de HLA-G soluble ($p=0,008$

et $p=0,01$ respectivement). Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Facteurs associés à l'évolution de HLA-G chez les enfants de 3 à 12 mois : analyse univariée du modèle à 3 classes

Covariables		N (effectif)	Estimation non ajustée	P	IC95%
Genre	Masculin	77	0	0,95	-0,26 ; 0,24
	Féminin	88	-0,008		
Prématurité	Non	124	0	0,43	-0,44 ; 0,19
	Oui	16	-0,12		
FPN	Non	147	0	<10⁻³	0,28 ; 0,96
	Oui	18	0,62		
Infections palustres pendant le suivi	≤1	116	0	0,008	0,08 ; 0,53
	>1	49	0,30		
Niveau d'exposition	Très bas	29	0	0,015	0,06 ; 0,60
	Bas	38	0,33		
	Haut et très haut	84	0,32		
HLA-G cordon	Absence	66	0	<10⁻³	0,36 ; 0,84
	Présence	99	0,60		
Infection placentaire	Non	114	0	0,59	-,034 ; 0,19
	Oui	51	-0,07		
Gestité	Multigestes	134	0	0,31	-0,20 ; 0,64
	Primigestes	31	0,22		
Anémie maternelle	Non	88	0	0,51	-0,35 ; 0,17
	Oui	64	-0,09		
HLA-G maternel	Absence	36	0	0,008	0,10 ; 0,69
	Présence	129	0,40		

Au cours de l'analyse multivariée, la variable « infection placentaire » est forcée dans le modèle. Le Tableau 6 présente les résultats de l'analyse multivariée. Le faible poids de naissance ($p<10^{-3}$), la présence de HLA-G soluble dans le sang du cordon ($p=0,003$) ou dans le sang de la mère à l'accouchement ($p=0,001$) restent

significativement associés à des niveaux de HLA-G soluble élevés de 3 à 12 mois. Chez les enfants présentant un risque d'infection élevé ou ayant eu plus d'une infection au cours de la première année, les niveaux de HLA-G soluble sont significativement plus hauts ($p=0,001$ et $p=0,002$ respectivement). Dans ce modèle multivarié à 3 groupes, les proportions des trajectoires sont 50,9%, 27,2% et 21,9% respectivement pour les trajectoires basse, intermédiaire et haute. L'effet de toutes les variables présentes dans le modèle est identique dans toutes les trajectoires. Ainsi, un enfant naissant avec un faible poids de naissance a par exemple un niveau moyen de HLA-G soluble plus élevé qu'un autre enfant de poids normal et ceci est valable qu'il soit dans l'une ou l'autre des trois trajectoires.

Tableau 6 : Facteurs associés à l'évolution de HLA-G chez les enfants de 3 à 12 mois : analyse multivariée du modèle à 3 classes

Covariables		Estimation ajustée	IC95%	P
Intercept		0,58	0,28 - 0,88	<10 ⁻³
FPN	Non	0		
	Oui	0,86	0,42 - 1,29	<10 ⁻³
Infections palustres pendant le suivi	≤1	0		
	>1	0,33	0,11 ; 0,54	0,002
Niveau d'exposition	Très bas	0		
	Bas	0,43	0,19 ; 0,68	
	Haut et très haut	0,35	0,13 ; 0,56	0,001
HLA-G cordon	Absence	0		
	Présence	0,42	0,15 ; 0,70	0,003*
Infection placentaire	Non	0		
	Oui	-0,12	-0,35 ; 0,11	0,326
HLA-G maternel	Absence	0		
	Présence	0,39	0,14 ; 0,62	0,001*

* Les variables « HLA- maternel » et « HLA-G cordon » ne sont pas introduites ensemble dans le modèle parce qu'elles sont très corrélées. Le modèle final contient donc uniquement la variable « HLA-G cordon », mais les résultats sont identiques lorsqu'elle est remplacée par la variable « HLA-G maternel ».

2.2.5.2 Modèles à 4 classes

En utilisant le modèle à 4 groupes, les résultats sont presque similaires en termes de variables significatives avec en plus un effet de l'infection placentaire (Tableau 7). Néanmoins, l'introduction de la variable « faible poids de naissance » dans le modèle entraîne une augmentation de la proportion de la trajectoire haute de 8% à 17%, pendant que la trajectoire intermédiaire haute diminue de 22% à 15%. Cette modification importante de l'effectif des groupes témoigne de la faible stabilité du modèle à 4 trajectoires. A la fin de cette deuxième étape, malgré le critère BIC qui semble en faveur du modèle à 4 groupes, le modèle à 3 groupes plus stable au cours des analyses semble être le plus adapté à notre échantillon.

Tableau 7 : Facteurs associés à l'évolution de HLA-G chez les enfants de 3 à 12 mois : analyse multivariée du modèle à 4 classes

Covariables		Estimation ajustée	P	IC95%
Intercept		0,79	<10 ⁻³	0,51 ; 1,08
FPN	Non	0		
	Oui	0,46	0,004	0,15 ; 0,78
Infections palustres pendant le suivi	≤1	0		
	>1	0,17	0,08	-0,02 ; 0,37
Risque infectieux	Très bas	0		
	Bas	0,36		0,13 ; 0,58
	Haut et très haut	0,25	0,005	0,06 ; 0,45
HLA-G cordon	Absence	0		
	Présence	0,39	<10 ⁻³	0,19 ; 0,60
Infection placentaire	Non	0		
	Oui	-0,24	0,03	-0,46 ; -0,03

2.2.6 Prédiction d'appartenance

Dans cette partie, nous avons testé les variables pouvant permettre d'identifier dès la naissance ou l'accouchement la trajectoire d'appartenance d'un enfant. En introduisant donc les variables maternelles telles l'infection placentaire, la gestité, l'anémie maternelle et la présence de HLA-G dans le sang du cordon dans le modèle à trois classes, seule la présence de HLA-G dans le sang du cordon reste significative et associée à une forte probabilité d'appartenir à la trajectoire haute (OR=22,8) ou à la trajectoire intermédiaire (OR=6,1) comparativement à la trajectoire basse (OR=1). Ainsi, un enfant ayant un niveau de HLA-G détectable dans le sang du cordon à la naissance aurait une probabilité de 76,25% ; 20,40% et 3,35% d'appartenir à la trajectoire haute, intermédiaire ou basse respectivement.

La même analyse a été effectuée avec le modèle à 4 classes, mais ne converge pas. Ce dernier résultat confirme le manque de stabilité du modèle à 4 classes et constitue un argument décisif dans le choix du modèle à 3 groupes. Ce modèle permet de classer 97% des enfants de trajectoire basse, 91,7% des enfants de trajectoire intermédiaire et 83% des enfants de trajectoire haute dans leur groupe respectif avec des probabilités a posteriori $\geq 70\%$.

Le Tableau 8 présente les caractéristiques des enfants appartenant aux trois trajectoires ainsi que les caractéristiques maternelles. Il semble y avoir plus d'enfants de faible poids de naissance dans la trajectoire haute que dans les autres. Les enfants de ce groupe naissent tous de mères ayant un niveau de HLA-G élevé et la plupart ont un niveau détectable dans le cordon.

Tableau 8 : Distribution des 165 enfants de l'échantillon en fonction des différentes trajectoires

Nouveau-nés (165)				
Covariables		Trajectoire haute	Trajectoire intermédiaire	Trajectoire basse
		(n=28/165)	(n=46/165)	(n=91/165)
Niveau de HLA-G soluble	3 mois	3.29	0.58	0.14
	6 mois	3.21	1.35	0.31
	9 mois	3.78	2.32	0.33
	12 mois	3.88	2.47	0.30
Genre	Féminin	17 (60.7%)	24 (52.2%)	47 (51.6%)
	Masculin	11 (39.3%)	22 (47.8%)	44 (48.4%)
Poids de naissance (écart-type)		2894.5 (±369.3)	3076.6 (±500.1)	2928.6 (±437.1)
FPN		17.82% (n=5)	13.0% (n=6)	7.7% (n=7)
Prématurité		10.7% (n=3)	6.5% (n=3)	13.2% (n=12)
Présence de HLA-G dans le cordon		96.4% (n=27)	73.9% (n=34)	41.7% (n=38)
Infections palustres pendant le suivi (écart-type)		1.1 (±1.3)	0.9 (±1.5)	1.1(±1.4)
Mères (165)				
Âge (années)		26.5 (±6.1)	28.2 (±6.1)	25.8 (±6.5)
Primigestes		25.0% (7)	13.0% (6)	19.8% (18)
Infection placentaire		21.41% (6)	26.1% (12)	36.3% (33)
Détection de HLA-G dans le sang maternel		100.0% (28)	93.5% (43)	63.7% (58)

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article publié dans Malaria Journal et présenté ci après.

RESEARCH

Open Access



Evolution of the levels of human leukocyte antigen G (HLA-G) in Beninese infant during the first year of life in a malaria endemic area: using latent class analysis

Tania C. d'Almeida^{1,2*}, Ibrahim Sadissou^{2,3,4,5}, Gilles Cottrell^{2,3}, Rachida Tahar^{2,3}, Philippe Moreau⁶, Benoît Favier⁶, Kabirou Moutairou⁵, Eduardo A. Donadi⁷, Achille Massougbodji^{4,5}, Nathalie Rouass-Freiss⁶, David Courtin^{2,3} and André Garcia^{2,3}

Abstract

Background: HLA-G, a non-classical HLA class I antigen, is of crucial interest during pregnancy by inhibiting maternal immune response. Its role during infections is discussed, and it has been described that high levels of soluble HLA-G during childhood increase the risk of malaria. To explore more precisely interactions between soluble HLA-G and malaria, latent class analysis was used to test whether distinct sub-populations of children, each with distinctive soluble HLA-G evolutions may suggest the existence of groups presenting variable malaria susceptibility.

Method: A study was conducted in Benin from 2010 to 2013 and 165 children were followed from birth to 12 months. Evolution of soluble HLA-G was studied by the latent class method.

Results: Three groups of children were identified: one with consistently low levels of soluble HLA-G during follow-up, a second with very high levels and a last intermediate group. In all groups, low birth weight, high number of malaria infections and high exposure to malaria transmission were associated with high level of soluble HLA-G. Placental malaria was not. Presence of soluble HLA-G in cord blood increased the probability of belonging to the highest trajectory.

Conclusion: These results, together with previous ones, confirm the important role of HLA-G in the individual susceptibility to malaria. Assaying soluble HLA-G at birth could be a good indicator of newborns more fragile and at risk of infections during childhood.

Keywords: sHLA-G, Evolution, Groups, Infancy, Malaria, Benin

Background

Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) is a non-classical HLA class Ib antigen, with important immune-regulatory functions [1], that differs from classical HLA class I antigens by a low amount of polymorphism and a tissue restricted expression [2, 3]. The physiological HLA-G expression is restricted to fetal tissues such

as invasive cytotrophoblast and amnion, and in adults, to immune-privileged organs, cornea, thymus, pancreatic islets, endothelial cell precursors, and erythroblasts. Dendritic cells and macrophages can also express HLA-G [4]. Seven alternative proteins can be generated, four membrane-bound and three secreted isoforms [3–5]. HLA-G is primarily expressed during pregnancy and plays an important role in maternal tolerance of the fetus. Trophoblast cells are protected by HLA-G which inhibit the cytolytic activity of NK cells and protect the semiallogenic fetus from maternal rejections responses [4, 6, 7].

*Correspondence: carennedalmeida@gmail.com

²UMR216 MERIT "Mère et enfant face aux infections tropicales", Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



Apart from pregnancy, HLA-G has been shown to be expressed in many types of tumours [8–11]. Tumour cells express HLA-G to escape to immunity and high levels of soluble HLA-G (sHLA-G) have been related with unfavourable outcome of prognosis [12, 13]. In transplantation, HLA-G molecule has been shown to be important for a better allograft acceptance, whereas low serum levels seem to increase the risk of autoimmunity [13, 14] and allergy [15]. If the role of HLA-G with viral infections is admitted [15–18], this association with parasite infections is much less documented [19, 20]. Recently, it was reported that genetic polymorphisms in *HLA-G* 3'UTR were associated with susceptibility to human African trypanosomiasis and could influence the clinical and immunological responses directed to *Plasmodium falciparum* [21–23].

A recent work reported that high levels of sHLA-G were significantly associated with a higher incidence ratio of malaria in Beninese children [24] consistent with the fact that the inhibition of immune responses by HLA-G expression could lead to a greater susceptibility to malaria. In this previous analysis, hierarchical mixed models have been used to deal with the repeated measures design. However, mixed models make the assumption that individuals are randomly drawn from a homogeneous population. As a complement it seemed interesting to test whether distinct subpopulations of children are present in the overall population, each with its own parameters, with distinctive sHLA-G evolutions, or trajectories. The identification of trajectories of sHLA-G through the first year of life and risk factors that predispose to, or modify, a particular trajectory may suggest the existence of individual with variable malaria susceptibility. Latent class analysis (LCA) approach is ideally suited to explore this issue [25, 26].

Thus, the main objective of the present work was to explore the existence and characteristics of groups of children with different patterns of soluble HLA-G evolution between birth and 12 months of life in a cohort of Beninese children exposed to malaria, using latent class analysis.

Methods

Study design

The work is part of a research programme conducted in southern Benin. The protocol has been widely described elsewhere [24, 27] and will be presented below briefly.

Site description

The study included nine villages and three health centres: Tori Avamè, Tori Cada and Tori Gare, providing primary healthcare, and holding a maternity for antenatal care and childbirth. The study site was located in a malaria

endemic area with an incidence rate of 16.9 % in 2013 [28]. Malaria is transmitted mainly by *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus* [29]. *P. falciparum* is the most prevalent parasite and infectious peaks occur during the rainy season [28].

Study population

More than 600 pregnant women were included at delivery from June 2007 to July 2008; they did reside in the villages of the study and give birth in one of the three health centres. Twins, stillbirths and HIV-positive women were excluded. Newborns included were followed-up from birth to 12 months. Among them, 165 mother/infant pairs were selected based on the “placental infection” status of the mother at delivery. Placental infection was defined by the presence of asexual forms of *P. falciparum* in placental blood smears. Population was composed by the totality of mother/infant pairs with placental infection ($n = 51$) and 114 randomly selected newborns whose mothers were not infected.

Data collection

Maternal characteristics and data on the course of the current pregnancy were documented through a questionnaire. At delivery, peripheral blood was sampled for soluble HLA-G and haemoglobin measurements. Thick and thin placental smears were performed to determine the existence of a placental *P. falciparum* infection. Cord blood was collected for soluble HLA-G measurements.

At birth, gestational age was estimated using Ballard method [30] and newborn were weighed. Monthly, thick blood smear (TBS) was systematically made (in absence of fever or other clinical sign) to detect asymptomatic malaria infection. Weekly, axillary temperature was measured by trained community health worker. In case of temperature higher than 37.5 °C, the child was lead to the health centre. A questionnaire was filled out and a TBS and a rapid diagnosis test (RDT) were made. Symptomatic malaria cases were defined as fever (>37.5 °C) with RDT and/or TBS positive. TBS obtained monthly or during consultations were stained with Giemsa. Leucocytes and parasites were counted simultaneously until leucocyte or parasite numbers reached 500. A TBS was declared negative if no parasite was found after counting 500 leucocytes. TBSs were read by two laboratory technicians with less than 1 % disagreement. Malaria cases were treated with an artemisinin-based combination therapy (ACT), as recommended in Benin [31, 32]. In case of fever or any clinical sign, mothers were invited to bring their children to health centre where the same protocol was applied. At birth (in cord blood) and at 3, 6, 9 and 12 months old, venous blood was sampled to quantify the level of sHLA-G. Finally, a time-dependent

environmental risk of exposure to malaria was assessed for each child by means of a statistical predictive model [33].

Variable of interest: soluble HLA-G

Assays of sHLA-G have been made by ELISA method. Quantification of sHLA-G correspond to the soluble isoform HLA-G5 and HLA-G1 (after cleavage from the membrane-bound form). Techniques used for these manipulations are extensively described in another study [24]. Soluble HLA-G levels were used as a quantitative variable (after logarithmic transformation) and as a dichotomic one (presence *vs* absence).

Covariates

From mothers, the following variables were used: Age; parity (primipare *vs.* multipare); placental malaria; anaemia (Hb level before delivery <11 g/dl) and sHLA-G in peripheral blood. From children: low birth weight (LBW) (<2500 g); preterm birth (gestational age <37 weeks of gestation); gender; number of malaria attacks during the follow-up (used as a quantitative variable, or binary variable with two groups: 0 or 1 *vs.* more than 1); environmental risk of malaria (quantitative time-dependent variable, used as quartiles); sHLA-G level in cord blood and parasite density (PD defined as the number of *P. falciparum* per 100 leucocytes).

Statistical analysis

Latent class analysis was used to identify the sHLA-G level trajectories and assess their association with the covariates.

A general model's formulation is:

$$y_{it} = \beta_0^j + \beta_1^j \text{Age}_{it} + \beta_2^j \text{Age}_{it}^2 + \beta_3^j \text{Age}_{it}^3 + \alpha_1^j X_{1t} + \dots + \alpha_p^j X_{pt} + \varepsilon_{it}$$

where y_{it} is the response variable (sHLA-G level of the i th children at age t), the β^j are the coefficients associated to the children's age in the j th group and the α^j are the coefficients associated to covariates in the j th group (the index t specifies that the covariates can depend on time as the environmental risk of malaria) and ε_{it} the residual variation [$\varepsilon_{it} \sim N(0, \sigma^2)$].

The posterior probability $\pi_j(z_i)$ that a child i with the covariates vector z_i belongs to the group j is: $\pi_j(z_i) = \frac{\exp(z_i \theta_j)}{\sum_j \exp(z_i \theta_j)}$ with covariates vector z_i and its corresponding coefficients vector θ_j .

The analysis was performed using three steps.

Firstly, each sHLA-G trajectory has been modelled, by means of a polynomial function of time of degree 3, without introducing any covariate. The most appropriate number of trajectories was selected using the Bayesian

information criterion (BIC). The group prevalence, that should not be less than 5 % of the total number of the sample, was used as additional criteria, for practical interpretation [34].

Secondly, the effect of the covariates on each trajectory was studied using univariate and multivariate analysis. Only covariates associated with $p < 0.20$ during univariate analysis were entered in the multivariate step. Statistical significance in the final model was set at $p < 0.05$. The effect of covariates on HLA-G trajectories can be identical for each trajectory or different according to them. During this step a particular attention was paid to the stability of the trajectories determined during the first step. Indeed, as mentioned by Nagin [35] the addition of significant covariates to the model should not widely modify the percentage of subjects in each trajectory.

In the final multivariate model each individual was assigned to the trajectory group for which he had the highest posterior probability. Within each group, posterior probability values greater than or equal to 0.7 indicate adequate internal reliability [36]. All these criteria allowed us to make a definitive choice of the appropriate number of classes.

Finally, in the third step, the predictor effect of some covariates to belong to one or more trajectory has been tested. This concerned placental malaria, parity, maternal anaemia, LBW and sHLA-G in cord blood.

All analyses were performed with the Stata[®] Software, Version 12 (StatCorp LP, College Station, TX, USA), using the syntax dedicated to generalized linear latent and mixed models (GLLAMM).

Ethics

The study's protocol was approved by the Ethics Committee of the "Faculté des Sciences de la Santé (FSS)" of Cotonou and the "Institut de Recherche pour le Développement (IRD)" Consultative Ethics Committee. All mothers and fathers were informed during antenatal care visits and meetings conducted in villages before the beginning of the study. Mothers signed informed consent written in French and explained in local language.

Results

At delivery sHLA-G was measured for all mothers and all cord blood samples ($n = 165$). During the follow-up, a total of 445 measurements were performed from 3 to 12 months distributed as follows: 109/165 at 3 months, 113 at 6 months, 114 at 9 months and 109 at 12 months. Overall, a total of 775 measurements (mother, cord, 3, 6, 9 and 12 months) were performed. In most cases, an HLA-G measurement was missing because the mother had not attended a quarterly visit. Only 10 children (6.1 %) were present for a single visit.

Characteristics of the study population

The mean age of the mothers was 26.75 years (SD = 6.37, range 16–49). Most women were multi-gravidae (81.2 %, n = 134), and 40 % were suffering from anaemia at delivery.

The mean birth weight of newborns was 2,964 grammes (SD = 448.31) and 10.9 % (n = 18/165) of children had a LBW. Eighty-eight children (53.33 %) were female and eighteen children were premature. During the follow-up, 50.9 % (n = 84/165) of children had at least one malaria infection, and 10 % more than two. The most infected child had seven infections.

Soluble HLA-G at delivery

At delivery, 78.2 % of women had detectable levels of sHLA-G (n = 129/165). The mean level in the peripheral blood for all women was 19.12 ng/ml (SD = 25.60, range 0–132.22). Sixty percent of children (n = 99/165) had detectable sHLA-G in cord blood and the mean level was 16.22 ng/ml (SD = 26.83, range 0–128.52). A strong correlation has been described previously between the mother/newborn (cord blood) sHLA-G levels, with a significantly higher level in mother's blood at delivery [24]. The sHLA-G level increased gradually before stabilizing after 9 months (Fig. 1).

Trajectory groups of HLA-G

During the first step of analysis, groups of children following the same pattern of sHLA-G have been identified. Using the BIC as criteria, the two-group model showed a higher BIC than both three- and four-group models. The four-group model was selected when compared to the three groups (Table 1). In the three-group model, 16.9 % of the children have high levels of sHLA-G and 53.8 % remained at low levels whereas the third trajectory

(29.3 %) was characterized by low levels tending to rise after 6 months. When a fourth trajectory was added, a new intermediate one appeared starting with very low levels until 6 month of age and rapidly rising (Fig. 2; Table 1). From three-group model the following pattern was constantly identified: one trajectory with low levels of sHLA-G (the higher percentage), one with high levels (the lower percentage) and an intermediate one. Adding a new trajectory led to the same trend with the emergence of new intermediate group, representing low percentages of the population. To pursue analysis, the three- and the four-trajectory models only were used (Table 1).

Effect of covariates on the trajectories

Using the three-group model, placental malaria (p = 0.59), parity (p = 0.31), gender (p = 0.95), prematurity (p = 0.43), maternal anaemia (p = 0.51) and parasite density (p = 0.52) have no significant effect on the dynamics of sHLA-G. In contrast, LBW appeared to be significantly associated with higher levels of sHLA-G (p < 10⁻³). Similarly, detectable sHLA-G level in cord blood, or in mother's peripheral blood at delivery, was associated with higher levels of sHLA-G from 3 to 12 months of life (p < 10⁻³ in the both case). Having more than one malaria attack during the follow-up was significantly associated with higher levels of sHLA-G (p = 0.008). In the same way, the higher levels of malaria exposure were significantly related to the high levels of sHLA-G (p = 0.01).

During multivariate analysis "placental malaria" was forced in the model. The results are presented in Table 2. LBW, presence of sHLA-G in cord blood or in maternal blood at delivery were significantly associated with higher levels of sHLA-G (p < 10⁻³). High exposure to malaria and having more than one malaria infection during the follow-up were significantly associated with high levels of sHLA-G (p = 0.001 and p = 0.002, respectively). In the final model, the proportions of the groups were 50.9, 27.2 and 21.9 %, respectively for the low, intermediate and high trajectories (Table 1). All these covariates have similar effects within each trajectory. As an example, children born with a LBW have significantly higher sHLA-G levels during their first year of live whatever the group they belong (Fig. 3).

Using the four-trajectory model, the same pattern of results was obtained. However, the introduction of LBW resulted in an increase of the proportion of children belonging to the high trajectory from 8 to 17 %, while the intermediate-high trajectory decreased from 22 to 15 %, consistent with a low stability of the four-trajectory model (Table 1).

In the third step of analysis, the role of placental malaria, parity, maternal anaemia, presence of sHLA-G

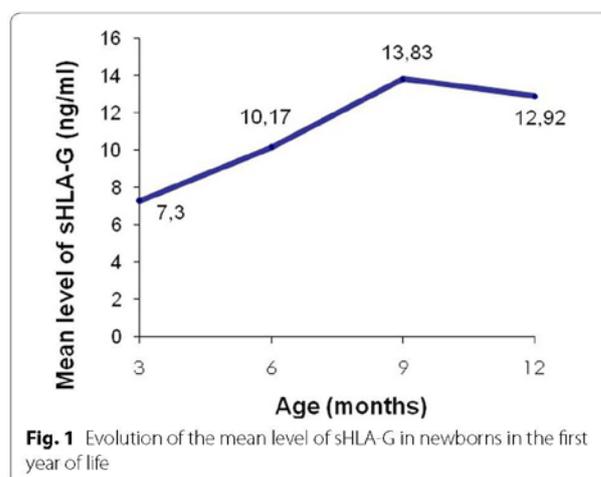


Table 1 Distribution of newborns in the two-, three- and four-group models

Trajectories	Model	BIC ^a	Distribution of newborns in groups			
			High (%)	Intermediates... (%)	Low (%)	
2	Empty ^b	1494,644	27.2	72.78		
	Full ^c		24.2	75.8		
3	Empty	1464,333	16.9	29.3	53.8	
	Full		21.9	27.2	50.9	
4	Empty	1438,894	7.7	21.9	19.9	50.5
	Full		13.9	15.7	23.1	47.3

^a A lower BIC indicates a better fitting

^b With no covariate

^c With all significant covariates in multivariate analysis

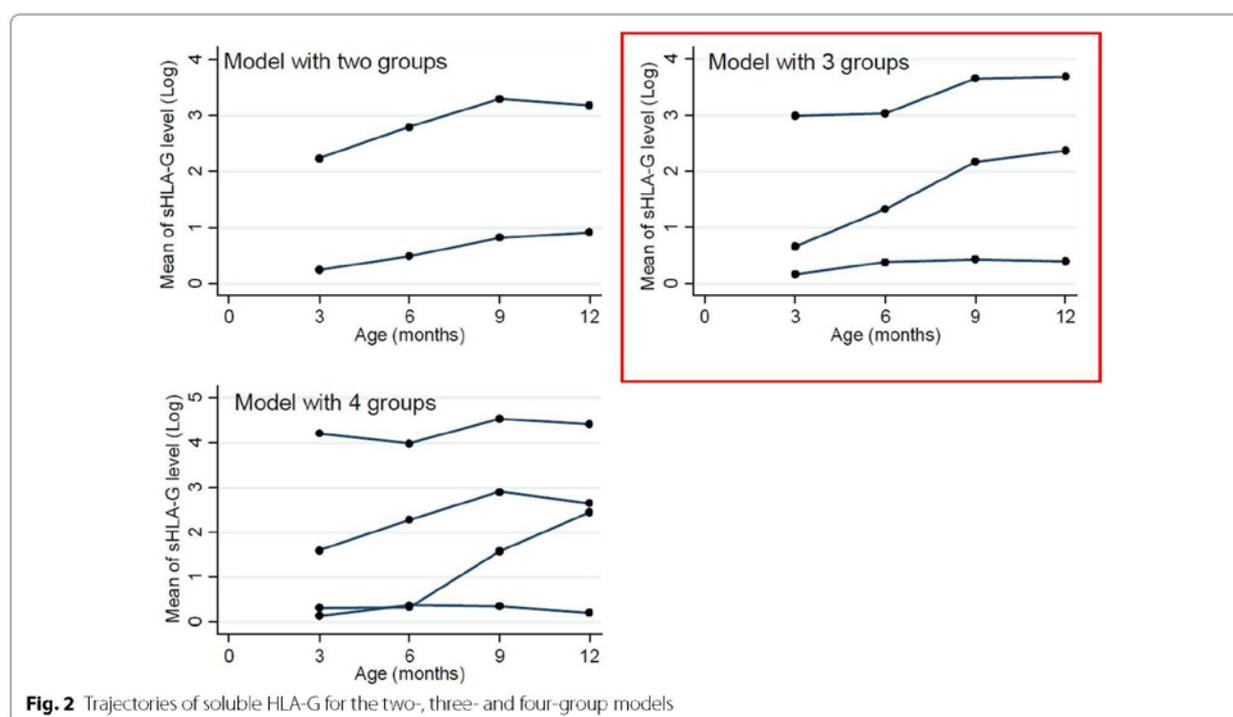


Fig. 2 Trajectories of soluble HLA-G for the two-, three- and four-group models

in cord blood and LBW as predictor to belong to either group, were examined. Among them, for the three-group model only the presence of sHLA-G in cord blood was associated with a significantly higher probability to belong to the high or intermediate trajectory (OR = 22.8 and OR = 6.1, respectively). Accordingly, a child born with sHLA-G in cord blood would have a probability of 76.25, 20.40 and 3.35 % to belong to the high, intermediate or the low trajectory, respectively.

When the same analysis was performed using the four-group model, convergence was not achieved, reinforcing the instability of this model. Taken together, the results

are consistent with the existence of three-trajectory model. With this model 97 % of children from the low trajectory, 91.7 and 83 % of children from respectively the intermediate and high trajectories were classified as belonging to these groups with a posterior probability greater than 70 %.

Table 3 shows the characteristics of the children and of their mothers in the three groups. LBW children seemed to be more present in the “high trajectory” than in others. Children in this group were born to mothers with detectable sHLA-G at delivery, and the majority had sHLA-G in cord blood.

Table 2 Risk factors of soluble HLA-G evolution from 3 to 12 months in 165 newborns at Tori Bossito, 2007–2010: latent class analysis

Covariates	Univariate estimation ^a	Adjusted estimation ^b	95 % CI	p value
Intercept	–	0.58	0.28–0.88	<10 ⁻³ *
HLA-G in cord blood				
No	–	–		
Yes	0.60	0.42	0.15–0.70	0.002 ^{c*}
Low birthweight (<2500 g)				
No	–	–		
Yes	0.62	0.86	0.42–1.29	<10 ⁻³ *
Malaria infections				
≤1	–	–		
>1	0.20	0.33	0.11–0.54	0.003*
Malaria exposure (quartiles)				
Low	–	–		
Middle	0.33	0.43	0.19–0.68	0.001*
High and very high	0.32	0.35	0.13–0.56	0.002*
Placental malaria				
No	–	–		
Yes	-0.07	-0.12	-0.35–0.11	0.36

^a Univariate estimation represents the coefficient of the univariate regression

^b Adjusted estimation is obtained after the multivariate analysis

^c Results were the same, when “HLA-G in cord blood” was replaced by “HLA-G in maternal peripheral blood”. Presence of sHLA-G in maternal blood is highly significantly related to high level of HLA-G in newborns during the first 12 months. We did not introduce together the two covariates in the model because they are highly correlated [24]

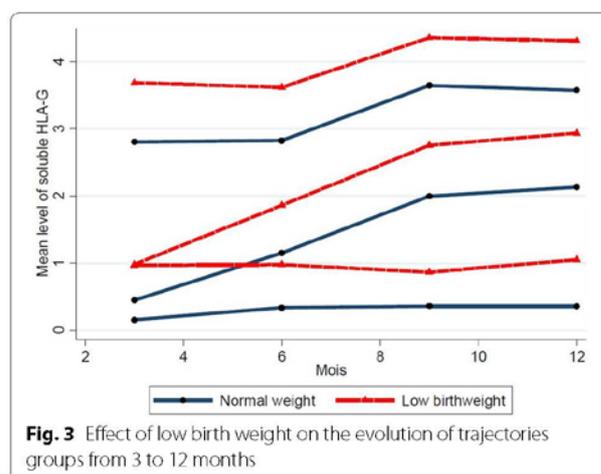


Fig. 3 Effect of low birth weight on the evolution of trajectories groups from 3 to 12 months

Discussion

The present work is complementary to study of Sadissou et al., describing the evolution of sHLA-G in a population of African infants [24]. In the first study, a strong correlation has been shown between mother and cord blood levels of sHLA-G at delivery, as well as an association between LBW and high level of sHLA-G during the first year of life. In addition, high levels of sHLA-G

were associated with an increase of the incidence ratio of malaria during the follow-up, but the total number of malaria infections during the follow-up was not associated with the level of sHLA-G.

The present analysis, confirms these results, and provides new understanding by identifying new determinants of sHLA-G evolution. Indeed, although in the first study, the level of sHLA-G increased the risk of infection in the following quarter, any association has not been highlighted between the level of sHLA-G and the overall number of malaria infections during the follow-up. In this complementary analysis, this association is strongly significant. The difference between these two results could be due to the complexity of the effect of malaria infection that cannot be pointed out under the hypothesis that all children belong to the same homogeneous population. Using latent class approach allows hypothesizing that distinct subpopulations of children are presents in the overall population, each with its own characteristics, with distinctive sHLA-G evolutions. This approach permitted us to explore more precisely the complex association between malaria and HLA-G.

The mechanisms by which *HLA-G* gene expression is regulated are only partially understood [37]. Concerning infections, HIV or hepatitis, infected patients have higher level of sHLA-G, and it has been suggested that

Table 3 Distribution of 165 mother/child pairs in the different groups, 2007–2010

Covariates	High trajectory (n = 28/165)	Intermediate trajectory (n = 46/165)	Low trajectory (n = 91/165)
<i>Newborns (165)</i>			
Level of sHLA-G			
3 months	3.29	0.58	0.14
6 months	3.21	1.35	0.31
9 months	3.78	2.32	0.33
12 months	3.88	2.47	0.30
Gender			
Female	17 (60.71 %)	24 (52.17 %)	47 (51.65 %)
Male	11 (39.28 %)	22 (47.83 %)	44 (48.35 %)
Birth weight			
	2894.52 (SD = 369.30)	3076.63 (SD = 500.10)	2928.57 (SD = 437.05)
Low birth weight	17.86 % (n = 5)	13.04 % (n = 6)	7.69 % (n = 7)
Preterm	10.71 % (n = 3)	6.52 % (n = 3)	13.19 % (n = 12)
Detectable sHLA-G in cord blood	96.43 % (n = 27)	73.91 % (n = 34)	41.76 % (n = 38)
Number of malaria infections during the follow-up	1.11 (SD = 1.31)	0.96 (SD = 1.46)	1.13 (SD = 1.41)
<i>Mothers (165)</i>			
Age (years)	26.54 (SD = 6.08)	28.15 (SD = 6.06)	25.78 (SD = 6.48)
Parity	25.00 % (7)	13.04 % (6)	19.78 % (18)
Placental malaria	21.43 % (6)	26.09 % (12)	36.26 % (33)
Detectable sHLA-G in peripheral maternal blood	100.00 % (28)	93.48 % (43)	63.74 % (58)

these levels induce tolerance and contribute to immune evasion of virus [38–42]. Although, to date, such hypothesis has not been clarified for malaria; it could be hypothesized that the same phenomenon occurs during malaria infection leading to immune evasion. Indeed, *P. falciparum* could upregulate the HLA-G secretion through the stimulation of cytokines such as IL-10 and IFN- γ . HLA-G is known to inhibit the function of T, NK and B cells through direct interaction with ILT2. Recently, Naji et al. showed that HLA-G inhibits B cell proliferation, differentiation, and immunoglobulin (Ig) secretion in both T cell-dependent and -independent models of B cell activation. HLA-G also acts as a negative B cell regulator in modulating B cell antibodies secretion in a xenograft mouse model [43]. Taken together all these arguments are consistent with the existence of a complex interaction between HLA-G, immunity and *P. falciparum* infection, leading to a lower B cell response. As IgG antibodies play a pivotal role in anti-malarial protection [44–46], the inhibition of IgG specifically directed against *P. falciparum* mediated by HLA-G, not only allows the parasite to escape the immune system but also is responsible of the higher susceptibility to infection showed previously.

However, other factors could influence HLA-G secretion during malaria infection. It has been shown that hypoxia could play a role in HLA-G regulation during pregnancy [47], in some cancer [48] but also in more

physiologic but extreme life conditions like altitude [49]. Tissue hypoxia resulting from decreased microcirculatory flow due to parasite sequestration and endothelial dysfunction contributes to the pathogenesis of malaria in children [50, 51]. The results could be consistent with the fact that malaria related hypoxia is already present very early in life and associated with an increase of sHLA-G levels, and consequently strengthening the inhibition of immunity.

More than 60 % of the children born with a LBW belong to the high and intermediate trajectories. It is widely accepted that birth weight is a key indicator of fetal and neonatal health [52–54] and overall 60–80 % of infants who die during the neonatal period are children born with LBW [55]. The association between LBW and HLA-G has already been shown in this same cohort using mixed model [24]. However, the present approach allows pointing out a very interesting aspect, which has not been demonstrated by previous analysis. Indeed, children born with detectable HLA-G in their cord blood have a greater probability to belong to the higher or intermediate trajectories than other children, and hence be concerned by LBW. Considering the frailty of LBW children, the detection of such high-risk individuals could have huge public health consequences. Taking into account the strong correlation between sHLA-G in cord blood and in mother's blood at delivery, the mother's

sHLA-G level could be considered as a potential marker of high-risk newborn. Soluble HLA-G has already been proposed as predictor of in vitro fecundation outcome [56], but also as biomarker of allergy [57], allograft and cancers [58, 59]. A follow-up of pregnant women and of their offspring over 2 years is now ongoing in Benin to test whether the sHLA-G level early in pregnancy is also correlated with HLA-G level in cord blood or with infectious morbidity during the first 2 years of life.

Latent class analysis approach is more and more frequently used in biomedical research [60]. It is an extension of mixed models that assume the presence of several groups of subjects (latent groups) sharing a particular evolution trajectory of some attribute. This approach allows a better understanding of the phenomenon under study and the formulation of new questions or hypotheses [61, 62]. This methodology is part of mixture modelling, a wide data analysis approach allowing studying unobserved heterogeneity in a population [60]. The question of the number of trajectories remains of great importance and to date, there is no single statistical test to determine the correct number of latent classes [63]. The selection of the best model needs to take into account statistical measures of model fitting but also the interpretation of the output, in particular the relevance of the different groups, based on the literature or the expert's knowledge. BIC was used as statistical criteria although others can be proposed. Bootstrap Likelihood Ratio test (BLRT) has been proposed as being more powerful. However, BLRT needs an increased computation time and finally the authors recommended using BIC as the first step [64]. In the data, using BIC would lead to choose a model with four trajectories instead of three. Both model have the same interpretation since the two intermediate trajectories in the four-group model share the same evolution, i.e. high level trajectory, low level trajectory and intermediate group(s) starting with low levels of sHLA-G and then growing up. However, models with more than three trajectories seem to present a lower stability. Finally, to deal with the possibility and complexity of these population mixture models, it could be of interest to pursue this exploration by using different methods in different populations.

A genetic association between *HLA-G* and malaria has already been pointed out. Indeed, it has been shown that some polymorphisms of the *HLA-G* 3'UTR were associated with variable risk of infection [22], but also with antibody responses against *P. falciparum*. These associations have been identified in another population from Senegal. It has also been demonstrated that a strong molecular signature of balancing selection at *HLA-G* 5'URR exist and that this region may certainly be the direct target of selection [65]. These results strengthen

the interest of this gene and of sHLA-G as potentially involved in differential susceptibility to malaria.

Conclusion

Summary, this study allowed a better understanding of the complex interaction between HLA-G and malaria infection and pointed out the potential interest of sHLA-G as marker of frailty.

Abbreviations

HLA-G: human leukocyte antigen-G; sHLA-G: soluble human leukocyte antigen-G; LCA: latent class analysis; TBS: thick blood smear; RDT: rapid diagnosis test; ACT: artemisinin-based combination therapy; LBW: low birth weight; PD: parasite density; BIC: Bayesian information criterion; GLLAMM: generalized linear latent and mixed models; SD: standard deviation; OR: odd ratio; NK: natural killer.

Authors' contributions

All the authors read and approved the final version of the manuscript. NR, BF, DC and AG have designed the study and wrote the protocol. IS has performed the immunoassays of HLA-G in collaboration with DC, BF, NR. TCA carried out the statistical analysis and drafted the manuscript. GC participated in the design of the study and the statistical analysis. AG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. ² UMR216 MERIT "Mère et enfant face aux infections tropicales", Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France. ³ Université Paris Descartes, Paris, France. ⁴ Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Cotonou, Benin. ⁵ Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin. ⁶ UMR Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Université Paris Diderot - Paris 7, IMETI Service de Recherches en Hématologie-Immunologie, Paris, France. ⁷ Division of Clinical Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Acknowledgements

We are grateful to all the women and infants of Tori Bossito who agreed to participate to this project, the midwives, nurses, and health helpers of maternity health centres, the "Faculté des Sciences de la Santé" (FSS), the "Institut des Sciences Biomédicales Appliquées de Cotonou" (ISBA), and the "Programme National de Lutte contre le Paludisme" (PNLP) for their institutional support. We gratefully thank our field and laboratory teams.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was financially and materially supported by the "Agence Nationale de la Recherche" (SEST (Santé Environnement Santé Travail) project 2006/040/001), the "Ministère des Affaires Etrangères" (REFS project 2006-22); the "Institut de Recherche pour le Développement" and the "Fondation pour la Recherche Médicale" (Grant FDM20130727043 to TC A). The funders played no role in the study design, the data collection and analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

Received: 6 June 2015 Accepted: 27 January 2016

Published online: 09 February 2016

References

- Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, Larsen LG, Nielsen MW, Svendsen SG, et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 2011;17:727–38.

2. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today*. 1999;20:60–2.
3. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunol Lett*. 2011;138:22–4.
4. Curigliano G, Criscitiello C, Gelo L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res*. 2013;19:5564–71.
5. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today*. 1999;20:60–2.
6. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:11520–5.
7. Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *Am J Reprod Immunol*. 1998;40:136–44.
8. Cai MB, Han HQ, Bei JX, Liu CC, Lei JJ, Cui Q, et al. Expression of human leukocyte antigen G is associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Biol Sci*. 2012;8:891–900.
9. Jeong S, Park S, Park BW, Park Y, Kwon OJ, Kim HS. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. *PLoS One*. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0098284.
10. Sheu JJC, Shih LM. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*. 2007;17:436–43.
11. Zheng J, Xu C, Chu D, Zhang X, Li J, Ji G, et al. Human leukocyte antigen G is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. *Immunol Lett*. 2014;161:13–9.
12. Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaoult J, Carosella ED. The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*. 2014;2014:359748. doi:10.1155/2014/359748.
13. Loustau M, Wiendl H, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G 2012 conference: the 15-year milestone update. *Tissue Antigens*. 2013;81:127–36.
14. Waschbisch A, Sandbrink R, Hartung HP, Kappos L, Schwab S, Pohl C, et al. Evaluation of soluble HLA-G as a biomarker for multiple sclerosis. *Neurology*. 2011;77:596–8.
15. Ciprandi G, Deamici M. Soluble HLA-G serum levels depend on allergy type and IgE levels. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2014;5:9–11.
16. Amiot L, Vu N, Samson M. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. *J Immunol Res*. 2014;2014:298569. doi:10.1155/2014/298569.
17. Morandi F, Rouas-Freiss N, Pistoia V. The emerging role of soluble HLA-G in the control of chemotaxis. *Cytokine Growth Factor Res*. 2014;25:327–35.
18. LeBouder F, Khoufache K, Menier C, Mandouri Y, Keffous M, Lejal N, et al. Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection. *Hum Immunol*. 2009;70:1016–9.
19. Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C, et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leukocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:236–40.
20. Robert-Gangneux F, Gangneux JP, Vu N, Jaillard S, Guiguen C, Amiot L. High level of soluble HLA-G in amniotic fluid is correlated with congenital transmission of *Toxoplasma gondii*. *Clin Immunol*. 2011;138:129–34.
21. Courtin D, Milet J, Sabbagh A, Massaro JD, Castelli EC, Jamonneau V, et al. HLA-G 3'UTR-2 haplotype is associated with Human African trypanosomiasis susceptibility. *Infect Genet Evol*. 2013;17:1–7.
22. Garcia A, Milet J, Courtin D, Sabbagh A, Massaro JD, Castelli EC, et al. Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: a first insight. *Infect Genet Evol*. 2013;16:263–9.
23. Sabbagh A, Courtin D, Milet J, Massaro JD, Castelli EC, Migot-Nabias F, et al. Association of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms with antibody response against *Plasmodium falciparum* antigens: preliminary results. *Tissue Antigens*. 2013;82:53–8.
24. Sadissou I, d'Almeida T, Cottrell G, Luty A, Krawice-Radanne I, Mas-soudbodji A, et al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. *Malar J*. 2014;13:312. doi:10.1186/1475-2875-13-312.
25. Hagenaaers JA, McCutcheon AL. Applied latent class analysis. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.
26. McCutcheon AL. Latent class analysis. University paper series on Quantitative Applications in the Social Sciences. Series no 07-064. Beverly Hills: Sage Publications; 1987.
27. Le Port A, Cottrell G, Martin-Prevel Y, Migot-Nabias F, Cot M, Garcia A. First malaria infections in a cohort of infants in Benin: biological, environmental and genetic determinants. Description of the study site, population methods and preliminary results. *BMJ Open*. 2012;2:000342. doi:10.1136/bmjopen-2011-000342.
28. Hunt JS, Jadhav L, Chu WJ, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:682–8.
29. Moiroux N, Djenontin A, Bio-Bangana AS, Chandre F, Corbel V, Guis H. Spatio-temporal analysis of abundances of three malaria vector species in southern Benin using zero-truncated models. *Parasit Vectors*. 2014;7:103. doi:10.1186/1756-3305-7-103.
30. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991;119:417–23.
31. Thibodeau V, Lajoie J, Labbe AC, Zannou MD, Fowke KR, Alary M, et al. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PLoS One*. 2011;6:e25185. doi:10.1371/journal.pone.0025185.
32. Plan de suivi-évaluation 2011–2015 du programme national de lutte contre le paludisme. Bénin, Mai 2012.
33. Cottrell G, Kouwaye B, Pierrat C, Le Port A, Bouraima A, Fonton N, et al. Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in Benin and its implications for cohort study. *PLoS One*. 2012;7:e28812.
34. Andruff H, Carraro N, Thompson A, Gaudreau P, Louvet B. Latent class growth modelling: a tutorial. *Tutor Quant Methods Psychol*. 2009;5:11–24.
35. Nagin D. Group-based modeling of development. Cambridge: Harvard University Press; 2005.
36. Andruff H, Carraro N, Thompson A, Gaudreau P, Louvet B. Latent class growth modelling: a tutorial. *Tutor Quant Methods Psychol*. 2009;5:11–24.
37. Moreau P, Flajollet S, Carosella ED. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med*. 2009;13:2973–89.
38. Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C, et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leukocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:236–40.
39. Weng PJ, Fu YM, Ding SX, Xu DP, Lin AF, Yan WH. Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol*. 2011;72:406–11.
40. Murdaca G, Contini P, Setti M, Cagnati P, Lantieri F, Indiveri F, et al. Behavior of non-classical soluble HLA class G antigens in human immunodeficiency virus 1-infected patients before and after HAART: comparison with classical soluble HLA-A, -B, -C antigens and potential role in immunoreconstitution. *Clin Immunol*. 2009;133:238–44.
41. Shi WW, Lin AF, Xu DP, Bao WG, Zhang JG, Chen SY, et al. Plasma soluble human leukocyte antigen-G expression is a potential clinical biomarker in patients with hepatitis B virus infection. *Hum Immunol*. 2011;72:1068–73.
42. Celsi F, Catamo E, Kleiner G, Tricarico PM, Vuch J, Crovella S. HLA-G/C, miRNAs, and their role in HIV infection and replication. *Biomed Res Int*. 2013;2013:693643. doi:10.1155/2013/693643.
43. Naji A, Menier C, Morandi F, Agaogue S, Maki G, Ferretti E, et al. Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. *J Immunol*. 2014;192:1536–46.
44. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961;192:733–7.
45. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Drulhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytotoxicity. *J Exp Med*. 1990;172:1633–41.
46. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45:297–308.
47. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:285–96.

48. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006;441:437–43.
49. Bourguignon M, Yaghi L, Flajollet S, Radanne-Krawice I, Rouas-Freiss N, Lugin D, et al. Increased soluble human leukocyte antigen-G levels in peripheral blood from climbers on Mount Everest. *Hum Immunol*. 2010;71:1105–8.
50. Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellem TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*. 2013;19:156–67.
51. Yeo TW, Lampah DA, Kenangalem E, Tjitra E, Weinberg JB, Granger DL, et al. Decreased endothelial nitric oxide bioavailability, impaired microvascular function, and increased tissue oxygen consumption in children with falciparum malaria. *J Infect Dis*. 2014;210:1627–32.
52. Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 1987;65:663–737.
53. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med*. 1985;312:82–90.
54. Ntuli ST, Malangu N, Alberts M. Causes of deaths in children under-five years old at a tertiary hospital in Limpopo province of South Africa. *Glob J Health Sci*. 2013;5:95–100.
55. Lawn JE, Cousens S, Zupan J, Steering LNS. Neonatal survival 1–4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet*. 2005;365:891–900.
56. Warner CM, Comiskey M, Clisham PR, Brenner CA. Soluble HLA-G (sHLA-G) a predictor of IVF outcome? *J Assist Reprod Gen*. 2004;21:315–6.
57. Ciprandi G, DeAmici M. Soluble HLA-G serum levels depend on allergy type and IgE levels. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2014;5:9–11.
58. Seliger B. The non-classical antigens of HLA-G and HLA-E as diagnostic and prognostic biomarkers and as therapeutic targets in transplantation and tumors. *Clin Transpl*. 2013;465–72.
59. Zeestraten EC, Reimers MS, Saadatmand S, Dekker JW, Liefers GJ, van den Elsen PJ, et al. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *Br J Cancer*. 2014;110:459–68.
60. Proust-Lima C, Sene M, Taylor JM, Jacqmin-Gadda H. Joint latent class models for longitudinal and time-to-event data: a review. *Stat Methods Med Res*. 2014;23:74–90.
61. Nagin DS, Odgers CL. Group-based trajectory modeling in clinical research. *Annu Rev Clin Psychol*. 2010;6:109–38.
62. Nagin DS, Tremblay RE. Developmental trajectory groups: fact or a useful statistical fiction? *Criminology*. 2005;43:873–904.
63. Storr CL, Zhou HL, Liang KY, Anthony JC. Empirically derived latent classes of tobacco dependence syndromes observed in recent-onset tobacco smokers: epidemiological evidence from a national probability sample survey. *Nicotine Tob Res*. 2004;6:533–45.
64. Nylund KL, Asparouhov T, Muthen BO. Deciding on the number of classes in latent class analysis and growth mixture modeling: a Monte Carlo simulation study. *Struct Equ Model*. 2007;14:535–69.
65. Gineau L, Luisi P, Castelli EC, Milet J, Courtin D, Cagnin N, et al. Balancing immunity and tolerance: genetic footprint of natural selection in the transcriptional regulatory region of HLA-G. *Genes Immun*. 2014;16:57–60.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3. L'étude TOLIMMUNPAL

Nous abordons ici la deuxième étude, qui représente la partie la plus importante de nos travaux. Celle-ci a été réalisée dans la commune d'Allada. Ce programme pluridisciplinaire dénommé TOLIMMUNPAL pour Tolérance Immunitaire et Paludisme avait comme objectif général d'étudier les déterminants environnementaux, biologiques et génétiques impliqués dans le développement de la tolérance immunitaire associée au paludisme et plus particulièrement le rôle que HLA-G pouvait jouer dans ce phénomène. L'intérêt de cette étude vient du fait qu'elle intègre le suivi des femmes enceintes pendant la grossesse et que la taille de l'échantillon est plus importante. La commune d'Allada est limitrophe de la commune de Tori-Bossito et présente des caractéristiques semblables. Nous présenterons successivement la méthodologie utilisée puis les résultats de nos analyses.

3.1 Matériel et méthode

3.1.1 Type d'étude

Le programme TOLIMMUPAL a consisté en une étude de cohorte prospective de femmes enceintes et de leurs enfants. Le suivi longitudinal de cette population s'est étendu de janvier 2010 à juillet 2013. Pour chacun des couples mère-enfant inclus dans l'étude, la mère était suivie pendant la grossesse et l'enfant de la naissance jusqu'à ses vingt-quatre mois.

3.1.2 Zone d'étude

Allada est comme Tori-Bossito une commune rurale du sud du Bénin. Elle se situe au nord du département de l'Atlantique à 56 km de Cotonou, dans la dépression de la Lama et est limitée au sud par la commune de Tori-Bossito où s'est déroulée l'étude précédente. La population de la commune d'Allada était constituée de 91 778 habitants en 2002 et de 127 512 habitants en 2013 selon les données des recensements généraux de la population et de l'habitation (RGPH) des années 2002 (RPGH3) et 2013 (RPGH4) (Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin 2004, Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin 2015). La superficie totale de la commune est de 381 km². Elle compte douze arrondissements (Avamè, Azohouè-Aliho, Azohouè-Cada, Tori-Bossito, Tori-Cada et Tori-Gare) et 84 villages et quartiers de ville. L'agriculture constitue la principale ressource dans la localité. La végétation est faite d'une savane arborée et le climat est sub-équatorial. La commune d'Allada est traversée par le lac Ahémé et une rivière (Couffo). Il existe comme à Tori Bossito une région marécageuse (Nangbe 2006) et la pluviométrie moyenne est de 1200 mm par an (Houssou, Hounsou et *al.* 2016).

La région d'Allada est comme celle de Tori-Bossito considérée comme une zone de paludisme méso-endémique avec des caractéristiques identiques en termes de taux d'inoculation entomologique et d'espèces anophéliennes (Damien, Djenontin et *al.* 2010). Dans cette région, l'espèce parasitaire la plus fréquente est également *Plasmodium falciparum*, mais des co-infections peuvent exister avec *P. malariae* et *P. ovale* (Damien, Djenontin et *al.* 2010).

La commune d'Allada a été aussi choisie pour sa proximité avec notre laboratoire à Cotonou. L'étude a été réalisée précisément sur trois sites, les arrondissements de

Sékou, Attoyon et Allada regroupant en tout 33 villages et quartiers de ville. Chacun des centres de santé de ces arrondissements est constitué d'un dispensaire et d'une maternité.

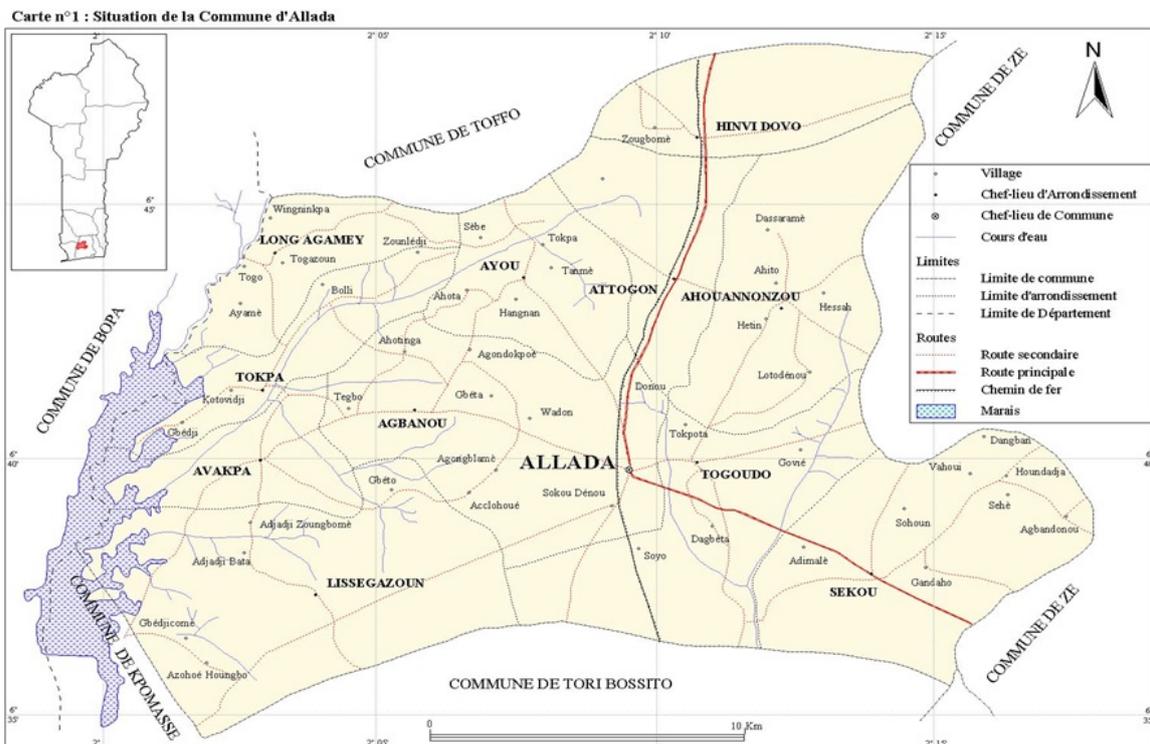


Figure 24 : Cartographie de la commune de Allada (ERAILS 2014)

3.1.3 Population d'étude - Critères d'inclusion

La cohorte Tolimmunpal a été mise en place comme projet ancillaire de l'essai clinique MIPPAD (Malaria in Pregnancy Preventive Alternative Drug). Cet essai a été financé par le programme EDCTP (European and Developing Countries Clinical Trials Partnerships) de l'Union Européenne et a été réalisé dans cinq pays africains (le Gabon, le Kenya, la Tanzanie, le Mozambique et le Bénin). L'objectif de l'essai était de comparer la méfloquine (MQ) à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en termes d'efficacité en tant que traitement préventif intermittent du paludisme chez la femme enceinte au cours de la grossesse (Gonzalez, Mombo-Ngoma et *al.* 2014). Au total,

4 716 femmes enceintes ont été randomisées en trois groupes : un groupe recevant de la sulfadoxine-pyriméthamine et les deux autres de la méfloquine sous deux schémas différents. Parmi ces femmes, 1 183 ont été sélectionnées au Bénin. Les informations relatives à cet essai thérapeutique sont disponibles sur le site www.clinicaltrials.gov (numéro d'enregistrement NCT00811421).

Au sein de l'échantillon béninois de cet essai, les 400 premières femmes enceintes ayant accouché ont été incluses dans la cohorte Tolimmupal de janvier 2010 à juin 2011, de même que leurs nouveau-nés suivis jusqu'à l'âge de 24 mois (juillet 2013). Toutes les femmes se rendant dans l'une des trois maternités pour la première consultation prénatale étaient invitées à participer à l'étude. Avant le démarrage de l'étude, des séances de sensibilisation et d'explications ont été tenues avec les responsables sanitaires locaux et les représentants de la population (chefs de village et de quartiers) dans les 33 villages et quartiers de ville de la zone d'étude.

Pour être incluse, chaque femme enceinte devait remplir les critères suivants :

- avoir une résidence permanente sur le site d'étude (commune d'Allada),
- être enceinte de 28 semaines d'aménorrhée au maximum,
- être suivie durant sa grossesse dans l'un des centres de l'étude,
- avoir un test sérologique négatif pour l'infection au VIH au moment de l'inclusion,
- ne pas avoir d'allergie connue à la méfloquine,
- ne pas présenter de maladies évolutives ou des antécédents de pathologies rénale, hépatique, psychiatrique, ou neurologique sévères,

- ne pas avoir reçu de traitement à base de méfloquine ou d'halofantrine au cours des quatre semaines précédant l'inclusion,
- ne pas avoir pris un traitement avec les molécules suivantes : SP (dans le cadre d'un TPI par exemple), fer, acide folique, vitamine B12 et antihelminthique depuis le début de la grossesse,
- donner son consentement éclairé. Pour ce faire, le protocole de l'étude a été expliqué aux femmes enceintes par une sage-femme, au cours de la première consultation prénatale. Au moment de l'inclusion, lorsqu'une femme accepte de participer à l'étude, un document écrit (en français et traduit en dialecte local « fon ou aïzo »), expliquant une nouvelle fois le protocole de l'étude et mentionnant le consentement écrit de la mère était signé. Une copie de ce document était remise à la participante. Pour les participantes mineures, en plus du consentement éclairé l'accord des parents ou du représentant local devait être obtenu.

Une fois incluse dans l'étude à l'accouchement, la mère recevait une carte immatriculée d'un identifiant personnel et unique, permettant l'accès gratuit du nouveau-né aux centres de santé pendant toute la durée du suivi. Une fois l'inclusion faite, la femme recevait lors de cette consultation prénatale (CPN) 1,500/75 mg de SP ou 15 mg/kg de MQ en fonction du groupe, selon le protocole de l'essai clinique (Gonzalez, Mombo-Ngoma et *al.* 2014). La deuxième dose était administrée au moins un mois après la première. Une moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action était remise à chaque participante et remplacée dès qu'elle n'était plus fonctionnelle. Le protocole local de prévention de l'anémie gestationnelle recommandé par le ministère de la santé du Bénin a été appliqué : chaque femme enceinte devait recevoir au cours de chaque consultation

prénatale 1) un déparasitage systématique avec 500 mg de mébendazole en prise unique ou 600 mg d'albendazole (anti-helminthique) à répartir en deux prises quotidiennes pendant trois jours successifs, 2) 200 mg/jour de sulfate de fer et 3) 5 mg/jour d'acide folique. Les femmes anémiées à l'inclusion (taux d'hémoglobine Hb < 11 g/dL) recevaient un traitement fait de 2 doses quotidiennes de 200 mg de sulfate de fer en cas d'anémie modérée (comprise entre 7 et 11 g/dL) ou étaient transférées dans un hôpital de référence en cas d'anémie sévère (Hb < 7 g/dL). Les femmes donnant naissance à des bébés mort-nés ou des enfants malformés, les naissances multiples et les grossesses compliquées étaient exclues de l'étude.

3.1.4 Suivi et collecte de données maternelles

Les mères ont été suivies depuis leur première CPN jusqu'à l'accouchement avec trois visites particulièrement importantes. La première visite était représentée par la visite à l'inclusion, où la femme recevait la première dose du traitement préventif intermittent du paludisme (nous appellerons cette visite TPI₁). Au cours de cette première visite, les informations socio-démographiques (âge, statut matrimonial, lieu de résidence, niveau de scolarisation, appartenance ethnique), socio-économiques (profession, possession de latrines, de véhicule à deux roues, de poste téléviseur ou de réfrigérateur) ont été recueillies et les antécédents gynécologiques et obstétricaux (gestité, date du dernier accouchement) renseignés. Un examen clinique est réalisé et les données suivantes sont recueillies. Il s'agissait (1) des mesures anthropométriques : le poids (grâce à un appareil de pesée électronique Seca® corp. Hanover, MD ; précision 100 grammes), la taille (avec une toise Seca® 206 Bodymeter, Seca® corp.) et le périmètre brachial ; (2) l'âge gestationnel, estimé grâce à la mesure de la hauteur utérine. Au cours du suivi des femmes, deux autres visites

importantes ont été réalisées la première correspondant à la deuxième prise du TPI souvent un mois après la première (nous l'appellerons visite TPI2) et l'accouchement. Au cours de ces deux visites, l'examen clinique renseigne les mêmes données que pendant la visite TPI1. Tous les paramètres sont mesurés par deux infirmières, et la mesure utilisée était la moyenne obtenue.

A la fin de chaque visite, un prélèvement veineux était effectué chez la femme enceinte pour le dosage de micronutriments (ferritine plasmatique, folates et vitamine B12), de l'hémoglobine (Hemo-control photometer EKF Diagnosis, Germany), de la protéine C-réactive. Une électrophorèse de l'hémoglobine et un dosage de HLA-G plasmatique étaient également réalisés ainsi que la recherche d'une infection palustre. En cas d'infection palustre clinique simple (symptomatique) durant le suivi, la femme est traitée par voie orale avec de la quinine au premier trimestre et de l'arthéméther-luméfantrine par la suite. Lorsqu'il s'agissait d'une infection palustre sévère, un traitement parentéral à base de quinine était administré. Un prélèvement de selles a également été réalisé à la recherche d'helminthes (méthode Kato Katz). A l'accouchement, une apposition et une biopsie placentaire étaient réalisées pour rechercher une infection palustre placentaire.

En dehors des visites prévues par le programme, les femmes étaient sensibilisées à se rendre en consultation dans les trois centres de santé où elles bénéficiaient d'un examen en cas de problème de santé quel qu'il soit. Une goutte épaisse et un dosage de l'hémoglobine étaient effectués en cas de fièvre (température axillaire > 37,5°). L'ensemble des soins étaient pris en charge par le programme.

3.1.5 Suivi et collecte de données chez les enfants

Les nouveau-nés sont suivis dès leur naissance jusqu'à 24 mois. La surveillance au cours des 12 premiers mois, imposée par le programme MIPPAD était différente de celle de la seconde année de vie.

Au cours des douze premiers mois de vie, des visites systématiques sont prévues pour chaque nouveau-né inclus à la naissance, 6, 9 et 12 mois.

A la naissance, les mesures anthropométriques étaient relevées par la sage-femme : la pesée avec un pèse-bébé mécanique SECA® de type 745 de précision de 10 grammes ; la taille avec une toise en bois de fabrication locale, d'une précision d'un millimètre. Le genre du nouveau-né, la mesure du périmètre brachial, la température axillaire étaient également renseignés. Un prélèvement sanguin ombilical (sang de cordon) était réalisé afin de doser l'hémoglobine fœtale, les micronutriments (ferritine plasmatique, folates et vitamine B12), la protéine C-réactive, et de rechercher la présence de parasites (*Plasmodium*) chez le nouveau-né.

Cet examen et ces mesures étaient répétés au cours des visites de 6, 9 et 12 mois. La croissance de chaque enfant a été évaluée à travers la mesure mensuelle du poids et de la taille. A partir de 6 mois un prélèvement de sang veineux périphérique était effectué chaque trimestre jusqu'à 12 mois, de même qu'un examen parasitologique des selles. L'interrogatoire recherchait une fièvre survenue au cours des 24 dernières heures, la notion d'une hospitalisation, d'un problème de santé quel qu'il soit ou d'une prise médicamenteuse (notamment anti-palustre) depuis la visite précédente. L'utilisation d'une moustiquaire imprégnée était renseignée à chaque visite. Indépendamment de la surveillance active, lorsque l'enfant présentait une fièvre ou un problème de santé, celui-ci était orienté vers le dispensaire de l'un des 3 centres de

santé du programme où un examen clinique était fait, accompagné d'une goutte épaisse et d'un dosage de l'hémoglobine.

Après 12 mois, le suivi chez les enfants était plus actif et consistait en des visites tous les 15 jours. En plus de ces visites systématiques, à 18 mois et de 24 mois un prélèvement sanguin était effectué. Chaque mois, lors d'une visite sur deux, un examen clinique était réalisé avec une goutte épaisse systématique associée ou non à un test de diagnostic rapide (TDR), ce dernier n'étant fait qu'en cas de fièvre constatée ou rapportée dans les dernières 24 heures. Lors de la seconde visite mensuelle la goutte épaisse systématique n'était pas réalisée et seul un examen clinique et une prise en température étaient faits. En cas de fièvre ou d'histoire de fièvre dans les 24 heures un TDR était fait à la recherche d'un paludisme. Ici également, il était recommandé à la mère de conduire son enfant au centre de santé en cas de fièvre ou de tout problème de santé entre 2 visites.

Le diagnostic d'accès palustre est retenu devant une fièvre ou un épisode fébrile dans les 24 heures associé à une GE positive et/ou un TDR positif. Une fois ce diagnostic établi, l'enfant était traité selon les recommandations du programme national de lutte avec une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine. La goutte épaisse peut cependant se révéler positive en dehors de tout accès de fièvre, dans ce cas, il s'agit d'une infection palustre asymptomatique.

Des mesures entomologiques de captures de moustiques ont été réalisées et des données environnementales collectées afin d'évaluer le risque environnemental d'exposition au paludisme. Ce risque a été calculé sur le même principe que celui de l'étude de Tori Bossito (Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012) à l'aide d'un modèle statistique

permettant d'attribuer à chaque sujet pendant tout son suivi un risque individuel d'exposition aux piqûres d'anophèles variable selon son lieu de vie et sa date de naissance. Un prélèvement veineux réalisé à 6, 9, 12, 15, 18 et 24 mois a permis également la réalisation de dosages immunologiques dont le dosage de HLA-G soluble.

Les données collectées ont été enregistrées en double saisie dans le logiciel Microsoft® Access 2003 après une vérification et une correction des valeurs aberrantes et des incohérences.

3.1.6 Dosage de HLA-G

La mesure de HLA-G a été effectuée trois fois au cours de la grossesse lors des visites TPI1, TPI2 et à l'accouchement. Chez les enfants, les mesures sont réparties sur les 24 mois de suivi. Un premier prélèvement veineux est réalisé juste à la naissance, dans le sang du cordon ombilical. Les autres prélèvements ont été faits ensuite à 6, 9, 12, 18 et 24 mois. Le dosage de HLA-G dans ces différents prélèvements a été effectué, selon une procédure identique à celle pratiquée dans l'étude Tori-Bossito, par la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) à partir d'anticorps anti HLA-G (MEM-G/9et anti β 2-microglobulin). La méthode utilisée permet la détection des formes solubles HLA-G5 et HLA-G1 shedding (provenant du clivage de l'isoforme membranaire HLA-G1) dans le plasma. Le seuil de détection de la protéine était ~1 ng/ml. Chaque échantillon biologique a été traité en double exemplaire. Les niveaux de HLA-G soluble ont été évalués avec une gamme de concentration connue (200 à 12,5 ng/mL). Un contrôle positif a été utilisé : il s'agit du surnageant de culture de cellules de mélanome M8 exprimant HLA-G soluble). Pour la validation d'un dosage, la positivité du contrôle et des points de gamme étaient pris en compte. Lorsque le

coefficient de variation excédait 15%, le dosage était systématiquement repris. Des informations plus précises concernant le dosage de HLA-G figurent en annexe (Annexe 1 et Annexe 2).

3.1.7 Diagnostic du paludisme

La recherche du paludisme dans les prélèvements de sang périphérique a été faite par la méthode de Lambaréné (Swysen, Vekemans et *al.* 2011). Il s'agit d'une goutte épaisse réalisée en étalant un volume sanguin de 10 μ L sur une lame de microscope de 1.8 cm². La lame est ensuite colorée au Giemsa et lue au microscope. La parasitémie correspond au nombre de parasite par champ microscopique, et la taille du champ dépend de la densité parasitaire. Cette méthode aurait une sensibilité légèrement supérieure à celle de la goutte épaisse classique (5 parasites/ μ L).

3.1.8 Définition des variables

La variable d'intérêt est le niveau de HLA-G soluble plasmatique. Elle a été étudiée chez la femme enceinte au cours de la grossesse (TPI1, TPI2, accouchement), et chez les enfants pendant le suivi de la naissance à l'âge de deux ans (naissance, 6, 9, 12, 18 et 24 mois). Cette variable a été utilisée sous la forme de variable quantitative. Nous avons également défini des profils de HLA-G soluble pendant le suivi chez la mère et l'enfant afin de tenter de définir pour chaque individu si son niveau moyen de HLA-G soluble tout au long du suivi était plutôt haut ou plutôt bas. La construction de cette variable « profil » sera détaillée dans la stratégie d'analyse. Les variables explicatives suivantes ont été utilisées.

3.1.9.1 Chez les mères :

- L'âge maternel : cette variable a été utilisée sous la forme d'une variable catégorielle, créée à partir de la variable initiale quantitative : 2 classes ont été constituées en fonction de la distribution de l'âge chez les mères. On distingue donc les femmes ayant au plus 25 ans, et celles ayant plus de 25 ans ;
- Le groupe ethnique : trois groupes ethniques ont été identifiées et codées en trois catégories correspondant respectivement aux ethnies Fon, Aïzo et autres ethnies ;
- La gestité : nous avons distingué deux groupes de femmes : les femmes primigestes ; dans le premier cas la variable était codée 1 et 0 dans le second ;
- L'âge gestationnel en semaines d'aménorrhée, utilisée comme variable quantitative ;
- Le traitement préventif intermittent du paludisme : les femmes pouvaient recevoir le TPI sous 3 modalités : une prise unique de 1500/75 mg de sulfadoxine-pyriméthamine (schéma SP), la méfloquine en une prise unique de 15 mg (schéma MQ full dose ou MQFD) ou 15 mg de méfloquine répartis sur 2 jours successifs (schéma MQ split dose ou MQSD). Ce paramètre a été codé en une variable à trois catégories : SP, MQFD et MQSD,
- L'infection placentaire : le statut infecté ou non infecté du placenta de la mère est déterminé à l'accouchement après la recherche de parasites dans le sang placentaire. Cette variable a été utilisée sous la forme d'une variable dichotomique, codée présence ou absence (1/0) d'infection placentaire ;
- L'infection palustre périphérique au cours de la grossesse : cette variable a été codée de plusieurs manières. A chaque visite (TPI1, TPI2 ou accouchement) l'absence/présence d'une infection est codée 0/1. Le nombre total d'infections

de même que la présence/absence d'une infection (codée 1/0) pendant la grossesse ont été utilisés.

3.1.9.2 Chez les enfants :

- Le faible poids de naissance du nouveau-né (poids de naissance < 2500g) codé présence ou absence d'un FPN (1/0) ;
- La prématurité : un nouveau-né est prématuré lorsqu'il naît avant le terme de 37 semaines d'aménorrhée. Cette variable est codée 0 pour une naissance à terme et égale à 1 en cas de naissance prématurée ;
- Le genre du nouveau-né : avec deux modalités masculin ou féminin ;
- Les infections palustres développées par les enfants : comme chez les mères cette variable a été considérée de plusieurs manières : d'abord en présence/absence d'une infection à une visite donnée (codée 0/1), en nombre d'infections depuis la visite précédente puis en nombre d'infections totales pendant tout le suivi (de la naissance à 24 mois). Ici nous avons pris en compte aussi bien les infections symptomatiques (fébriles) et les infections non symptomatiques (découvertes grâce à une goutte épaisse systématique positive en dehors de toute manifestation clinique). La densité parasitaire palustre, variable quantitative équivalent au nombre de parasites/ μ L en cas d'infection palustre a également été utilisée ;
- L'âge du nouveau-né en mois,
- Le risque environnemental d'infections. Cette variable quantitative permet d'estimer le risque individuel d'exposition à la transmission palustre. Nous l'avons utilisée sous forme la forme de variable continue ou sous la forme

catégorielle en quatre classes créées à partir des quartiles de la distribution (très haut risque, haut risque, bas risque et très bas risque d'exposition).

- La présence ou non d'une inflammation codée 1/0. Cette variable a été définie à partir du dosage de la protéine C-réactive. Lorsqu'elle est supérieure à 0, on considère qu'il y a une inflammation,
- La présence d'une fièvre palustre ou non au moment du prélèvement codée 1/0.

3.1.10 Stratégie d'analyse

Toutes les analyses ont été réalisées avec les versions 12 et 13 du Logiciel Stata®. Après une description de nos échantillons d'étude (mères et enfants) l'analyse a été organisée en quatre grandes étapes.

1) Analyse de l'évolution des niveaux de HLA-G soluble chez les mères au cours de la grossesse. La mesure du niveau de sHLA-G a été effectuée lors de trois visites (TPI1, TPI2 et accouchement). Les mesures TPI1 et TPI2 n'ayant pas été réalisées au même moment au cours de la grossesse nous avons tenu compte pour chaque femme de l'âge gestationnel correspondant à chaque visite. Nous avons pu estimer ainsi le niveau moyen de HLA-G pour chaque mois de grossesse, ce qui a permis d'avoir l'évolution par mois de grossesse. Les niveaux moyens ont été comparés entre eux avec un test de Kruskal-Wallis puis une comparaison deux à deux (test de Student) avec une correction de Bonferroni permettant de tenir compte de la répétition des tests statistiques. Les degrés de corrélation entre les différents passages (TPI1, TPI2 et accouchement) ont été évalués en déterminant le coefficient de Spearman. Les facteurs maternels et certains facteurs du nouveau-né susceptibles d'influencer l'évolution du niveau de HLA-G ont été recherchés. L'étude de ces facteurs associés a

été faite par une analyse transversale à chacune des trois visites et non pas en considérant ces données comme des données longitudinales répétées. Plusieurs raisons expliquent ce choix. D'une part, nous avons considéré que la grossesse est une période particulière pour l'organisme maternel du point de vue des changements physiologiques liés à la présence du fœtus et ces changements sont variables d'une femme à l'autre. Or les visites TPI1 et TPI2 ont été faites à des périodes parfois très différentes (plusieurs semaines de décalage) d'une femme à l'autre. D'autre part, les visites TPI1 et TPI2 se caractérisent par des interventions importantes de l'équipe soignante (prise du traitement préventif intermittent contre le paludisme, prise d'antihelminthiques ...). Enfin, il est évident que l'accouchement représente une période particulière comparable à aucune autre et là aussi nous avons considéré une grande variabilité possible d'une femme à l'autre. Au cours de chacune de ces analyses transversales répétées, nous avons utilisé un modèle de Tobit simple univarié puis multivarié pour nos analyses. Le modèle de Tobit est un modèle de régression linéaire utilisé pour analyser l'association entre une variable dépendante dite censurée et des variables indépendantes. Il s'agit d'un modèle de régression linéaire adapté à une variable dépendante qui n'est observable que sur un intervalle donné. Dans notre cas, le seuil de détection de ~ 1 ng/mL du dosage de HLA-G ne permet pas d'avoir une mesure précise des très faibles valeurs de HLA-G solubles compris entre 0 et 1 ng/mL. Ces faibles niveaux de la protéine sont donc estimés égaux à 0 ng/mL et considérés comme non détectables. En utilisant le modèle de Tobit, on prend en compte le fait que tous les « 0 » ne sont pas de vrais « 0 ». Nos variables d'intérêt principales que sont l'infection placentaire et les autres infections palustres ont été introduites systématiquement dans les modèles multivariés. Les autres variables ne sont prises en compte dans le modèle multivarié que lorsque $p < 0,20$ au cours de l'analyse univariée. Le modèle final est obtenu après une

procédure pas à pas descendante. Le seuil de significativité dans le modèle final est égal à 0,05.

2) Analyse de l'évolution du niveau de HLA-G soluble chez les enfants. Dans ce cas nous avons considéré que les prélèvements étaient réalisés au même âge et dans des conditions relativement similaires chez les enfants. Chaque enfant ayant bénéficié de 6 prélèvements (naissance – sang de cordon-, 6, 9, 12, 18, 24), une analyse longitudinale a été faite avec un modèle mixte de Tobit pour prendre en compte la corrélation au sein des mesures d'un même enfant et en même temps la censure des mesures de HLA-G soluble. Le niveau 1 de ces données hiérarchiques était composé par les mesures de HLA-G soluble chez un même enfant et le niveau 2 correspondait aux groupes formés par les différentes mesures d'un même enfant. Comme précédemment, l'évolution a été décrite puis les niveaux comparés entre les passages. Les facteurs associés au niveau de HLA-G soluble de 0 à 24 mois ont été recherchés à travers une analyse univariée et une analyse multivariée. Certaines variables d'intérêt (infections palustres maternelles placentaire et périphériques, infections de l'enfant) sont forcées dans le modèle même quand elles ne sont pas significatives en analyse univariée, les autres ne sont introduites que lorsque $p < 0,20$.

3) Analyse des « ressemblances » intra individuelles et entre la mère et son enfant des niveaux de sHLA-G. L'existence d'une corrélation a été recherchée entre les niveaux de HLA-G solubles maternelles à chaque passage et les niveaux de HLA-G des enfants à leurs différentes visites. Dans un premier temps, les coefficients de corrélation de Spearman ont été déterminés entre chaque visite de la mère et chaque visite de l'enfant. Nous avons ensuite voulu savoir s'il existait une ressemblance entre les niveaux d'une mère pendant la grossesse et ceux de son enfant pendant tout le suivi. Pour cela nous avons créé de nouvelles variables appelées « profil HLA-G

soluble » selon la méthodologie suivante. Chez les mères, le niveau moyen de HLA-G a été évalué sur toute la grossesse. A partir de ce niveau moyen, nous avons distingué quatre groupes de femmes en fonction des quartiles de la distribution du niveau moyen gestationnel : le groupe « HLA-G très bas » qui correspond aux 25% des femmes ayant les niveaux les plus faibles, le groupe « HLA-G « bas », le groupe « HLA-G hauts », le groupe « HLA-G très hauts » qui regroupe le quart des femmes enceintes ayant les niveaux les plus élevés. Chez les enfants, la même procédure a été adoptée et les mêmes groupes identifiés à partir des quartiles de la distribution, mais le niveau de HLA-G dans le sang du cordon n'a pas été pris en compte dans la création des profils. L'analyse de l'association entre le profil de la mère et celui de son enfant a été effectuée par régression logistique polytonique ordinale qui prend en compte le fait que la variable dépendante est catégorielle et ordinale, allant de 1 pour niveau très bas à 4 pour niveau très élevé. Cette analyse permet d'étudier la probabilité pour un enfant d'avoir un profil de sHLA-G donné en fonction de variables explicatives maternelles (le profil de la mère, l'infection placentaire ...) ou de l'enfant (infections ...)

4) Analyse de l'effet du niveau de HLA-G soluble maternel sur le délai de survenu du premier accès palustre de l'enfant. L'hypothèse que nous souhaitons explorer dans cette analyse est fondamentale dans nos travaux. Il s'agit de savoir si le niveau de HLA-G maternel peut être associé au risque pour un nouveau-né d'être plus sensible au paludisme pendant les premiers mois de vie. Il s'agira également de mettre cette analyse en perspective avec les résultats obtenus dans la littérature sur l'effet de l'infection placentaire sur ce phénotype de sensibilité. Pour cela nous avons testé l'effet du niveau de sHLA-G maternel sur le délai de première infection palustre chez

l'enfant en utilisant un modèle de Cox (Cox 1975). Avant l'utilisation du modèle de Cox, l'hypothèse des risques proportionnels a été vérifiée.

3.1.11 Éthique

Le protocole de l'étude a été approuvé localement par le comité d'éthique de la Faculté des Sciences de la Santé (CE/FSS) de Cotonou au Bénin et par le comité consultatif de déontologie et d'éthique de l'Institut de Recherche pour le développement (CCDE/IRD). Toutes les femmes ayant participé à l'étude ont reçu l'information nécessaire avant la signature de leur consentement. Elles étaient libres de se retirer à tout moment. Les coûts des soins liés à la prise en charge d'un sujet participant à l'étude étaient entièrement couverts par le programme.

3.2 Résultats

3.2.1 Présentation de l'échantillon

L'échantillon d'étude est composé de 400 couples mère-enfant suivis pendant la grossesse et pendant les deux premières années pour les enfants.

Parmi les 400 femmes enceintes incluses en début d'étude, 392 femmes étaient présentes pour la deuxième visite TPI2 (huit absentes) et toutes les femmes incluses ont accouché dans les centres de santé de l'étude. Au total, 98% des femmes étaient présentes aux trois visites prévues dans l'étude (n=392), et seulement 2% ont eu deux visites sur les trois programmées (n=8).

Chez les enfants, après la naissance, cinq visites devaient être faites dans le cadre de l'étude. La majorité des enfants ont réalisé au moins trois visites sur cinq après la

naissance : 155 enfants ont eu six visites au total (38,75%), 86 ont eu cinq visites (21,50%), 75 ont eu quatre visites (18,75%) et 18 enfants ont eu trois visites sur tout le suivi soit un total de 83,5%.

3.2.2 Caractéristiques descriptives de la population

Les femmes de l'étude étaient âgées en moyenne de 25,9 ans (IC95% = 25,4 - 26,5). La femme la plus jeune avait 15 ans et la plus âgée 42 ans. La majorité des femmes était des multigestes (n=337). Les groupes ethniques majoritaires étaient les Aïzo (n=278) et les Fon (n=83). Pendant le suivi, 16% des femmes avaient une infection palustre périphérique au moment de la première visite (TPI1). A la deuxième visite (TPI2) 4,9% étaient infectées sur les 392 femmes présentes et à l'accouchement 15,6% ont eu une infection périphérique. En dehors de deux femmes diagnostiquées deux fois au cours de la grossesse, toutes les femmes malades n'ont eu qu'une seule infection. A l'accouchement, la prévalence de l'infection placentaire était de 10,9%.

Chez les enfants, le poids moyen de naissance était de 3 033,9 grammes (IC95 = 2 992,5 – 3 075,4) et 9,0% (n=36) des enfants avaient un faible poids à la naissance. Il y avait 212 enfants de sexe féminin (53,0%) et 23 bébés prématurés (5,7%). Durant les deux années de suivi, 29% des enfants n'ont pas eu d'infection palustre. Par contre 50% des enfants ont eu au moins deux infections, 25% en ont au moins quatre et 5% ont eu au moins neuf épisodes infectieux (fébrile ou non fébrile). Le nombre maximal d'infection était de 14, atteint par deux enfants. Les caractéristiques de la population sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Caractéristiques de la population d'étude (Tolimmunpal)

Population	Variables	Caractéristiques	
Mères (400)	Âge (années)	Moyenne : 25,9 (écart-type = 5,4)	
	Gestité	Primigestes : 63 (15,75%) Mutligestes : 337 (84,25%)	
	Infection placentaire	Oui : 43 (10,7%) Non : 353 (88,25%) Non renseigné : 2	
	Ethnies	Aizo : 278 (69,5%) Fon : 83 (20,75%) Autres : 39 (9,75%)	
	Statut marital	Marié : 391 (97,8%) Célibataire : 9 (2,2%)	
	Schéma du TPI	SP : 138 (34,5%) MQFD : 142 (35,5%) MQSD : 120 (20,0%)	
	Centre de santé	Sékou : 304 (76,0%) Attogon : 96 (24,0%)	
	Enfants (165)	Poids de naissance (g)	Moyenne : 3033,9 (écart-type = ±420,4)
		Faible poids de naissance	Oui : 36 (9,0%) Non : 364 (91,0%)
		Sexe	Filles : 88 (53,0%) Garçons : 77 (47,0%)

3.2.3 HLA-G soluble au cours de la grossesse

3.2.3.1 Évolution de HLA-G soluble pendant la grossesse

Le dosage de HLA-G a été fait sur 1128 prélèvements plasmatiques soit 94% des 1200 prélèvements attendus : 383 mesures à TPI1, 370 à TPI2 et 375 à l'accouchement. Parmi les 400 femmes, 85% ont été prélevées aux trois visites et 98,2% l'ont été au moins deux fois. Cinq femmes n'ont pas eu de dosage pendant tout le suivi. Le niveau

moyen de HLA-G était respectivement égal à 10,1 ng/mL (écart-type : 13,6) à TPI1 ; 10,6 ng/mL (écart-type : 14,0) à TPI2 et 17,3 ng/mL (écart-type : 34,6) à l'accouchement. A partir de l'âge gestationnel renseigné au moment de chaque consultation, les mesures de HLA-G ont été regroupées par mois de grossesse (Tableau 10) afin d'estimer l'évolution mensuelle du niveau de HLA-G soluble chez la femme enceinte (Figure 25).

Tableau 10 : Niveau de HLA-G à chaque mois de grossesse

Mois de grossesse	Niveau moyen de HLA-G	Écart-type	Effectif
≤ 3 mois	8,9	12,4	26
4 mois	11,7	13,9	65
5 mois	10,9	17,0	177
6 mois	9,5	11,5	254
7 mois	11,4	15,2	131
8 mois	10,0	12,1	115
9 mois	17,4	35,2	360

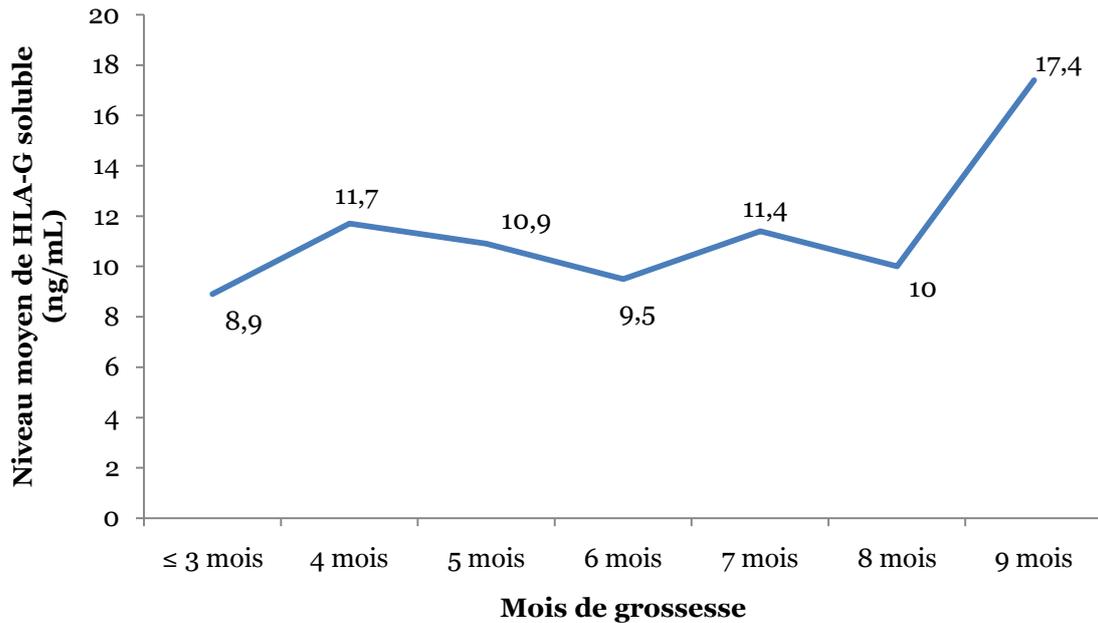


Figure 25 : Évolution du niveau de HLA-G soluble au cours de la grossesse chez 400 femmes enceintes de la commune d’Allada, Bénin

Une comparaison des niveaux mensuels de HLA-G en cours de la grossesse a été faite avec un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Ce test montre qu’il existe une différence entre les différents niveaux de HLA-G ($p=10^{-3}$). Afin de déterminer où se situe cette différence, nous avons effectué une comparaison deux à deux avec un test de Student. Dans ce cas, compte tenu du nombre de tests réalisés, notre seuil de signification passe de 0,05 à $0,05/(n=21)$ soit 0,0023 . Cette analyse confirme que le niveau de HLA-G soluble reste stable au cours de la grossesse jusqu’à 8 mois puis augmente significativement ($p<10^{-3}$) au moment de l’accouchement

3.2.3.2 Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble au cours de la grossesse

Les facteurs associés au niveau de HLA-G soluble pendant la grossesse ont été analysés à chacune des trois visites. Les facteurs que nous avons testés sont l’âge maternel, l’appartenance ethnique, la gestité, le schéma de TPI appliqué, l’infection

placentaire, les infections palustres au moment du prélèvement, le genre et le faible poids de naissance du nouveau-né.

Ainsi, au cours de la première visite, l'analyse univariée montre que la gestité, le TPI et l'infection étaient associés au niveau de HLA-G maternel. Les femmes multigestes avaient un niveau de HLA-G soluble plus élevé que les primigestes ($p=0,036$) en début de grossesse. Le niveau de HLA-G semblait plus faible chez les femmes ayant reçu la méfloquine en schéma MQSD pour le TPI ($p=0,05$) et chez les femmes ayant une infection placentaire diagnostiquée à l'accouchement ($p=0,04$). Il n'y avait pas d'effet de l'âge de la mère, du genre du fœtus, ni du faible poids de naissance. Dans le modèle multivarié, la primigestité est restée significativement associée à un bas niveau de HLA-G tandis que l'infection placentaire et le TPI deviennent marginalement significatifs (Tableau 11).

Tableau 11 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble en début de grossesse (TPI1), Allada : modèles univarié et multivarié

Covariables		β non ajusté (univarié)	95% CI	<i>p</i>	β ajusté (multivarié*)	95% CI	<i>p</i>
Age maternel	≤25	0					
	>25	3,3	-0,1; 0,7	0,11			
Ethnies	Fon	0					
	Autres	-0,9	-5,8; 4,1	0,73			
Genre	Masculin	0					
	Féminin	-1,1	-5,2; 2,9	0,59			
Gestité	Multigeste	0			0		
	Primigeste	-6,2	-11,9; -0,4	0,036	-6,0	-11,8; -0,3	0,039
TPI	SP/MQFD	0			0		
	MQSD	-4,4	-8,9; 0,1	0,055	-4,3	-8,7; 0,2	0,06
Infection placentaire	Non	0			0		
	Oui	-6,9	-13,6; -0,2	0,04	-6,2	-12,9; 0,6	0,07
Infection palustre périphérique	Non	0					
	Oui	1,25	-4,3; 6,7	0,67			
FPN	Non	0					
	Oui	4,1	-1,2; 9,4	0,13			

*Le modèle multivarié contient les variables gestité, TPI, infection placentaire

Au moment de la deuxième visite (TPI 2), aucune variable ne ressort associée au niveau de HLA-G en dehors de l'âge maternel. C'est ainsi que les femmes les plus âgées ont un niveau moyen de HLA-G soluble plus haut que les plus jeunes ($p=0,006$) (Tableau 12).

Tableau 12 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble en milieu de grossesse (TPI 2), Allada : modèles univarié et multivarié

Covariables		β non ajusté (univarié)	95% CI	P	β ajusté (multivarié*)	95% CI	P
Age maternel	≤25	0			0		
	>25	5,9	1,7;10,0	0,006	5,6	1,4; 9,8	0,009
Ethnies	Fon	0					
	Autres	-1,2	-6,3; 3,8	0,63			
Genre	Masculin	0					
	Féminin	-1,7	-5,9;2,4	0,41			
Gestité	Multigeste	0					
	Primigeste	-3,2	-8,9; 2,6	0,28			
TPI	SP/MQFD	0			0		
	MQSD	-2,8	-7,4; 1,7	0,23	-2,1	-6,7; 2,4	0,35
Infection placentaire	Non	0					
	Oui	-4,8	-11,6; 2,0	0,17			
Infection palustre périphérique	Non	0					
	Oui	-1,9	-12,2; 8,3	0,71			
FPN	Non	0			0		
	Oui	-5,1	-12,6; 2,4	0,18	-4,1	-11,6; 3,3	0,28

*Le modèle multivarié contient les variables âge maternel, TPI et FPN après la procédure pas à pas descendante.

A la dernière visite, celle de l'accouchement, aucune association significative n'a été retrouvée entre le niveau de HLA-G soluble et les variables en analyses univariées et multivariées. Notons cependant que les femmes ayant eu des nouveau-nés de faible poids de naissance avaient un niveau plus élevé et qu'en cas d'infection placentaire, le niveau était bas. Ces deux différences étaient marginalement significatives ($p=0,08$ et $p=0,07$ respectivement, Tableau 13).

Tableau 13 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble en fin de grossesse (à l'accouchement), Allada : modèles univarié et multivarié

Covariables		β non ajusté (univarié)	95% CI	P	β ajusté (multivarié*)	95% CI	P
Age maternel	≤25	0					
	>25	-0,9	-9,9; 8,0	0,84			
Ethnies	Fon	0					
	Autres	-0,3	-11,4; 10,7	0,95			
Genre	Masculin	0					
	Féminin	-2,2	-11,1; 6,1	0,64			
Gestité	Multigeste	0					
	Primigeste	-1,42	-13,9; 11,11	0,82			
TPI	SP/MQFD	0					
	MQSD	3,3	-6,5; 13,0	0,51			
Infection placentaire	Non	0			0		
	Oui	-13,0	-27,6; 1,7	0,08	-13,5	-28,1; 1,1	0,07
Infection palustre périphérique	Non	0					
	Oui	-8,2	-22,6; 6,2	0,26			
FPN	Non	0			0		
	Oui	12,9	-2,5; 28,4	0,10	13,5	-1,9; 29,0	0,08

3.2.4 HLA-G au cours des deux premières années de vie

Les dosages de HLA-G ont été réalisés chez 373 enfants dont 311 avec au moins trois dosages pour tout le suivi. Sur les 2400 dosages (6 dosages pour 400 enfants), 1633 étaient disponibles soit 68%. Parmi les 400 enfants, 126 ont eu tous les prélèvements (31,5%) et 27 enfants n'ont eu aucun prélèvement (6,7%).

3.2.4.1 Évolution de HLA-G soluble pendant les deux premières années de vie

Pendant les 24 premiers mois, le niveau de sHLA-G le plus élevé s'observe à la naissance. Dans notre échantillon, il est de l'ordre de 20,2 ng/mL (écart-type = 28,1). L'analyse de cette évolution par un modèle mixte (Tableau 14) montre que le niveau diminue ensuite significativement jusqu'à 18 mois avant de se stabiliser ($p < 10^{-3}$, Figure 26).

Tableau 14 : Évolution du niveau de HLA-G soluble en fonction de l'âge de l'enfant, par un modèle mixte univarié

Age du nouveau-né	β	95% CI	<i>p</i>
Naissance	-	-	
6 mois	-8,7	-1,2 ; -0,5	$< 10^{-3}$
9 mois	-11,7	-1,3 ; -0,6	
12 mois	-17,6	-1,5 ; -0,8	
18 mois	-23,1	-1,8 ; -1,1	
24 mois	-22,3	-1,8 ; -1,1	

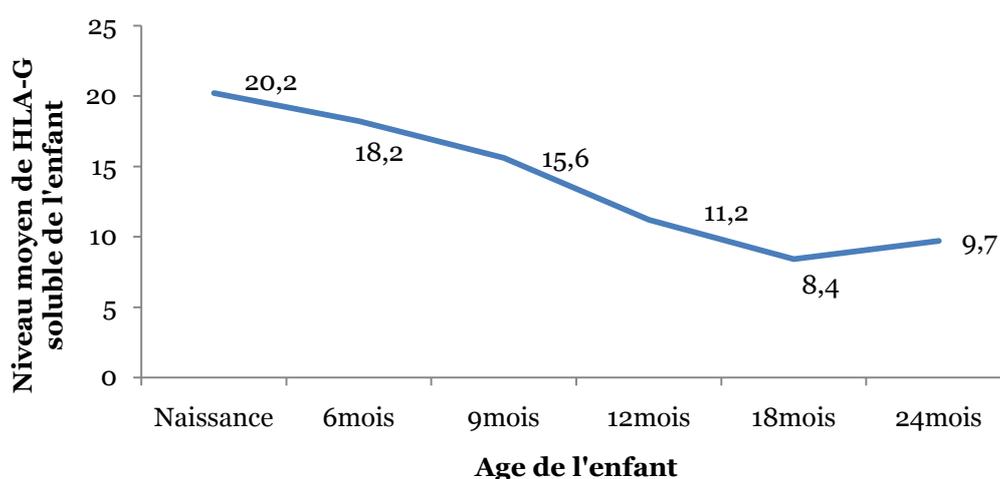


Figure 26 : Évolution du niveau moyen de HLA-G soluble chez 400 enfants de 0 à 24 mois à Allada

3.2.4.2 Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble au cours des deux premières années de vie

Au cours de l'analyse univariée, il n'y avait pas de différence entre les niveaux moyens de HLA-G soluble de l'enfant en fonction de l'âge des mères ($p=0,31$), du rang gestationnel ($p=0,42$) et du groupe ethnique de la mère ($p=0,96$). De la même manière le genre du nouveau-né ($p=0,51$) et le faible poids de naissance ($p=0,29$) n'ont pas d'effet sur le niveau de HLA-G soluble de 0 à 24 mois. La survenue d'une infection placentaire, d'une fièvre (ou d'une notion de fièvre au cours des 24 heures) ou d'un phénomène inflammatoire n'est également pas associée à une variation significative du niveau de HLA-G soluble de l'enfant ($p=0,66$, $p=0,98$ et $p=0,39$ respectivement). Par contre, l'infection palustre de l'enfant est associée à un niveau de HLA-G soluble plus élevé au cours de la même visite ($p=0,03$). En appliquant la procédure pas-à-pas descendante pour l'analyse multivariée, l'infection palustre au moment du prélèvement reste la seule variable significative ($p=0,02$). Une interaction significative a été identifiée au cours de cette analyse multivariée entre le faible poids de naissance et l'âge de l'enfant (Tableau 15). En effet, lorsqu'on observe l'évolution du niveau de HLA-G chez les enfants en fonction du poids de naissance, on remarque que les enfants de faible poids maintiennent en moyenne un niveau élevé, et s'écartent de l'évolution moyenne tandis que les enfants de poids normal connaissent une diminution du niveau de 0 à 24 mois comme le montre la Figure 27.

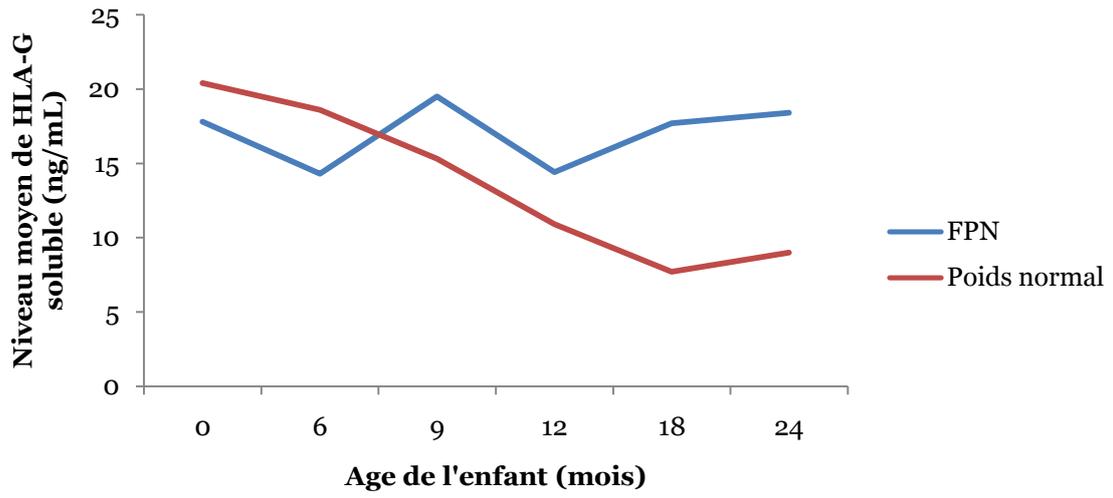


Figure 27 : Évolution du niveau moyen de HLA-G soluble observé chez les enfants de poids de naissance normal et les enfants de faible poids de naissance

Tableau 15 : Facteurs associés au niveau de HLA-G soluble de la naissance à 24 mois chez les enfants, Allada : modèles univarié et multivarié

Covariables		β non ajusté (univarié)	95% CI	<i>p</i>	β ajusté (multi varié*)	95% CI	<i>P</i>	
Genre	Masculin	0	-4,0 ; 8,2	0,51				
	Féminin	2,1						
FPN	Non	0	-5,2 ; 17,2	0,29				
	Oui	6						
Fièvre (ou antécédent de fièvre)	Non	0	-6,1 ; 5,9	0,98				
	Oui	-0,1						
Infection palustre à la visite	Non	0	0,8 ; 14,14	0,03	0	1,3 ; 14,7	0,02	
	Oui	7,5			8,0			
CRP positive	Non	0	-2,9 ; 7,4	0,39				
	Oui	2,3						
Age maternel (ans)	≤25	0	-2,9 ; 9,4	0,31				
	>25	3,2						
Gestité	Multigeste	0	-11,9, 5,0	0,42				
	Primigeste	-3,5						
Ethnies	Fon	0	-7,6 ; 7,2	0,96				
	Autres	-0,2						
Infection placentaire	Non	0	-7,5 ; 11,8	0,66				
	Oui	2,2						
Age de l'enfant (mois)	0	0	-1,2 ; -0,5	10 ⁻³	0	-34,8 ; -20,7	10 ⁻³	
	6	-8,7	-1,3 ; -0,6		-10,2			-16,85 ; -3,5
	9	-11,7	-1,5 ; -0,8		-14,2			-20,7 ; -7,5
	12	-17,6	-1,8 ; -1,1		-20,2			-26,8 ; -13,6
	18	-23,1	-1,8 ; -1,1		-26,1			-33,0 ; -19,1
	24	-22,3			-27,7			
Interaction FPN-âge (enfant)	0				0	0,06		
	6				7,6		-17,5 ; 32,7	0,55
	9				12,4		-11,7 ; 36,4	0,31
	12	-		-	19,0		-4,6 ; 42,7	0,11
	18				31,4		5,4 ; 57,3	0,02
	24				34,7		9,4 ; 59,9	0,007

* le modèle final contient l'infection au moment de la visite, le FPN, l'âge de l'enfant et l'interaction FPN-âge

3.2.5 Corrélation mère-enfant

La corrélation entre les niveaux de HLA-G de la mère et de l'enfant a été testée séparément entre chaque visite, puis de façon globale sur tout le suivi de la grossesse et des 24 mois.

3.2.5.1 Entre chaque visite

Il existait une corrélation entre les niveaux de HLA-G de la mère à toutes les visites TPI1, TPI2 et à l'accouchement et chacun des niveaux de l'enfant au cours des 24 mois. (Tableau 16). Cette corrélation entre HLA-G maternel et HLA-G de l'enfant est toujours positive et varie entre 0,34 et 0,50.

Tableau 16 : Coefficient de corrélation de Spearman entre le niveau de HLA-G maternel et de l'enfant à chaque visite

Coefficient de Spearman (p)	Sang cordon	6 mois	9 mois	12 mois	18 mois	24 mois
TPI 1	0,34 ($<10^{-3}$)	0,44 ($<10^{-3}$)	0,40 ($<10^{-3}$)	0,48 ($<10^{-3}$)	0,46 ($<10^{-3}$)	0,48 ($<10^{-3}$)
TPI 2	0,37 ($<10^{-3}$)	0,36 ($<10^{-3}$)	0,38 ($<10^{-3}$)	0,41 ($<10^{-3}$)	0,39 ($<10^{-3}$)	0,50 ($<10^{-3}$)
Accouchement	0,39 ($<10^{-3}$)	0,35 ($<10^{-3}$)	0,36 ($<10^{-3}$)	0,39 ($<10^{-3}$)	0,39 ($<10^{-3}$)	0,39 ($<10^{-3}$)

3.2.5.2 Pendant le suivi global

Afin d'approfondir les analyses de corrélation mère-enfant, nous avons défini des profils de production de HLA-G soluble (voir « 3.1.10 Stratégie d'analyse » du chapitre 3). Chez les mères, le niveau moyen au cours de toute la grossesse est de 12,8 ng/mL (IC95% : 11,2 – 14,4) et chez les enfants, il est de 14,0 ng/mL (IC95% : 12,4 –

15,7). Les quartiles correspondants à la distribution de HLA-G soluble chez les mères et chez les enfants sont décrits dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Quartiles de la distribution de HLA-G chez les enfants et les mères pendant tout le suivi de l'étude

Quartiles de la distribution de HLA-G (ng/mL)	Mères (grossesse)	Enfants (6-24 mois)
Q25	1,2	2,2
Q50	9,1	8,9
Q75	19,04	20,0

En fonction de ces quartiles, quatre profils ont été créés chez les mères et les enfants et les niveaux moyens de HLA-G dans chaque groupe sont illustrés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Niveaux moyens de HLA-G dans les profils maternels et de l'enfant pendant le suivi global

Profil de production de HLA-G pendant le suivi	Mères (grossesse) (IC95%)	Enfants (6-24 mois) (IC95%)
Très bas	0,18 (0,11, 0,24)	0,21 (0,13 ; 0,31)
Bas	4,7 (4,2 ; 5,1)	3,9 (3,5 ; 4,3)
Haut	14,7 (14,2 ; 15,3)	12,5 (11,8 ; 13,2)
Très haut	32,0 (27,7 ; 36,3)	33,6 (30,2 ; 36,9)

A partir des ces profils, nous avons réalisé une régression polytonique ordinale permettant d'obtenir les probabilités pour un enfant d'avoir un profil donné pendant les deux premières années lorsqu'il naît d'une mère ayant un certain profil au cours de la grossesse. Le Tableau 19 montre les résultats des modèles univarié et multivarié.

En analyse univariée, seul le profil HLA-G de la mère est associé au profil HLA-G de l'enfant ($p < 10^{-3}$). Les autres variables maternelles (âge, gestité et ethnies, l'infection placentaire), le faible poids de naissance et le genre de l'enfant ne sont pas associés. En analyse multivariée, le profil maternel de HLA-G reste significatif : ainsi quand on passe d'une mère dont le profil de sHLA-G est « très bas » à une mère dont le profil de sHLA-G est « bas », l'OR d'un enfant d'avoir un profil sHLA-G "très haut" versus tout le reste est 3,1 (IC95 : 1,8 ; 5,4) . Cet OR devient 17,6 (IC95 : 9,6 ; 32,5) si la mère passe de très bas à très haut. Ainsi toute augmentation du profil de la mère s'accompagne d'une augmentation de « risque » de donner naissance à un enfant avec un profil élevé. L'enfant de profil « très haut » a donc une probabilité plus élevée d'être né d'une mère de profil « très haut ». Lors de l'analyse multivariée, l'infection placentaire redevient significative, indiquant que quel que soit le profil HLA-G maternel les enfants nés de mères ayant une infection placentaire ont un risque plus élevé d'avoir un profil HLA-G élevé au cours des 2 premières années de vie.

Tableau 19 : Facteurs associés au profil HLA-G soluble de 6 à 24 mois chez les enfants, Allada : modèles univarié et multivarié

Covariables		OR non ajusté (univarié)	95% CI	p	OR ajusté (multi varié*)	95% CI	p
Genre	Masculin	1					
	Féminin	0,9	0,6 ; 1,3	0,69			
FPN	Non	1					
	Oui	1,0	0,5 ; 1,9	0,97			
Age maternel (ans)	≤25	1					
	>25	1,1	0,8 ; 1,6	0,54			
Gestité	Multigeste	1					
	Primigeste	0,8	0,5 ; 1,4	0,49			
Ethnies	Fon	1					
	Autres	0,9	0,5 ; 1,3	0,50			
Infection placentaire	Non	1					
	Oui	1,36	0,8 ; 2,4	0,28	2,4	1,3 ; 4,4	0,006
Profil HLA-G maternel	Très bas	1			1		
	Bas	2,8	1,6 ; 4,8	<10 ⁻³	3,1	1,8 ; 5,4	<10 ⁻³
	Hauts	7,8	4,4 ; 13,6		8,3	4,7 ; 14,7	
	Très hauts	14,5	8,0 ; 26,3		17,6	9,6 ; 32,5	

A partir de ce modèle multivarié, nous avons déterminé les probabilités pour un enfant d'avoir un profil de HLA-G soluble donné en fonction de celui de sa mère. Il apparaît clairement que les enfants ont une probabilité plus élevée d'avoir le même profil que leur mère (Figure 28, Figure 29, Figure 30 et Figure 31).

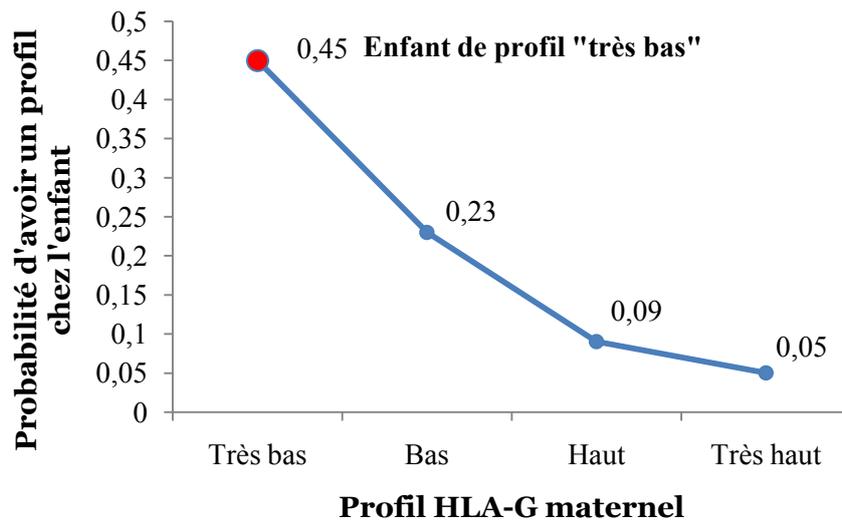


Figure 28 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « très bas »

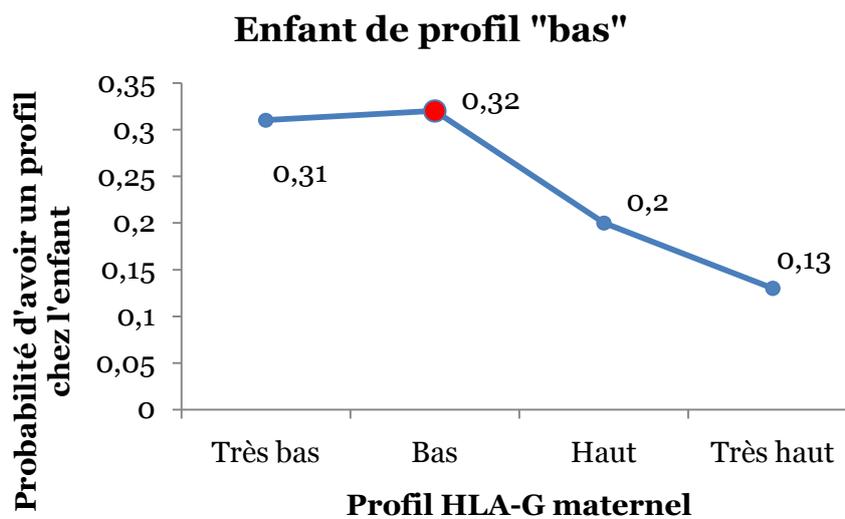


Figure 29 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « bas »

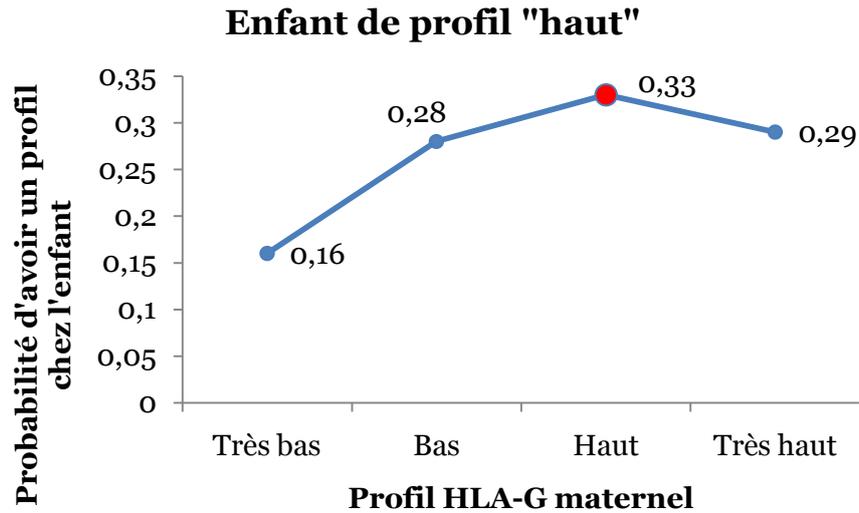


Figure 30 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « haut »

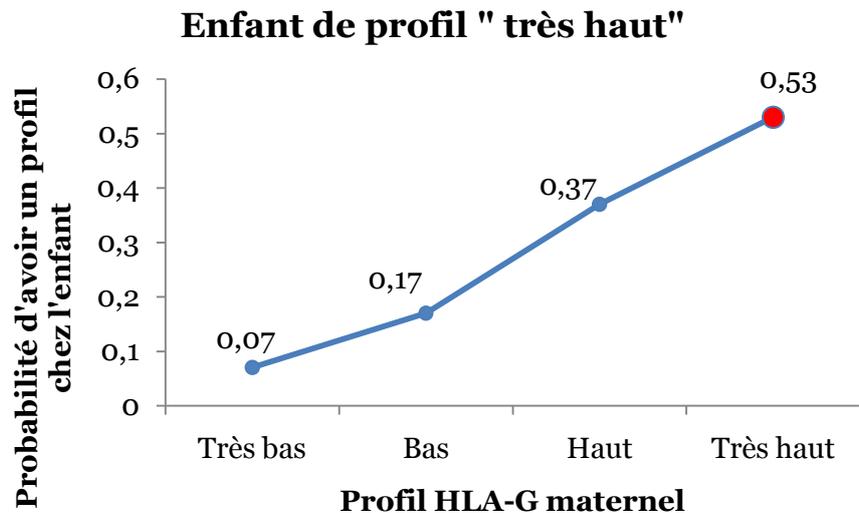


Figure 31 : Probabilité d'avoir un profil HLA-G enfant « très haut »

3.2.6 HLA-G et délai d'infection : modèle de Cox

L'association entre HLA-G et l'infection palustre a été recherchée avec un modèle de Cox en analyses univariée et multivariée. Pour chacune des variables, l'hypothèse des risques proportionnels a été vérifiée et cette condition était remplie. Ainsi, en analyse

univariée, le délai de survenue de la première infection palustre chez les enfants n'apparaît pas associé à l'âge maternel ($p=0,87$), la gestité ($p=0,95$), le schéma du TPI administré ($p=0,07$). Il en est de même pour l'infection palustre placentaire ($p=0,61$) et les infections palustres non placentaire prises isolément à chaque visite ou regroupées sur toute la grossesse. Chez les enfants, le genre et le faible poids de naissance ne sont pas non plus associés au délai de survenue de la première infection palustre ($p=0,16$ et $p=0,33$ respectivement). Seuls le groupe ethnique maternel est associé avec un délai de survenue plus court chez les enfants nés de mères « Fon » comparés aux autres ($p=0,03$), ainsi que le risque environnemental qui lorsqu'il augmente entraîne un risque d'infection palustre plus précoce ($p<10^{-3}$). Les niveaux de HLA-G de la mère pendant la grossesse ne semblent pas non plus associés à une modification du délai d'infection que ça soit au début de la grossesse (TPI1 : $p=0,15$), au milieu (TPI2 : $p=0,6$) ou encore au moment de l'accouchement ($p=0,82$). Au cours de l'analyse multivariée, les variables pour lesquelles $p<0,20$ sont incluses dans le modèle, en plus des variables liées au paludisme et du niveau de HLA maternel. Le risque environnemental de l'enfant reste significatif avec une augmentation du risque d'infection précoce pour les niveaux élevés d'exposition. Lors de cette analyse, le niveau de sHLA-G au début de grossesse (TPI1) apparaît significativement associé au délai de survenue d'une infection palustre chez l'enfant ($p=0,01$) avec un Hazard Ratio de 1.02 (IC95 = 1,01 ; 1,03). Pour faciliter l'interprétation de ce résultat nous avons repris l'analyse en dichotomisant la variable HLA-G soluble en deux groupes en fonction de la médiane. Les enfants nés de mères ayant des niveaux de HLA-G soluble élevés en début de grossesse (TPI1) développent leur première infection palustre plus tôt que les enfants dont les mères ont un niveau faible (Hazard Ratio=1,6, IC95 (1,01 ; 2,43) ; $p=0,04$). Les résultats de ces analyses figurent dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Facteurs maternels ou de l'enfant associés au délai de survenue de la première infection palustre chez l'enfant

Covariables		Hazard ratio (univarié)	95% CI	p	Hazard ratio (multi varié*)	95% CI	p
Genre	Masculin	1					
	Féminin	0,85	0,7 ; 1,1	0,16			
FPN	Non	1					
	Oui	0,8	0,5 ; 1,3	0,33			
Risque environnemental d'exposition	continue	1,3	1,1 ; 1,5	<10 ⁻³	1,3	1,11 ; 1,48	0,001
Age maternel (ans)	≤25	1	0,99 ;				
	>25	1,001	1,01	0,87			
Gestité	Multigeste	1					
	Primigeste	0,99	0,7 ; 1,4	0,95			
Ethnies	Fon	1					
	Autres	0,7	0,6 ; 0,9	0,03			
TPI	SP	1					
	MQFD	1,2	0,9 ; 1,6				
	MQSD	0,9	0,7 ; 1,2	0,07			
Infection placentaire	Non	1					
	Oui	1,1	0,7 ; 1,6	0,61			
Infection palustre à TPI1	Non	1					
	Oui	0,9	0,7 ; 1,3	0,63			
Infection palustre à TPI2	0	1					
	1	1,4	0,8 ; 2,4	0,23			
	2	5,6	0,8 ; 40,6				
Infection palustre périphérique à l'accouchement	0	1		0,74			
	1	1,1	0,8 ; 1,6				
	2	1,2	0,2 ; 8,5				
HLA-G TPI1*	Bas	1			1		
	Haut	1,2	0,9 ; 1,5	0,15	1,6	1,01 ; 2,43	0,04
HLA-G TPI2*	Bas	1					
	Haut	1,1	0,8 ; 1,4	0,6			
HLA-G*	Bas	1					
Accouchement	Haut	0,97	0,7 ; 1,3	0,82			

* inférieur (supérieur) à la médiane

La Figure 32 ci-dessous montre l'évolution de la courbe de survie de 0 à 24 mois. Cet indicateur montre clairement un excès de risque d'infection précoce à partir du 10^{ième} mois pour les enfants nés d'une mère ayant un niveau élevé de HLA-G soluble en début de grossesse.

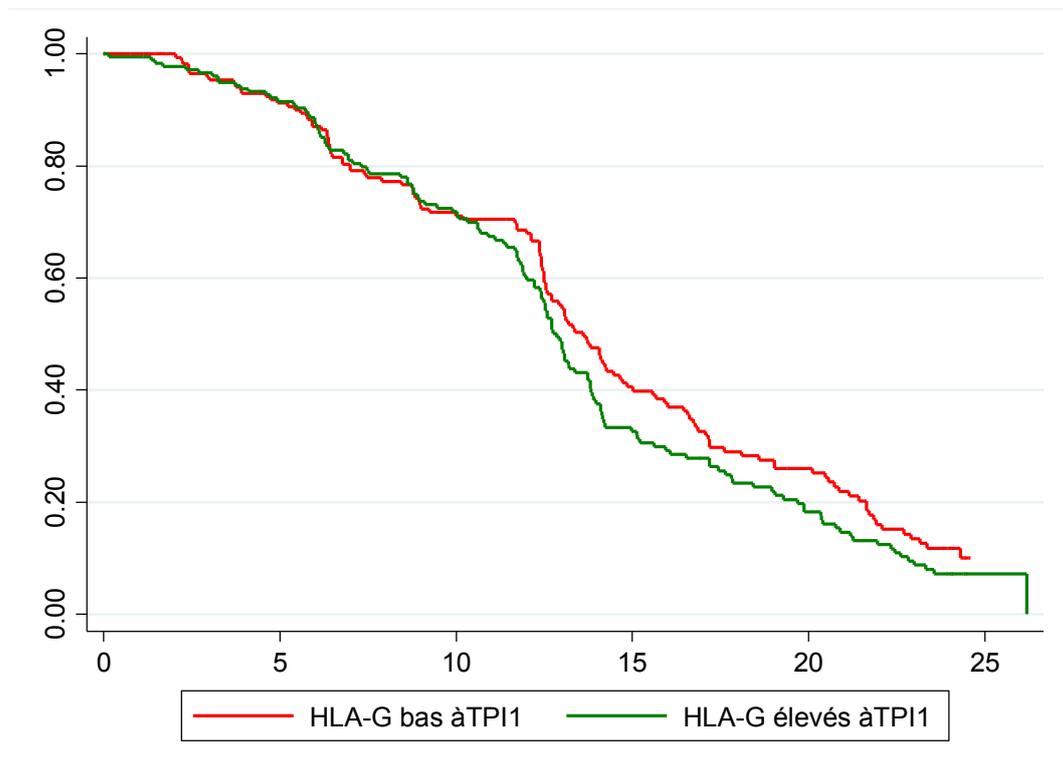


Figure 32 : Évolution de la courbe de survie en fonction des niveaux de HLA-G maternel à l'inclusion en début de grossesse

La majeure partie de ces résultats ont fait l'objet d'un deuxième article en cours de publication dans le journal Plos One et présenté ci-dessous. Il présente les analyses de l'évolution de HLA-G au cours de la grossesse et chez l'enfant. Les analyses de survie, quant à elles, feront l'objet d'un troisième article, en cours de rédaction.

PLOS ONE

Soluble human leukocyte antigen -G during pregnancy and infancy in Benin: mother/child resemblance and association with the risk of malaria infection and low birth weight --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Soluble human leukocyte antigen -G during pregnancy and infancy in Benin: mother/child resemblance and association with the risk of malaria infection and low birth weight
Short Title:	sHLA-G during pregnancy and infancy in Benin
Corresponding Author:	Tania C d'Almeida Institut de recherche pour le developpement Paris, FRANCE
Keywords:	sHLA-G, malaria, pregnancy, infancy, resemblance
Abstract:	<p>Human leukocyte antigen (HLA) G is the tolerogenic molecule involved in the maternal-fetal immune tolerance phenomenon. Its expression during some infectious diseases leading to immune evasion has been established. A first study conducted in Benin has shown that the production of soluble HLA-G (sHLA-G) during the first months of life is strongly correlated with the maternal level at delivery and associated with low birth weight and malaria. However sHLA-G measurements during pregnancy were not available for mothers and furthermore, to date the evolution of sHLA-G in pregnancy is not documented in African populations.</p> <p>To extend these previous findings, between January 2010 and June 2013, 400 pregnant women of a malaria preventive trial and their newborns were followed up in Benin until the age of 2 years. Soluble HLA-G was measured 3 times during pregnancy and repeatedly during the 2 years follow-up to explore how sHLA-G evolved and the factors associated.</p> <p>During pregnancy, plasma levels of sHLA-G remained stable and increased significantly at delivery ($p < 10^{-3}$). Multigravid women seemed to have the highest levels ($p = 0.039$). In infants, the level was highest in cord blood and decreased before stabilizing after 18 months ($p < 10^{-3}$). For children, a high level of sHLA-G was associated with malaria infection during the follow-up ($p = 0.02$) and low birth weight ($p = 0.06$). The mean level of sHLA-G during infancy was strongly correlated with the mother's level during pregnancy ($< 10^{-3}$), and not only at delivery. Moreover, mothers with placental malaria infection had a higher probability of giving birth to a child with a high level of sHLA-g ($p = 0.006$).</p> <p>High sHLA-G levels during pregnancy might be associated with immune tolerance related to placental malaria. Further studies are needed but this study provides a first insight concerning the potential role of sHLA-G as a biomarker of weakness for newborns and infants.</p>
Order of Authors:	<p>Tania C d'Almeida</p> <p>Ibrahim Sadissou</p> <p>Jacqueline Milet</p> <p>Gilles Cottrell</p> <p>Amandine Mondière</p> <p>Euripide Avokpaho</p> <p>Laure Gineau</p> <p>Audrey Sabbagh</p> <p>Achille Massougbodji</p> <p>Kabirou Moutairou</p>

1 **Soluble human leukocyte antigen -G during pregnancy and infancy**
2 **in Benin: mother/child resemblance and association with the risk of**
3 **malaria infection and low birth weight**

4 Tania C. d'Almeida^{1,2[¶]}, Ibrahim Sadissou^{2,3,4,5*}, Jacqueline Milet^{2,6}, Gilles Cottrell^{2,6},
5 Amandine Mondiere⁷, Euripide Avokpaho⁸, Laure Gineau², Audrey Sabbagh², Achille
6 Massougbodji^{3,4}, Kabirou Moutairou⁴, Eduardo A. Donadi⁵, Benoit Favier^{9,10}, Edgardo
7 Carosella^{9,10}, Philippe Moreau^{9,10**}, Nathalie Rouas-Freiss^{9,10**}, David Courtin^{2,6**} and André
8 Garcia^{1,2,3**}

9

10 ¹ Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France

11 ² UMR 216-MERIT, Institut de Recherche pour le Développement, Faculté de Pharmacie -
12 Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Paris, France

13 ³ Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance,
14 Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou, Bénin

15 ⁴ Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin

16 ⁵ Division of Clinical Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São
17 Paulo, Brazil

18 ⁶ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

19 ⁷ UMR 216-MERIT, Institut de Recherche pour le Développement, Campus de la Faculté des
20 Sciences de la Santé (FSS) et de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA),
21 Cotonou, Bénin

22 ⁸ Ecole Pasteur – CNAM de santé publique, Paris, France

23 ⁹ CEA, Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes (IMETI), Service de
24 Recherches en Hémato-Immunologie (SRHI), Hôpital Saint-Louis, IUH, Paris, France;

25 ¹⁰ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IUH, Hôpital Saint-Louis, UMR_E5, IUH,
26 Paris, France

27 ^{*} Joint first authors

28 ^{**} Joint senior authors

29 [®] Corresponding author,

30 carenedalmeida@gmail.com

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41 **Abstract**

42 Human leukocyte antigen (HLA) G is the tolerogenic molecule involved in the
43 maternal-fetal immune tolerance phenomenon. Its expression during some infectious
44 diseases leading to immune evasion has been established. A first study conducted in Benin
45 has shown that the production of soluble HLA-G (sHLA-G) during the first months of life is
46 strongly correlated with the maternal level at delivery and associated with low birth weight
47 and malaria. However sHLA-G measurements during pregnancy were not available for
48 mothers and furthermore, to date the evolution of sHLA-G in pregnancy is not documented in
49 African populations.

50 To extend these previous findings, between January 2010 and June 2013, 400
51 pregnant women of a malaria preventive trial and their newborns were followed up in Benin
52 until the age of 2 years. Soluble HLA-G was measured 3 times during pregnancy and
53 repeatedly during the 2 years follow-up to explore how sHLA-G evolved and the factors
54 associated.

55 During pregnancy, plasma levels of sHLA-G remained stable and increased
56 significantly at delivery ($p < 10^{-3}$). Multigravid women seemed to have the highest levels
57 ($p = 0.039$). In infants, the level was highest in cord blood and decreased before stabilizing
58 after 18 months ($p < 10^{-3}$). For children, a high level of sHLA-G was associated with malaria
59 infection during the follow-up ($p = 0.02$) and low birth weight ($p = 0.06$). The mean level of
60 sHLA-G during infancy was strongly correlated with the mother's level during pregnancy
61 ($< 10^{-3}$), and not only at delivery. Moreover, mothers with placental malaria infection had a
62 higher probability of giving birth to a child with a high level of sHLA-g ($p = 0.006$).

63 High sHLA-G levels during pregnancy might be associated with immune tolerance
64 related to placental malaria. Further studies are needed but this study provides a first insight

65 concerning the potential role of sHLA-G as a biomarker of weakness for newborns and
66 infants.

67

68 **Keywords:** sHLA-G, malaria, pregnancy, infancy, resemblance

69

70 **Background**

71 Human leukocyte antigen-G (HLA-G) is a nonclassical HLA class I antigen that differs
72 from the others HLA class I molecules in its limited polymorphism, its restricted tissue
73 distribution and its particular expression (1). Alternative splicing encodes four membrane-
74 bound and three soluble isoforms. The main isoforms present in the plasma are soluble HLA-
75 G1 and -G5 (2). HLA-G also differs from the HLA class I molecule by exerting inhibitory
76 functions on immune responses (3-5).

77 The expression of HLA-G during pregnancy and its importance in maternal–fetal
78 tolerance is well established (6, 7). Indeed, the major physiological role of HLA-G is the
79 protection of the fetal semi-allograft against lysis by maternal NK cells. The levels of soluble
80 HLA-G (sHLA-G) are significantly higher in pregnant than in nonpregnant women (8-10).
81 sHLA-G has been used as a reliable marker for following *in vitro* fertilization (11, 12) and was
82 significantly lower in preeclampsia than in normal pregnancy (13). In newborns, studies have
83 shown that the levels in cord blood are lower than in mothers (10, 14).

84 The origin of the variability of sHLA-G blood levels is complex and not fully known,
85 involving genetic mechanisms (15). Until recently, African populations have been
86 underrepresented in studies despite the greater genetic diversity and heterogeneity observed
87 across Africa (16). There are currently no data on how sHLA-G evolves during pregnancy in
88 African populations except one study with data available only at delivery for mothers. A

89 strong positive correlation between sHLA-G levels in mothers at delivery and children has
90 been highlighted, and high levels of sHLA-G in children appeared to increase the malaria risk
91 and are associated with low birth weight (LBW) (17), which is highly correlated with neonatal
92 morbidity and mortality (18, 19). Unfortunately, gestational information was not available in
93 this first study and it seemed important to account for the course of pregnancy.

94 In case of malaria infection of the placenta an immune tolerance phenomenon has
95 been described as responsible for the higher susceptibility of newborns to malaria infection
96 during the first months of life (20-22). Due to the important role of HLA-G in immune
97 regulation and immune tolerance and to its strong expression during pregnancy, the potential
98 association between sHLA-G during the whole pregnancy, and not only at delivery and
99 malaria needs to be explored.

100 In the current study involving pregnant women, our aim was to explore the
101 mother/child resemblance and to confirm or not the association between malaria, LBW and
102 sHLA-G level.

103

104 **Material and methods**

105

106 **Study design and follow-up**

107 The present follow-up is part of a study concerning 1,183 human immunodeficiency virus
108 (HIV)-negative pregnant women participating in Malaria in Pregnancy Preventive Alternative
109 Drugs (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00811421>), a randomized trial of intermittent
110 preventive treatment (IPTp) with either sulfadoxine-pyrimethamine or mefloquine. The first
111 400 infants born to these women were enrolled from January 2010 to June 2011 and
112 followed throughout the first 2 years of life (23, 24). Twin pregnancies, stillbirth, or fetal
113 abnormalities were excluded (<1%). Women were included before the end of 28 gestational
114 weeks (GW) and two doses of IPTp were administered at antenatal visits (ANVs). Between
115 ANVs, women had to attend the health centre for all health complaints. Women were

116 examined and a questionnaire completed. At inclusion, sociodemographic information,
117 socioeconomic characteristics, reproductive and medical history were collected.

118 Three blood samples were collected during scheduled ANVs (before IPTp) for plasma sHLA-
119 G measurement and malaria diagnosis. After delivery, a placental blood smear was used to
120 assess placental malaria. Malaria infection was defined as the presence of
121 asexual *Plasmodium falciparum* parasites in a blood smear.

122 Newborns were followed from birth to 24 months. At 6, 9, 12, 18 and 24 months, children
123 were visited and clinically examined, and anthropometric data were collected. Children were
124 regularly visited, a medical questionnaire was filled out and a systematic thick blood smear
125 (TBS) was performed to search for asymptomatic malaria. Mothers were invited to visit
126 health centres with their child if there was any health problem and in case of fever or history
127 of fever, a rapid diagnosis test (RDT) was performed. A malaria attack was defined as an
128 axillary temperature greater or equal to 37.5 (or history of fever) and a positive RDT. Cord
129 blood was sampled at birth, peripheral blood at 6, 9, 12, 18 and 24 months, and the same
130 tests as in mothers were performed. All the medications prescribed were free of charge.

131

132 **Soluble HLA-G quantification**

133 Soluble HLA-G was quantified using MEM-G/9 (25), which recognizes the most abundant
134 soluble isoforms (sHLA-G1, -G5) and anti-human β 2-microglobulin as capture and detection
135 antibodies, respectively (26). All incubation steps were performed at room temperature and
136 followed by four washes using washing buffer (H₂O, PBS 1X, 0.1% Tween20). The plates
137 were incubated for 30 min with the substrate (Tetramethyl benzidine, Sigma Aldrich, USA)
138 and absorbance was measured at 450 nm after adding HCL (1 N). Total sHLA-G levels were
139 determined from a five-point standard curve (12.5–200 ng/mL) using dilutions of calibrated
140 HLA-G5 purified from M8-HLA-G5 cell line culture supernatant, and the results were
141 expressed as ng/mL. The limit of detection is ~1 ng/mL. The methodology to measure HLA-G
142 using ELISA has been validated (25).

143

144 **Ethics**

145 The study protocol was approved by the Comité Consultatif de Déontologie et d'Éthique
146 (CCDE) of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France) and the Ethics
147 Committee of the Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou (Benin). Before inclusion,
148 the study was explained in the local language and consent was obtained. In the case that the
149 woman could not read, an impartial witness was involved in the process. In addition to the
150 assent of minors, consent was obtained from the parents or legal guardians. Women were
151 free to interrupt their participation at any time.

152 **Definition of variables**

153 The outcome variable was the level of sHLA-G in mothers and infants, used as a quantitative
154 variable. To study mother/child resemblance, the mean level of sHLA-G was calculated
155 throughout the pregnancy for women and during follow-up for infants. The cord blood level
156 was not included in the mean calculation. Every woman/infant pair was classified as
157 belonging to one of the four quartiles of the mean distribution depending on their mean level
158 (ng/mL). The quartiles allowed us to define the sHLA-G profile for each individual. For
159 mothers the profiles (P) were: very low ($P1 \leq 1.19$), low ($1.19 < P2 \leq 9.11$), medium high
160 ($9.11 < P3 \leq 19.05$) and high ($19.05 < P4$); for children: very low ($P1 \leq 1.34$), low ($1.34 < P2 \leq 7.21$),
161 medium high ($7.21 < P3 \leq 18.43$) and high ($18.43 < P4$).

162 The following covariates were used:

- 163 - For mothers: women's age, ethnicity (Aizo, Fon, and others), newborn's gender and
164 birth weight, parity, GW, placental and peripheral malaria infection during follow-up;
- 165 - For children: birth weight, prematurity (≤ 37 GW), age, gender, height, ethnicity, fever,
166 CRP (C-reactive protein), maternal age, parity, maternal malaria (placental or
167 peripheral) and malaria infection of children.

168

169 **Statistical analysis**

170 Data were analyzed with Stata® Software, Version 12 (StatCorp LP, College Station, TX,
171 USA). Mothers and children were analyzed separately.

172 For mothers, the three sHLA-G measurements were not considered as classical repeated
173 measurements (IPTp administration for the first two ANVs and delivery at the third visit).
174 Therefore, the effects of covariates on the sHLA-G level at each visit were explored
175 separately using a Tobit regression model, a censored regression model, to account for the
176 truncated values generated by the sHLA-G detection limit (27, 28). The evolving sHLA-G
177 level at each gestational month was compared using a Kruskal-Wallis test with Bonferroni
178 correction. For children, systematic scheduled visits are not independent and the data
179 presented a hierarchical two-level structure, where sHLA-G measurements (level 1) were
180 clustered within children (level 2). Hierarchical mixed Tobit regression models were used for
181 univariate and multivariate analyses (29). Lastly, mother/child resemblance was explored
182 using the sHLA-G profiles as outcome. Since the profiles were ordered from “very low” to
183 “very high,” an ordinal logistic regression model was used.

184 All factors with a *p*-value <0.20 during univariate analyses and other interesting factors were
185 included in the multivariate step. Statistical significance was set at *p*<0.05.

186

187 **Results**

188 The women’s mean age was 25.9 years (95% confidence interval [25.4–26.4]; range, 18–
189 42). The first ANV occurred before 29 GW and 15.7% were primigravid. Throughout the
190 follow-up, 27.7% of women developed peripheral malaria and 10.9% had placental malaria at
191 delivery.

192 The mean birthweight was 3033.92 g [2992.50–3075.35], 9.05% had a LBW, and 14 children
 193 were preterm. During the study, 12.16% of children developed a malaria infection between 6
 194 and 24 months. There is no infection at birth in newborns.

195 The general characteristics of the study population are presented in Table 1.

196 **Table 1. Characteristics of women and newborns in Allada, 2007–2010**

Mothers (n=400)			Newborns (n=400)		
Age	25.92 years		Birth weight	3033.92 g	
Schooling	29.75% (117)		Low birthweight	9.05% (36)	
Ethnicity	Aizo	69.50% (278)	Prematurity	10.00% (40)	
	Fon	20.75% (83)	Gender	Female	53.00% (212)
	Others	9.75% (39)		Male	47.00% (188)
Previous pregnancies	0	15.75% (63)			
	1	20.75% (83)			
	2	14.75% (59)			
	3	17.25% (69)			
	4	10.00% (40)			
	≥5	21.50% (86)			
Married	97.75% (391)				
Primigravidae	15.75% (63)				
IPTp [○]	SP	34.50% (138)			
	MQFD	35.50% (142)			
	MFSD	30.00% (120)			
Placental malaria	10.75% (43)				
Health center	Attogon	24.00% (96)			
	Sekou	76.00% (304)			

197

198 [○] Two molecules were used for IPTp according to the protocol of the MIPPAD study: Sulfadoxine-pyrimethamine
 199 (SP: 1500/75 mg) and Mefloquine (MQ: 15 mg/kg), which is given once as a full dose (MQFD) or split over 2 days
 200 (MQSD).

201

202 **Evolution of soluble HLA-G in pregnancy**

203 Blood was sampled in 85% of mothers for the three ANVs, and 98% were sampled at least
 204 twice. sHLA-G was described by month of pregnancy after grouping the first 3 months

205 (Figure 1). The sHLA-G level remained stable during pregnancy and increased significantly
206 at delivery ($p < 10^{-3}$).

207 At the first ANV, univariate analysis showed that multigravid women had a higher sHLA-G
208 level ($p = 0.036$) than primigravid women. The sHLA-G level seemed lower in women who
209 took mefloquine for IPTp ($p = 0.05$) and those with placental malaria ($p = 0.04$). In contrast,
210 there is no effect of age, peripheral malaria, foetus gender and LBW. In multivariate analysis,
211 gravidity and IPTp remained significant ($p = 0.039$ and $p = 0.05$, respectively), but the
212 association of sHLA-G with placental malaria became marginally significant ($p = 0.07$).

213 At the second ANV, previous associations were no longer significant. However, the oldest
214 women (>25 years) had a higher sHLA-G level than the youngest ($p = 0.009$) (Table 2).

215 **Table 2. Factors associated with sHLA-G level in pregnancy: regression of Tobit (univariate and multivariate).**

216

Covariates	ANV 1 (IPT1)				ANV 2 (IPT2)				Delivery				
	β	P	Adjusted β	p	β	p	Adjusted β	p	β	p	Adjusted β	P	
Age	≤ 25 years	0	0.11	0	0.6	0	0.006	0	0.009	0	0.84	0	0.66
	> 25 years	3.27		1.18		5.86		5.58		-0.95		2.86	
Ethnicity	Fon	0	0.73	0	0.54	0	0.63	0	0.58	0	0.95	0	0.85
	Others	-0.87		-1.55		-1.25		-1.44		-0.32		1.08	
Gender	Male	0	0.59	0	0.76	0	0.41	0	0.67	0	0.64	0	0.57
	Female	-1.09		-0.63		-1.73		-0.91		-2.15		-2.65	
Primigravidity	No	0	0.036	0	0.039	0	0.28	0	0.93	0	0.82	0	0.93
	Yes	-6.17		-6.04		-3.17		-0.29		-1.42		0.59	
IPT	SP + MQFD	0	0.05	0	0.05	0	0.23	0	0.36	0	0.511	0	0.68
	MQSD	-4.38		-4.4		-2.81		-2.1		3.26		2.07	
Placental infection	No	0	0.04	0	0.07	0	0.17	0	0.39	0	0.08	0	0.07
	Yes	-6.92		-6.16		-4.78		-3		-13.0		-13.5	
Peripheral malaria	No	0	0.67	0	0.32	0	0.71	0	0.76	0	0.26	0	0.86
	Yes	1.25		2.87		-1.92		-1.6		-8.23		2.22	
LBW	No	0	0.13	0	0.24	0	0.18	0	0.31	0	0.1	0	0.086
	Yes	4.09		-4.25		-5.08		-3.93		12.95		13.54	

217 At delivery, there was no significant association. Women giving birth to a LBW newborn had
 218 a higher sHLA-G level and women with placental malaria had lower levels, but the
 219 differences were marginally significant ($p=0.086$ and $p=0.07$, respectively) (Table 2).

220

221 Soluble HLA-G during infancy

222 Blood was collected for 373 newborns, 311 with at least three samples. The level was
 223 highest in cord blood, and decreased until 18 months ($p<10^{-3}$) (Figure 2).

224 There was no significant association between gender, birth weight and sHLA-G level.
 225 Mothers' malaria infection (placental or peripheral) was not associated with the children's
 226 sHLA-G level. In contrast, children infected by malaria at least once during the follow-up had
 227 a higher sHLA-G level ($p=0.02$) (Table 3). We identified an interaction between age and LBW
 228 showing that children with LBW had higher sHLA-G levels and a different evolution during
 229 the first 24 months of life ($p=0.06$) (figure 3).

230 **Table 3. Factors associated with sHLA-G level in infancy: regression of Tobit**
 231 **(univariate and multivariate mixed models)**

Covariates		β	p	Adjusted β	p
Gender	M	0	0.51	0	0.44
	F	2.06		2.65	
LBW	No	0	0.29	0	0.25
	Yes	6.001		-10.92	
Fever	No	0	0.98		0.78
	Yes	-0.08		-0.82	
Malaria infection	No	0	0.03	0	0.02
	Yes	7.45		7.92	
Positive CRP	No	0	0.39	-	-
	Yes	2.26		-	
Maternal age	≤ 25 years	0	0.31	0	0.19
	> 25 years	3.23		4.96	
Primigravidity	No	0	0.42	0	0.92
	Yes	-3.47		-0.53	
Ethnicity	Fon	0	0.96	0	0.81

	Others	-0.2		-0.99	
Placental malaria	No	0	0.66	0	0.25
	Yes	2.17		6.34	
Age (months)	0	0		0	
	6	-8.67		-10.16	
	9	-11.69	<u>10⁻³</u>	-14.12	<u>10⁻³</u>
	12	-17.65		-20.25	
	18	-23.07		-26.07	
	24	-22.27		-27.75	
LBW*Age (months) (interaction)	0			0	
	6			7.6	
	9			12.36	<u>0.06</u>
	12			19.04	
	18			31.39	
	24			34.68	

232 *The final multivariate model contains LBW, malaria infection, age and LBW*Age

233

234 Mother/child resemblance

235 As described above, the sHLA-G level in children is correlated with their mother's level.

236 There were a strong correlation ($p < 10^{-3}$) between each mother's cross-sectional

237 measurement and her child's levels throughout the follow-up (Table 4) and an association

238 between the mother's profile and her child's mean sHLA-G level during the follow-up ($p < 10^{-3}$).

239 Children born to a mother with very low profile had the lowest level, whereas children born

240 to a mother with very high profile had the highest mean sHLA-G level.

241 Table 4. Correlation between mothers' and children's levels of soluble HLA-G

242 (Spearman's rho).

Spearman's rho (p)	Cord blood	6 months	9 months	12 months	18 months	24 months
ANV1	0.34 (10 ⁻³)	0.44 (10 ⁻³)	0.40 (10 ⁻³)	0.48 (10 ⁻³)	0.46 (10 ⁻³)	0.48 (10 ⁻³)
ANV2	0.37 (10 ⁻³)	0.36 (10 ⁻³)	0.38 (10 ⁻³)	0.41 (10 ⁻³)	0.39 (10 ⁻³)	0.50 (10 ⁻³)
Delivery	0.39 (10 ⁻³)	0.35 (10 ⁻³)	0.36 (10 ⁻³)	0.39 (10 ⁻³)	0.39 (10 ⁻³)	0.39 (10 ⁻³)

243

244 Using multinomial ordinal models, a mother belonging to a certain profile had a significantly
 245 higher probability of giving birth to a child belonging to the same profile (Figure 4).
 246 Furthermore, the odds ratio for giving birth to a child with a “very high” profile versus all
 247 others was strongly associated with the increase in the mother’s profile ($p < 10^{-3}$). For an
 248 increase in the mother’s profile from “very low” to “low”, this OR was 3.05 (CI95 = [1.75–
 249 5.31]). The OR was 17.59 (CI95 = [9.54–32.41]) for an increase from “very low” to “very high”
 250 (Table 5). The OR for giving birth to a child with a very high profile for a mother with placental
 251 malaria, adjusted on the mother’s profile, was 2.39 [1.29–4.45] compared to a mother without
 252 placental infection (Table 5).

253 **Table 5. Maternal factors associated with the probability to belong to a high sHLA-G**
 254 **profile in infancy: ordinal multinomial regression.**

Variable	OR	95 Confidence interval	<i>P</i>
Mother’s sHLA-G profile*			
Very low	1		
Low	3.05	[1.75–5.31]	$<10^{-3}$
High	8.28	[4.68–14.67]	$<10^{-3}$
Very high	17.59	[9.54–32.41]	$<10^{-3}$
Placental malaria infection			
No	1		
Yes	2.39	[1.29–4.45]	0.006

255 * Odds ratio of giving birth to a child with very high profile for a mother with low, high and very
 256 high profile compared to a mother with a very low profile

257

258 Discussion

259 The present study is the first conducted in an African population describing the physiological
 260 evolution of the sHLA-G level during pregnancy. This work complements a study conducted
 261 in Benin that found a strong correlation between maternal sHLA-G level at delivery and
 262 children’s levels during the first years of life as well as an association between the infant’s
 263 level and LBW and malaria (17). However, in this study mothers were included at delivery
 264 and pregnancy data were not available. Associations between both malaria and LBW and the

265 infant's sHLA-G level were confirmed here. Furthermore, the correlation between the
266 mother's and the child's sHLA-G levels was reinforced since we showed that the child's level
267 throughout the follow-up was correlated with its mother's level at each measurement. Finally,
268 mothers with placental malaria gave birth to children with high sHLA-G profile during infancy.
269 This result is consistent with the fact that the immune tolerance described in case of
270 placental malaria could be correlated with sHLA-G levels and that placental malaria might be
271 considered a marker of a more complex phenomenon involving the tolerogenic molecule
272 HLA-G.

273 The analysis of how the sHLA-G level evolved showed that it remained stable but increased
274 considerably at delivery. In different populations, Hunt *et al.* and Klitkou *et al.* found that the
275 sHLA-G level increased in early pregnancy and decreased later (10, 14). In the first study,
276 the majority of samples were collected during the first trimester and differences in levels
277 during the first, second and third trimesters were not significant (10). Moreover, only 22
278 women out of 129 were sampled more than once. In the second study, sHLA-G levels were
279 significantly higher at 20 GW than at term, after 37 GW, without indicating the time between
280 the last sampling and delivery (14). Another study concluded that sHLA-G level is constant
281 with a peak in the third month (8). However, in this study the sHLA-G levels of pregnant
282 women were compared to non-pregnant women. Nevertheless, the main difference between
283 these previous analyses and our results comes from the population and its behaviour. It has
284 been described that in rural Africa pregnant women reach the maternity clinic late, and most
285 often labour is already advanced (30). Yet, Knafel *et al.* showed that the progression of
286 labour is associated with a continuous and significant increase in the sHLA-G plasma level
287 (31). In 2009, Rizzo *et al.* evaluated the effect of labour on the plasma sHLA-G levels by
288 measuring sHLA-G5 in 43 women at 3 times: during the 3rd trimester, at labour and at 2
289 years postpartum. They found that sHLA-G was significantly increased during labour in
290 comparison with the others times (32). The elevation of the protein could be associated with
291 the stress induced by labour and be part of a cascade reaction leading to foetal expulsion.

292 Another important difference is the genetic origin of the population. It is now accepted that
293 African populations differ from Caucasian populations in their greater genetic diversity and
294 heterogeneity (16), and these differences could influence the variability of sHLA-G levels (15,
295 33, 34). The particular role of HLA-G in immunity and the competing needs to maintain both
296 maternal and foetal immune tolerance and an efficient host immune response make this
297 gene a potential target for selection. This phenomenon has been recently demonstrated in
298 African populations including a Beninese population, highly exposed to multiple infectious
299 agents (35). This multiplicity of exposure to various infections represents another potential
300 difference between our population and Caucasian groups.

301 At the beginning of pregnancy, multigravid women have higher sHLA-G levels than
302 primigravid women and sHLA-G increases gradually with the number of pregnancies (data
303 not shown). It could be that multigravid subjects produce more HLA-G and have a better
304 aptitude for acceptance of semiallogenic foetal tissue. In other studies, a gravidity effect was
305 not found (8, 14), but here again Caucasian and African populations differ since in our study
306 approximately 50% of the women had had at least three pregnancies before the study. The
307 low level of sHLA-G in primigravid women is consistent with the fact that preeclampsia, more
308 prevalent in first-time pregnancies, has been found frequently associated with a decreased
309 level of soluble HLA-G (36).

310 Malaria infection (placental or peripheral) in mothers has no effect on the sHLA-G level
311 throughout pregnancy. This might be due to the substantial increase of sHLA-G in
312 pregnancy, which could result in not detecting a malaria effect. It is noteworthy that pregnant
313 women received two supervised doses of Intermittent Preventive Treatment against malaria,
314 as recommended by WHO in all endemic areas, and that both the incidence of clinical
315 malaria and parasitemia were low, for all IPT groups (24). However, in infancy, the
316 association between high levels of sHLA-G and malaria infection was confirmed. It has
317 recently been shown that not only high levels of sHLA-G could increase the risk of

318 developing a malaria attack, but also that the presence of malaria infection at sampling is
319 associated with high sHLA-G levels (17). During HIV or hepatitis infections, patients have
320 higher sHLA-G levels, and it has been suggested that these levels contribute to immune
321 evasion of virus by inducing immune tolerance (37, 38). We could hypothesize that a similar
322 phenomenon occurs during malaria. *P. falciparum* could upregulate the HLA-G secretion by
323 stimulating cytokines such as IL-10 and IFN- γ , which are well-known HLA-G inducers. HLA-G
324 inhibits the function of T, NK, dendritic cells, neutrophils and B cells through direct interaction
325 with ILT2 and/or ILT4 receptors. Notably, sHLA-G is a negative regulator of B cells leading to
326 antibody secretion inhibition in a mouse model (39). It has long been recognized that
327 antibodies play a pivotal role in anti-malarial protection (40). Consequently, the inhibition of
328 IgG specifically directed against *P. falciparum* mediated by HLA-G may allow the parasite to
329 escape the immune system and be responsible for higher susceptibility to infection. We have
330 shown recently that high level of sHLA-G is associated with a higher probability to develop a
331 malaria attack in the following weeks but also that the presence of malaria infection can
332 increase sHLA-G that could lead to immune evasion (17, 41). Overall, the results underline
333 the complexity of the association between HLA-G and malaria and need further experimental
334 exploration.

335 The association between HLA-G and LBW shows that the evolution of sHLA-G during the
336 first 2 years of life strongly differs between LBW children and others. LBW is correlated with
337 infants' morbidity and mortality (18, 19) and this result is consistent with our previous finding
338 that some children could have particular trajectory of sHLA-G during infancy (41). The
339 present result strengthens the hypothesis that the susceptibility of LBW children to infections
340 could be associated with high sHLA-G levels (17), and that infants with LBW could have a
341 particular mechanism of HLA-G regulation.

342 Our results also confirmed the strong correlation between the mother's sHLA-G levels at
343 delivery and the cord blood level (17). Comparable findings were described by Klitkou *et al.*,

344 even though the sHLA-G level in cord blood was lower than at term (14). However, since
345 repeated measurements were available for both women and infants, mother/child
346 resemblance was explored more precisely. It was shown that not only does a mother/child
347 correlation exist at delivery, but also that each mother's measurement was correlated with
348 each measurement in her child. Moreover, it was also demonstrated that a mother
349 harbouring a sHLA-G profile during pregnancy has a higher probability of giving birth to a
350 child with a similar profile. This kind of resemblance could obviously be due to a shared
351 family environment and behaviour. However, a genetic or epigenetic origin must also be
352 discussed. Indeed, even though the genetic control of sHLA-G secretion is complex (15, 33),
353 it has recently been shown that there is an association between combined feto-maternal
354 HLA-G genotypes and the sHLA-G level (42).

355 Mother/child resemblance could have consequences from a public health point of view. If it is
356 confirmed that high levels of sHLA-G are associated with LBW and a higher risk for malaria
357 (or more generally for infections), the mother's sHLA-G level during pregnancy could be a
358 useful biomarker of frailty in children before delivery.

359 It is accepted that children born from placental malaria are more susceptible to malaria
360 during infancy, suggesting that this could stem from immune tolerance (21, 43, 44). Such
361 children are not only more susceptible to malaria but also to non-malaria fevers (45),
362 emphasizing the fact that immune tolerance could imply immunity in a more general manner
363 besides specific immunity to malaria. In that sense, placental malaria could just be a
364 biomarker of this more complex phenomenon. These results, showing that mothers with
365 placental malaria have a significant probability of giving birth to a newborn with high levels of
366 sHLA-G during infancy, possibly making the child more susceptible to infections, strongly
367 support this hypothesis and could have important consequences from a public health point of
368 view.

369

370 **Acknowledgements**

371 We are grateful to all the women who participated in the study. We thank village community
372 agents who participated actively in the medical and follow-up surveys. We are also very
373 grateful to the technicians, nurses, drivers, and students from the program and from the two
374 dispensaries where the study took place.

375

376 **Funding**

377 This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (project
378 2006/040/001), Programa Ciência sem Fronteiras « Pesquisador Visitante Especial » (grant
379 406594/2013-9) and iDEX Sorbonne Paris Cité « mobilité internationale Brésil 2015 ». Tania
380 C d'Almeida was partly supported by grants from « Fondation pour la Recherche Médicale »
381 (Grant FDM20130727043) and by Institut de Recherche pour le Développement (IRD). The
382 clinical trial in which the study was nested was funded by the European Developing
383 Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP; IP.2007.31080.002), the Malaria in Pregnancy
384 Consortium.

385

386 **Potential conflicts of interest**

387 The authors have declared that no competing interests exist..

388

389 **References**

390 1. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Roux DT, Moreau P, LeMaout J. HLA-G: An Immune
391 Checkpoint Molecule. *Advances in immunology*. 2015;127:33-144.

- 392 2. Carosella ED, Gregori S, Rouas-Freiss N, LeMaoult J, Menier C, Favier B. The role of
393 HLA-G in immunity and hematopoiesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
394 2011;68(3):353-68.
- 395 3. Bahri R, Hirsch F, Josse A, Rouas-Freiss N, Bidere N, Vasquez A, et al. Soluble HLA-
396 G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *Journal of*
397 *Immunology*. 2006;176(3):1331-9.
- 398 4. Baudhuin J, Migraine J, Faivre V, Loumagne L, Lukaszewicz AC, Payen D, et al.
399 Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *P Natl*
400 *Acad Sci USA*. 2013;110(44):17957-62.
- 401 5. Lesport E, Baudhuin J, LeMaoult J, Sousa S, Doliger C, Carosella ED, et al. Human
402 melanoma cell secreting human leukocyte antigen-G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by
403 impairing lytic granules polarization toward target cell. *Human immunology*.
404 2009;70(12):1000-5.
- 405 6. Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED.
406 Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence
407 for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *Am J Reprod Immunol*.
408 1998;40(3):136-44.
- 409 7. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence
410 to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer
411 cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
412 1997;94(21):11520-5.
- 413 8. Alegre E, Diaz-Lagares A, Lemaoult J, Lopez-Moratalla N, Carosella ED, Gonzalez A.
414 Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy:
415 longitudinal study during pregnancy. *Human immunology*. 2007;68(8):661-7.
- 416 9. Yie SM, Taylor RN, Librach C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early
417 gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *American journal of*
418 *obstetrics and gynecology*. 2005;193(1):204-8.

- 419 10. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in
420 maternal blood during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*.
421 2000;183(3):682-8.
- 422 11. Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H. Rapid
423 evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. *Hum*
424 *Immunol*. 2007;68(4):251-8.
- 425 12. Rizzo R, Fuzzi B, Stignani M, Criscuoli L, Melchiorri L, Dabizzi S, et al. Soluble HLA-
426 G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF? *Journal of reproductive*
427 *immunology*. 2007;74(1-2):133-42.
- 428 13. He Y, Chen S, Huang H, Chen Q. Association between decreased plasma levels of
429 soluble human leukocyte antigen-G and severe pre-eclampsia. *Journal of perinatal medicine*.
430 2015.
- 431 14. Klitkou L, Dahl M, Hviid TVF, Djuricic S, Piosik ZM, Skovbo P, et al. Human leukocyte
432 antigen (HLA)-G during pregnancy part I: Correlations between maternal soluble HLA-G at
433 midterm, at term, and umbilical cord blood soluble HLA-G at term. *Human immunology*.
434 2015;76(4):254-9.
- 435 15. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of
436 the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association.
437 *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(3):369-95.
- 438 16. Campbell MC, Tishkoff SA. African genetic diversity: implications for human
439 demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. *Annual review*
440 *of genomics and human genetics*. 2008;9:403-33.
- 441 17. Sadissou I, d'Almeida T, Cottrell G, Luty A, Krawice-Radanne I, Massougbodji A, et
442 al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased
443 risk of malaria in infancy. *Malaria Journal*. 2014;13.
- 444 18. Ntuli ST, Malangu N, Alberts M. Causes of deaths in children under-five years old at a
445 tertiary hospital in Limpopo province of South Africa. *Glob J Health Sci*. 2013;5(3):95-100.

- 446 19. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why?
447 Lancet. 2005;365(9462):891-900.
- 448 20. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyeme M, et al. Maternal
449 placental infection with Plasmodium falciparum and malaria morbidity during the first 2 years
450 of life. American journal of epidemiology. 1997;146(10):826-31.
- 451 21. Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouedraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, et al.
452 Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and
453 environmental factors. PloS one. 2011;6(11):e27516.
- 454 22. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, et al. Maternal malaria
455 and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. PLoS medicine.
456 2005;2(12):e407.
- 457 23. Ouedraogo S, Koura GK, Bodeau-Livinec F, Accrombessi MM, Massougbodji A, Cot
458 M. Maternal anemia in pregnancy: assessing the effect of routine preventive measures in a
459 malaria-endemic area. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(2):292-300.
- 460 24. Gonzalez R, Mombo-Ngoma G, Ouedraogo S, Kakolwa MA, Abdulla S, Accrombessi
461 M, et al. Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with mefloquine in HIV-
462 negative women: a multicentre randomized controlled trial. Plos Med. 2014;11(9):e1001733.
- 463 25. Rebmann V, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H. Report of
464 the Wet Workshop for Quantification of soluble HLA-G in Essen, 2004. Hum Immunol.
465 2005;66(8):853-63.
- 466 26. Menier C, Saez B, Horejsi V, Martinozzi S, Krawice-Radanne I, Bruel S, et al.
467 Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: New tools to
468 analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. Hum Immunol.
469 2003;64(3):315-26.
- 470 27. Amemiya T. Regression analysis when the dependent variable is truncated normal.
471 Econometrica. 1973;41:997-1016.

- 472 28. Wang W, Griswold ME. Natural interpretations in Tobit regression models using
473 marginal estimation methods. *Statistical methods in medical research*. 2015.
- 474 29. McCulloch CE, Conference Board of the Mathematical Sciences., National Science
475 Foundation (U.S.). *Generalized linear mixed models*. Beachwood, Ohio
476 Alexandria, Va.: Institute of Mathematical Statistics ;
477 American Statistical Association; 2003. viii, 84 p. p.
- 478 30. Thaddeus S, Maine D. Too Far to Walk - Maternal Mortality in Context. *Soc Sci Med*.
479 1994;38(8):1091-110.
- 480 31. Knafel A, Basta P, Pitynski K, Mach P, Bednarek W, Klimek M, et al. Soluble HLA-G
481 changes in maternal blood serum during the progression of labor. *Neuroendocrinol Lett*.
482 2009;30(1):67-73.
- 483 32. Rizzo R, Stignani M, Amoudruz P, Nilsson C, Melchiorri L, Baricordi O, et al. Allergic
484 women have reduced sHLA-G plasma levels at delivery. *Am J Reprod Immunol*.
485 2009;61(5):368-76.
- 486 33. Porto IO, Mendes-Junior CT, Felicio LP, Georg RC, Moreau P, Donadi EA, et al.
487 MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for
488 microRNAs with potential to regulate HLA-G. *Molecular immunology*. 2015;65(2):230-41.
- 489 34. Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC,
490 Massaro JD, et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are
491 associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS*
492 *one*. 2013;8(10):e71742.
- 493 35. Gineau L, Luisi P, Castelli EC, Milet J, Courtin D, Cagnin N, et al. Balancing immunity
494 and tolerance: genetic footprint of natural selection in the transcriptional regulatory region of
495 HLA-G. *Genes Immun*. 2014;16(1):57-60.

496 36. He YD, Chen S, Huang H, Chen Q. Association between decreased plasma levels of
497 soluble human leukocyte antigen-G and severe pre-eclampsia. *J Perinat Med.*
498 2016;44(3):283-90.

499 37. Weng PJ, Fu YM, Ding SX, Xu DP, Lin A, Yan WH. Elevation of plasma soluble
500 human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol.*
501 2011;72(5):406-11.

502 38. Celsi F, Catamo E, Kleiner G, Tricarico PM, Vuch J, Crovella S. HLA-G/C, miRNAs,
503 and their role in HIV infection and replication. *Biomed Res Int.* 2013;2013:693643.

504 39. Naji A, Menier C, Morandi F, Agaoglu S, Maki G, Ferretti E, et al. Binding of HLA-G
505 to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. *J Immunol.*
506 2014;192(4):1536-46.

507 40. Bouharountayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P.
508 Antibodies That Protect Humans against Plasmodium-Falciparum Blood Stages Do Not on
509 Their Own Inhibit Parasite Growth and Invasion In vitro, but Act in Cooperation with
510 Monocytes. *J Exp Med.* 1990;172(6):1633-41.

511 41. d'Almeida TC, Sadissou I, Cottrell G, Tahar R, Moreau P, Favier B, et al. Evolution of
512 the levels of human leukocyte antigen G (HLA-G) in Beninese infant during the first year of
513 life in a malaria endemic area: using latent class analysis. *Malaria J.* 2016;15.

514 42. Dahl M, Klitkou L, Christiansen OB, Djuricic S, Piosik ZM, Skovbo P, et al. Human
515 leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy part II: associations between maternal and fetal
516 HLA-G genotypes and soluble HLA-G. *Hum Immunol.* 2015;76(4):260-71.

517 43. Schwarz NG, Adegnik AA, Breitling LP, Gabor J, Agnandji ST, Newman RD, et al.
518 Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. *Clin Infect Dis.*
519 2008;47(8):1017-25.

520 44. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li XH, Fried M, et al. Maternal malaria
521 and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *Plos Med.* 2005;2(12):1260-8.

522 45. Rachas A, Le Port A, Cottrell G, Guerra J, Choudat I, Bouscaillou J, et al. Placental
523 Malaria is Associated With Increased Risk of Nonmalaria Infection During the First 18
524 Months of Life in a Beninese Population. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(5):672-8.

525

526 **Figure captions**

527 **Figure 1. Mean soluble HLA-G level in pregnancy.**

528 **Figure 2. Mean soluble HLA-G level in infancy ($p < 10^{-3}$).**

529 **Figure 3. Predicted evolution of sHLA-G from birth to 24 months for low birth weight**
530 **versus normal birth weight children.**

531 **Figure 4. Mother/child resemblance: probability of newborn to have a profile according**
532 **to the mother profile.**

533

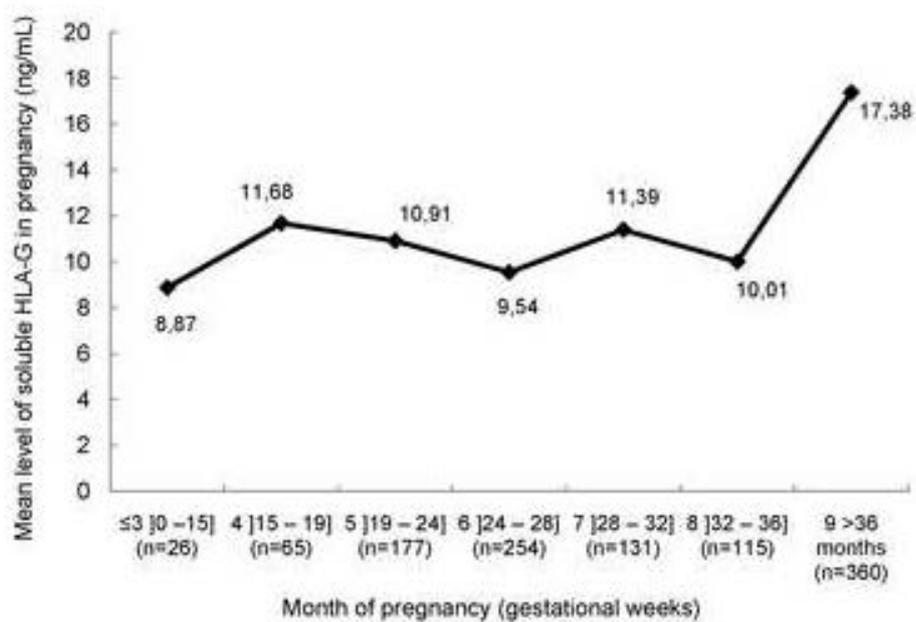


Figure 1: Mean soluble HLA-G level in pregnancy

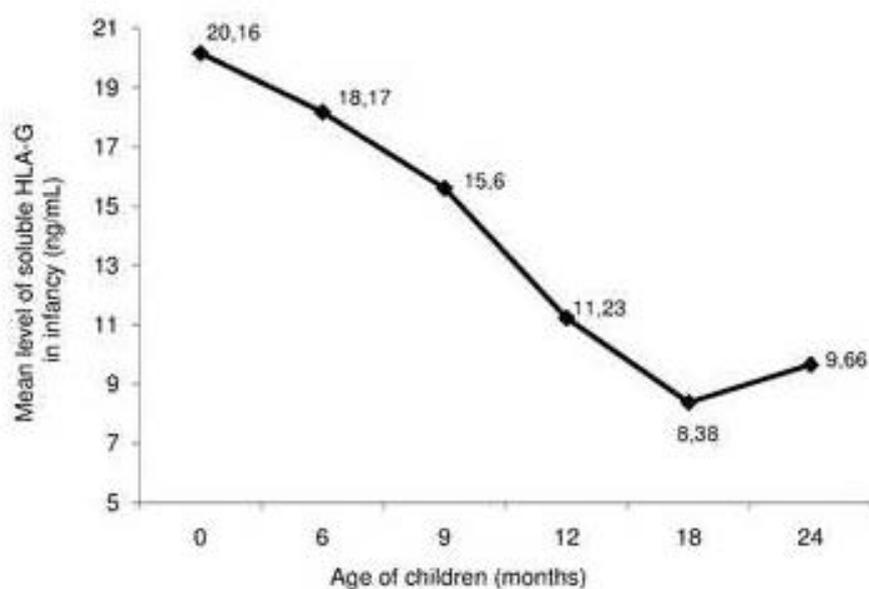


Figure 1: Mean soluble HLA-G level in infancy ($p < 10^{-3}$)

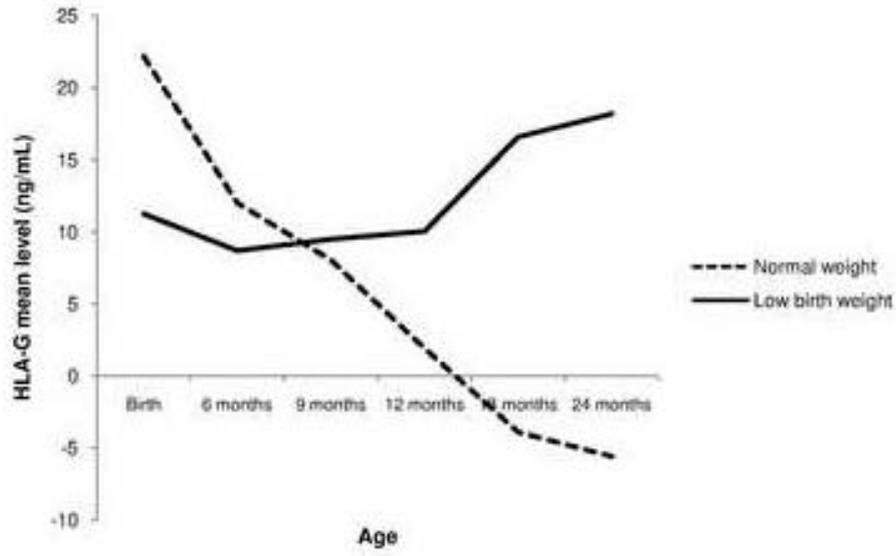
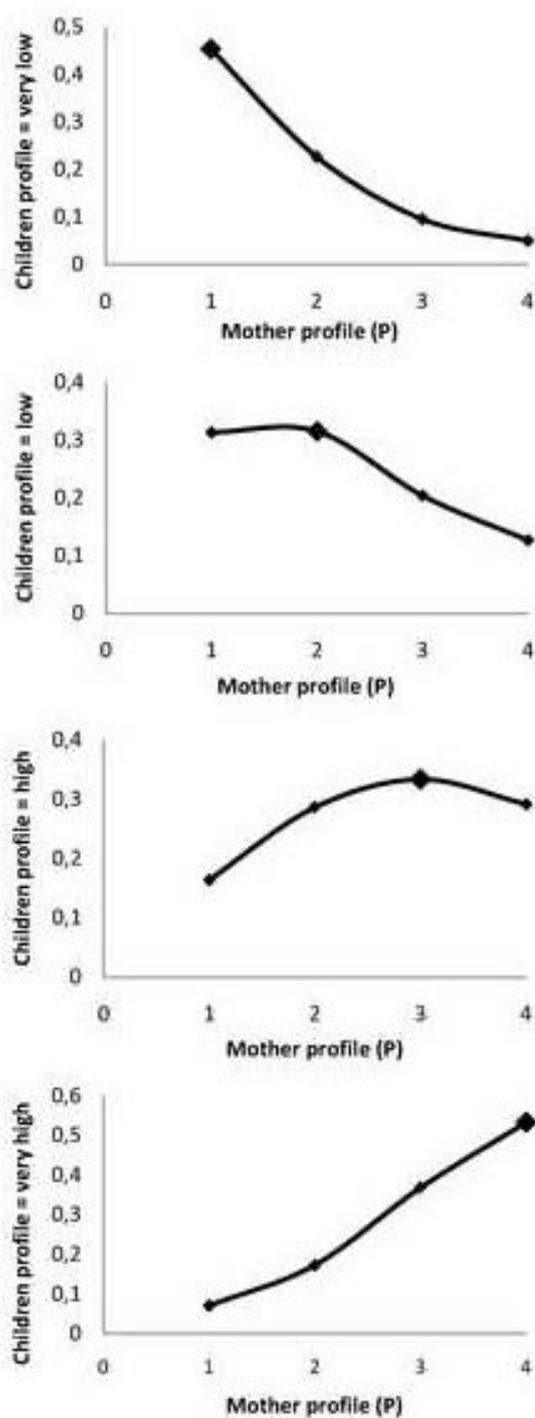


Figure 3: Predicted evolution of sHLA-G from birth to 24 months for low birth weight versus normal birth weight children



Chapitre 3 : Discussion

Les objectifs de ce travail étaient, d'une part d'étudier l'évolution de HLA-G soluble au cours de la grossesse et chez l'enfant au cours des premières années de vie et les différents facteurs associés et, d'autre part de poursuivre l'étude de l'association entre la molécule HLA-G et le paludisme. Dans cette dernière partie, nous allons tout d'abord résumer les principaux résultats obtenus de nos deux études, puis après une comparaison des deux études et de certains points de méthodologies, nous discuterons les principaux résultats.

Certains de nos résultats concernant l'accouchement et le jeune enfant sont cohérents entre nos deux études et peuvent être résumés indépendamment de l'étude. Ceux concernant l'évolution de HLA-G soluble au cours de la grossesse ne concernent que la seconde cohorte avec le suivi des femmes enceintes. Enfin les résultats sur les ressemblances mères et enfants au moment de l'accouchement sont issus des deux études mais la seconde cohorte a permis de pousser l'exploration en s'intéressant à cette ressemblance entre le niveau des mères au cours de la grossesse et celui des enfants pendant deux années.

Chez les enfants, malgré une évolution différente, nous montrons une association entre le niveau de HLA-G et l'infection palustre d'une part et le faible poids de naissance d'autre part. Dans les deux cas ces associations vont dans le sens de niveaux plus élevés de HLA-G en cas de paludisme et en cas de faible poids de naissance. Nos résultats sur la première étude montrent la complexité de l'association avec le paludisme et sont compatibles avec l'hypothèse qu'il existe différents groupes d'enfants avec des évolutions particulières. Dans les deux études nous ne mettons pas

en évidence d'association directe entre l'infection palustre placentaire et le niveau de HLA-G soluble chez la mère pendant la grossesse ou chez l'enfant. Par contre, dans la seconde étude nous montrons que les femmes avec une infection placentaire donnent plus volontiers naissance à des enfants avec des profils de HLA-G élevé durant les 2 premières années de vie. Ces résultats soulignent la complexité de cette relation sur laquelle nous reviendrons. La ressemblance entre les niveaux de HLA-G solubles des mères et des nouveau-nés à l'accouchement est confirmée dans les deux études et, de plus, nous montrons dans la seconde cohorte que cette ressemblance mère-enfant concerne également les niveaux de la mère au cours de la grossesse et ceux de son enfant durant ses 2 premières années de vie. Enfin, nous mettons en évidence qu'un niveau élevé de HLA-G soluble en début de grossesse est associé avec un délai de survenu d'un premier accès palustre plus court chez l'enfant.

Avant de discuter ces résultats, nous allons nous intéresser à la comparaison des deux études en termes de population et de protocole de suivi.

1. Comparaison des deux études et méthodes d'analyses

La première étude réalisée à Tori-Bossito a consisté en un suivi de 165 femmes enceintes et de leurs enfants pendant 12 mois. La deuxième étude, quant à elle s'est déroulée à Allada et a permis le suivi de 400 femmes enceintes et de leurs enfants de 0 à 2 ans.

Elles se sont déroulées dans deux communes voisines ayant de fortes ressemblances en termes de transmission palustre avec un même indice d'inoculation

entomologique. Cependant, les caractéristiques et le déroulement des études diffèrent en plusieurs points :

- les femmes enceintes dans l'étude Tori-Bossito étaient recrutées au moment de l'accouchement et n'ont été vues qu'à cette seule visite dans l'étude. Toutes les données relatives au déroulement de la grossesse n'ont donc pas pu être collectées. Certaines informations, telles que la prise de médicaments (TPI) ont pu être renseignées de manière déclarative. Par contre, l'information n'était pas disponible à propos des pathologies survenues au cours de la grossesse, notamment les infections palustres et aucun prélèvement n'a pu être fait avant l'accouchement. Dans l'étude Tolimmunpal, les femmes étaient incluses en début de grossesse pour la plupart et suivies jusqu'à l'accouchement. Le déroulement de la grossesse était résumé en trois visites principales au cours desquelles une infection palustre a été recherchée. En cas de survenue d'un problème de santé entre ces différentes visites les femmes étaient vues en consultations.
- Le suivi des enfants n'était pas non plus le même. Dans la première étude, le suivi était actif durant 12 mois avec 5 principales visites systématiques (0, 3, 6, 9, 12 mois) et des visites mensuelles intermédiaires avec une recherche systématique d'infection palustre. En plus de ce suivi les enfants étaient vus une fois par semaine par des relais communautaires qui contrôlaient systématiquement la température à la recherche d'une infection. Un test de diagnostic rapide (TDR) était fait en cas de température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$. Dans la deuxième étude, le suivi est plus long, étalé sur 24 mois, mais les données n'ont pas été collectées de la même manière sur l'ensemble du suivi. Au cours de la première année, 4 visites systématiques étaient prévues (0, 6, 9 et 12

mois) et il n'y a pas eu de visite 3 mois après la naissance. Les enfants étaient suivis uniquement passivement en consultation en cas de problème de santé. A partir du douzième mois, le suivi s'intensifie avec en plus de 2 nouvelles visites systématiques (18 et 24 mois) des visites bimensuelles. Au cours de ces visites, une recherche active de paludisme par contrôle systématique de température était effectuée et un TDR réalisé en cas de température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$. Une fois par mois une goutte épaisse était réalisée de manière systématique. Le suivi au cours de la deuxième année dans l'étude Tolimmunpal est semblable à celui de la première année dans l'étude Tori-Bossito.

Ces différences de suivi, imposées par le protocole de l'essai clinique MIPPAD, ont-elles pu entraîner des biais ? Dans la mesure où ces différences concernaient l'ensemble des enfants de cette cohorte et n'étaient pas ciblées sur une caractéristique particulière nous ne pensons pas que nos résultats présentent de biais systématique. D'autre part la similitude des résultats concernant l'association entre HLA-G soluble et le paludisme nous conforte dans ce sentiment. Enfin, la variable modélisant le risque entomologique de transmission du paludisme était disponible dans les deux études et pour tous les enfants. Dans la mesure où cette variable était très fortement associée au risque de paludisme nous pensons que son utilisation a permis de compenser les probables infections passées au travers de notre surveillance, y compris lorsque celle-ci était très active (Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012, Dechavanne, Sadissou et *al.* 2016). Par contre, le résultat obtenu sur le délai de première infection (modèle de Cox) est peut-être influencé par le changement des modalités de suivi de la seconde cohorte à partir du 12^{ième} mois de vie.

- En dehors du suivi, une autre différence se situe dans la constitution des échantillons. L'échantillon de Tori-Bossito, constitué de 165 couples mère/enfant, comporte un tiers de femmes ayant une infection palustre placentaire à l'accouchement avec pour chacune deux témoins n'ayant pas d'infection placentaire. La proportion d'infection placentaire, très élevée par rapport à celle en population générale fait que cet échantillon reste particulier et non représentatif de la population générale. Il offre par contre une très bonne population pour l'étude de l'effet de l'infection placentaire sur HLA-G. Ici encore la similitude des résultats entre les deux cohortes nous confortent quant à nos conclusions, même si, comme nous le verrons plus tard l'association entre infection placentaire et HLA-G est probablement très complexe. Par contre l'étude Tolimmunpal était constituée d'un plus grand nombre d'individus et ses caractéristiques se rapprochent beaucoup plus de celles de la population générale.

Le dernier point sur lequel diffèrent ces deux études dans notre travail, repose sur les méthodes d'analyses et les modèles utilisés. Différentes approches ont été utilisées pour les analyses. Nous ne reprendrons pas ici toutes les méthodes notamment les plus classiques mais nous allons revenir sur certains choix que nous avons faits comme par exemple celui d'une analyse en classe latente.

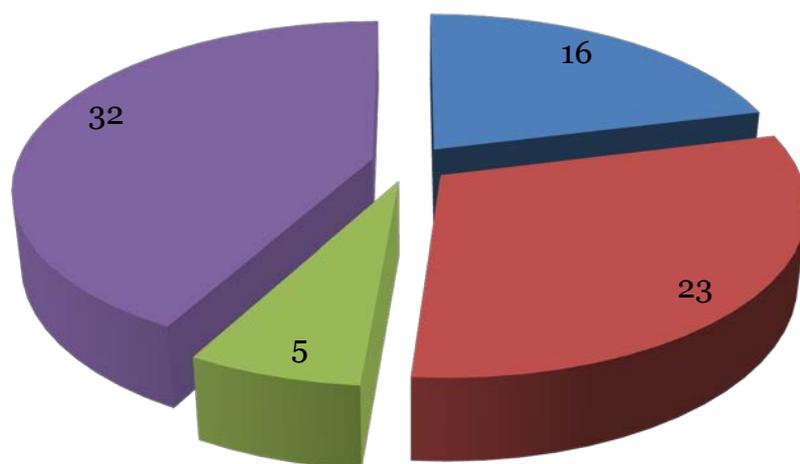
Qu'apporte cette stratégie d'analyse par rapport aux modèles mixtes ? i) L'analyse par classes latentes est une approche qui permet d'identifier au sein d'une population des individus qui partagent des caractéristiques et de les répartir en plusieurs groupes. Ainsi les individus au sein d'une trajectoire se ressemblent plus entre eux qu'ils ne ressemblent aux individus d'une autre trajectoire. Cependant, nous restons dans le domaine des statistiques, et il n'est pas raisonnable de parler de groupes « distincts »

qui pourraient être définitivement « caractérisés » précisément en se basant sur certains caractères, chaque enfant ayant une probabilité d'appartenir à l'une et à l'autre des classes. Cette méthodologie est largement utilisée en criminologie, en psychiatrie, en économie (Barker, Seguin et *al.* 2007, Bernat, Erickson et *al.* 2008, Hoeve, Blokland et *al.* 2008). La sélection du nombre de trajectoires dans ce type d'analyse n'est pas du tout subjective et a reposé en un premier temps dans notre cas sur des critères statistiques (le BIC), le pourcentage de sujets dans chaque trajectoire et la stabilité des groupes après introduction des covariables. ii) cette méthode permet également d'étudier si l'effet d'une covariable est identique ou non au sein de chaque trajectoire, un effet différent traduisant en quelque sorte une interaction entre cette variable et le groupe d'appartenance. Ici nous ne montrons pas ce type d'interaction. iii) Une autre différence entre cette méthode et les modèles mixtes est la possibilité d'étudier l'effet prédictif d'un certain nombre de variables sur la probabilité d'appartenir à l'une ou l'autre des trajectoires identifiées. Dans notre analyse nous avons montré que le niveau de HLA-G dans le sang de cordon était prédictif de l'appartenance des enfants à la classe la plus haute ou intermédiaire par rapport à la classe basse. Ces différents résultats soulignent que l'analyse par classes latentes présente certains avantages par rapport aux modèles hiérarchiques mixtes.

Dans la seconde cohorte nous avons procédé chez les femmes enceintes à des analyses transversales pour l'étude des facteurs associés au niveau de HLA-G soluble au cours de la grossesse. L'alternative à ce choix d'analyse aurait été un modèle mixte prenant en compte la non indépendance des données chez une même femme. Étant donné les aspects très particuliers de ces visites (administration du TPI et d'autres soins) et surtout le fait qu'elles survenaient parfois à des moments de la grossesse très différents d'une femme à l'autre pour une même visite (les visites TPI1 et TPI2

s'étalent selon les femmes sur plusieurs semaines) n'est pas physiologiquement anodin pour une femme enceinte. Nous avons donc décidé de considérer ces passages de manière transversale. Le choix d'une régression de Tobit nous a malgré tout permis de tenir compte de la nature censurée de la variable « niveau de HLA-G », censure en lien avec le seuil de détection de la méthode de dosage. Chez les enfants, le même modèle de Tobit a été utilisé mais cette fois-ci un modèle mixte a été utilisé.

Il est classique et inévitable dans ce genre d'étude longitudinale longue d'avoir des perdus de vue et des données manquantes. Dans la première étude, il n'y avait quasiment pas de données manquantes, ce qui n'a pas été le cas de la seconde cohorte. Chez les mères de cette cohorte, la majorité des données a été enregistrée et seulement 6% de données manquaient. Chez les enfants par contre, elles étaient plus nombreuses. A la fin de la première année, 76 enfants étaient sortis de l'étude Tolimmunpal pour diverses raisons présentées sur la Figure 33. Nous avons comparé les caractéristiques des individus concernés à celles de l'échantillon de départ (Tableau 21). Dans ce sous-échantillon sorti d'étude à 12 mois, les caractéristiques sont comparables à celle de l'échantillon de départ, mais la proportion de l'infection placentaire est plus faible (6,7% contre 10,7%) alors que la proportion de faible poids de naissance est plus importante (13,3% versus 9%). Cette diminution de la prévalence de FPN pourrait intervenir dans l'effet de cette variable sur le niveau de HLA-G que nous mettons en évidence dans cette cohorte. Nous en reparlerons. A la dernière visite de 24 mois, 189 enfants étaient absents. Mais malgré cette absence, les enfants ne sont pas totalement exclus des analyses et les données des visites qu'ils ont réalisées sont prises en compte dans nos analyses.



■ Décès ■ Migration ou déménagement ■ Perdus de vue ■ Refus

Figure 33 : Répartition des enfants sortis de l'étude Tolimmupal après 12 mois de suivi

Tableau 21 : Comparaison des caractéristiques des enfants perdus de vue à 12 mois dans l'étude Tolimmunpal à l'échantillon de départ

Population	Variabes	Caractéristiques des sorties d'études à 12 mois (n=76)	Caractéristiques de l'échantillon total (n=400)
Mères (75)	Âge (années)	25,2 (écart-type = 4,8)	25,9 (écart-type = 5,4)
	Gestité	Primigestes : 11 (14,7%)	Primigestes : 63 (15,75%)
		Mutligestes : 64 (85,3%)	Mutligestes : 337 (84,25%)
	Infection placentaire	Oui : 5 (6,7%)	Oui : 43 (10,7%)
		Non : 70 (93,3%)	Non : 353 (88,25%) Non renseigné : 2
	Ethnies	Aizo : 59 (78,7%)	Aizo : 278 (69,5%)
		Fon : 7 (9,3%)	Fon : 83 (20,75%)
		Autres : 9 (12%)	Autres : 39 (9,75%)
	Schéma du TPI	SP : 33 (44%)	SP : 138 (34,5%)
		MQFD : 22 (29,3%)	MQFD : 142 (35,5%)
MQSD : 20 (26,7%)		MQSD : 120 (20,0%)	
HLA-G à CPN1	10,6 ng/ml (écart-type : 17,08)	10,1 ng/mL (écart-type : 13,6)	
HLA-G à CPN2	9,6 ng/ml (écart-type : 15,5)	10,6 ng/mL (écart-type : 14,0)	
HLA-G accouchement	13,6 ng/ml (écart-type : 16,2)	17,3 ng/mL (écart-type : 34,6)	
Enfants (75)	Poids de naissance (g)	3019,7 g (écart-type : 540,8)	3033,9 (écart-type : 420,4)
	Faible poids de naissance	Oui : 13,3% (10)	Oui : 9,0% (36)
		Non : 86,7% (65)	Non : 91,0% (364)
Sexe	Filles : 56% (42)	Filles : 53,0% (88)	
	Garçons : 44% (33)	Garçons : 47,0% (77)	

Tableau 22 : Comparaison des caractéristiques des enfants perdus de vue à 24 mois dans l'étude Tolimmunpal à l'échantillon de départ

Population	Variabiles	Caractéristiques des sorties d'études à 24 mois (n=189)	Caractéristiques de l'échantillon total (n=400)
Mères (189)	Âge (années)	25,2 (écart-type = 5,2)	25,9 (écart-type = 5,4)
	Gestité	Primigestes : 34 (18,0%)	Primigestes : 63 (15,75%)
		Mutligestes : 155 (82,0%)	Mutligestes : 337 (84,25%)
	Infection placentaire	Oui : 21 (11,2%)	Oui : 43 (10,7%)
		Non : 166 (88,8%)	Non : 353 (88,25%)
		Non renseigné : 2	Non renseigné : 2
	Ethnies	Aizo : 129 (68,2%)	Aizo : 278 (69,5%)
		Fon : 40 (21,2%)	Fon : 83 (20,75%)
		Autres : 20 (10,6%)	Autres : 39 (9,75%)
	Schéma du TPI	SP : 69 (36,5%)	SP : 138 (34,5%)
		MQFD : 61 (32,3%)	MQFD : 142 (35,5%)
MQSD : 59 (31,2%)		MQSD : 120 (20,0%)	
HLA-G à CPN1	9,8 ng/ml (écart-type : 14,1)	10,1 ng/mL (écart-type : 13,6)	
HLA-G à CPN2	10,4 ng/ml (écart-type : 13,9)	10,6 ng/mL (écart-type : 14,0)	
HLA-G accouchement	16,9 ng/ml (écart-type : 30,22)	17,3 ng/mL (écart-type : 34,6)	
Enfants (189)	Poids de naissance (g)	3029,4 g (écart-type : 470,4)	3033,9 (écart-type : 420,4)
	Faible poids de naissance	Oui : 11,2% (21)	Oui : 9,0% (36)
		Non : 88,8% (167)	Non : 91,0% (364)
Sexe	Filles : 53,9% (102)	Filles : 53,0% (88)	
	Garçons : 46,1% (87)	Garçons : 47,0% (77)	

2. Évolution de HLA-G soluble au cours de la grossesse

L'analyse de l'évolution de HLA-G au cours de la grossesse a montré que le niveau de HLA-G soluble ne variait pas jusqu'à 8 mois puis augmentait considérablement au cours du 9^{ème} mois de grossesse. Plusieurs auteurs ont analysé le comportement de la molécule HLA-G soluble au cours de la grossesse, en comparaison généralement avec des femmes non enceintes. La première étude analysant la présence de HLA-G au cours de la grossesse a été réalisée en 2000 par Hunt et *al.* (Hunt, Jadhav et *al.* 2000). Dans cette étude comparant 102 femmes enceintes à 44 femmes non enceintes, il a été montré que le niveau de HLA-G soluble dans le sérum augmentait chez la femme enceinte en début de grossesse par rapport aux femmes non enceintes, et que ce niveau restait stable au cours des trois trimestres de la grossesse. Ce résultat a été obtenu sur 129 prélèvements avec seulement 17 femmes prélevées deux fois et 5 femmes prélevées pendant les trois trimestres. En plus de cela, le nombre de prélèvements variait d'un trimestre à l'autre, 79 au premier, 14 au second et 36 au troisième trimestre. Toutefois, une analyse longitudinale complémentaire a été réalisée chez 22 femmes avec des mesures répétées à chaque trimestre de grossesse et semblait confirmer une évolution stable au cours de la grossesse. Il faut noter que dans cette étude, l'isoforme de HLA-G soluble identifiée était HLA-G2, et l'étude incluait des femmes diabétiques, facteurs pouvant expliquer les divergences observées.

Une autre étude faite en 2004, et comparant 21 femmes enceintes à 16-20 semaines d'aménorrhée et 19 femmes à terme ayant subi une césarienne montre que le niveau de HLA-G soluble semblait diminuer en fin de grossesse dans le sérum mais cette

différence n'était pas significative ($0,266 \pm 0,157$ versus $0,205 \pm 0,120$ unités OD ; $p = 0,193$) (Hackmon, Hallak et *al.* 2004). Seul le dosage de la forme HLA-G1 soluble avait été réalisé dans ce travail.

En 2009, Alegre et *al.* ont évalué l'évolution mensuelle du niveau de HLA-G soluble plasmatique au cours de la grossesse (Alegre, Diaz-Lagares et *al.* 2007). Dans ces travaux effectués chez 8 femmes enceintes, et qui semblent se rapprocher des nôtres dans la méthodologie, les auteurs décrivent une augmentation significative du niveau de HLA-G soluble dans le plasma au cours du troisième mois de grossesse (84 ng/mL, écart interquartile : 33-118 ng/ml) par rapport au deuxième mois (63 ng/mL, écart interquartile : 16-85 ng/ml) ($p < 0,05$), et ce niveau resterait inchangé par la suite. Mais bien que les isoformes de HLA-G solubles mesurés dans cette étude soient de même type que dans nos études et que les dosages soient tous plasmatiques, on remarque des niveaux moyens plus élevés. Cette différence pourrait clairement s'expliquer par la très faible taille de l'échantillon, et la variabilité inter-individuelle importante. Il existe en effet également une grande variabilité des niveaux de HLA-G soluble entre les différentes femmes au cours de la grossesse et cette variabilité est retrouvée dans notre étude. Par ailleurs, notons que les dosages ont été réalisés jusqu'à 37 SA alors que dans notre étude, les prélèvements ont souvent été effectués une fois le travail débuté, autour de 40 SA (âge gestationnel moyen = 40,5 ; écart-type = 2,9).

L'étude la plus récente comparant la progression des niveaux de HLA-G dans le plasma (HLA-G1 et HLA-G5) au cours de la grossesse a été réalisée en 2015 dans une population d'environ 250 femmes enceintes (Klitkou, Dahl et *al.* 2015). Deux dosages ont été effectués à 20 SA et à terme précisément au moment de l'accouchement. Le niveau de HLA-G soluble plasmatique à terme était inférieur au niveau moyen

mesuré à 20 SA : 66 U/ml (étendue : 14-802) versus 106U/ml (étendue : 27-646), $p < 0,001$.

Globalement, dans toutes ces études, l'évolution de HLA-G au cours de la grossesse semble tantôt stable, tantôt décroissante à terme, et l'augmentation à l'accouchement n'est pas retrouvée. Cette particularité de notre étude serait probablement liée aux différences de comportements au sein des populations. En effet, nos travaux ont été réalisés en zone rurale ou semi-rurale, où il est commun que pour accoucher les femmes se rendent tardivement à la maternité pour diverses raisons (Thaddeus and Maine 1994, King, Jackson et *al.* 2015, Hussein, Hirose et *al.* 2016). Le travail d'accouchement est déjà bien avancé lorsqu'elles arrivent à la maternité, et pourrait être en relation avec l'augmentation du niveau de HLA-G observé au 9^{ème} mois de grossesse, correspondant dans notre étude au moment de l'accouchement. Cette hypothèse avait été évoquée et démontrée par Knafel en 2009 (Knafel, Basta et *al.* 2009). En comparant les niveaux de HLA-G soluble plasmatique chez 47 femmes accouchant par césarienne ou par voie basse à différents stades du travail, il a constaté que les niveaux de HLA-G soluble augmentaient proportionnellement à l'évolution du travail d'accouchement. Le même résultat a été confirmé la même année dans une autre étude comparant l'influence de la grossesse et du travail d'accouchement sur les niveaux de HLA-G soluble plasmatique chez 28 femmes souffrant d'allergies et 15 femmes non allergiques (Rizzo, Stignani et *al.* 2009). Les niveaux de HLA-G ont été dosés 3 fois : au troisième trimestre de grossesse avant l'accouchement, pendant le travail d'accouchement et en post-partum deux ans après l'accouchement. Dans les deux groupes de femmes, les niveaux de HLA-G soluble plasmatique étaient plus élevés au moment de l'accouchement. L'élévation des niveaux de HLA-G liée au travail d'accouchement pourrait être en rapport avec le

stress engendré par la cascade de réactions physiologiques aboutissant à l'expulsion du fœtus. Une autre source de stress réside dans les conditions de déplacement des femmes enceintes dans nos zones d'étude qui font souvent plusieurs kilomètres à pied ou sur une moto pour se rendre à la maternité. Au-delà du stress on peut suspecter l'existence d'une hypoxie qui peut également entraîner une augmentation de HLA-G soluble (Bourguignon, Yaghi et *al.* 2010).

Les dissemblances observées entre nos travaux et les études évoquées pourraient également provenir de l'origine génétique de nos populations. Il est désormais admis que les populations caucasiennes diffèrent fortement de celles africaines par une grande variabilité génétique (Campbell and Tishkoff 2008). Il est clairement montré que ces variations génétiques peuvent être responsables d'une variabilité dans l'expression de HLA-G (Donadi, Castelli et *al.* 2011, Martelli-Palomino, Pancotto et *al.* 2013). Ces différences populationnelles au niveau du gène *HLA-G* ont été récemment confirmées à partir d'une étude portant sur 21 populations mondiales. Cette étude apporte de très forts arguments en faveur de l'existence d'une sélection balancée assurant ainsi un équilibre fin entre la nécessité de maintenir une expression compatible avec la tolérance fœto-maternelle et avec une défense immunitaire appropriée contre les infections (Sabbagh, Luisi et *al.* 2014). Enfin, un autre paramètre éminemment important intervient, il s'agit de l'impact de l'environnement des femmes qui sont dans notre cas fortement exposées à de multiples infections. Ces infections de toutes sortes (parasitaires, virales...) peuvent intervenir directement sur le taux de HLA-G soluble, mais on peut également évoquer la possibilité de modifications épigénétiques engendrées par les diverses expositions (Gillio-Tos, Bicalho Mda et *al.* 2012).

Autre caractéristique de cette évolution, nous avons montré que les niveaux de HLA-G soluble étaient plus élevés en début de grossesse chez les femmes multigestes. Cette association n'a pas été retrouvée dans les études faites par Alegre et *al.* et par Klitkou et *al.* (Alegre, Diaz-Lagares et *al.* 2007, Klitkou, Dahl et *al.* 2015). Ici également, il est important de rappeler les différences de populations, parce que dans notre étude la proportion des multigestes est importante (84%) d'une part et, d'autre part la majorité d'entre elles étaient de grandes multigestes avec plus de 3 grossesses antérieures. Il est probable, étant donné les caractéristiques démographiques des populations caucasiennes, que de tels taux de multigestité (et de grandes multigestes) soit également une différence entre les populations étudiées. Cela pourrait être compris comme le fait que des femmes en mesure d'avoir des niveaux de HLA-G soluble élevés seraient probablement plus aptes que les autres à maintenir l'allogreffe fœtale et donc en mesure de vivre des grossesses normales répétées. Il est ainsi intéressant de noter que les femmes primigestes sont plus sujettes à des pathologies toxémiques gravidiques que les multigestes (Higgins and de Swiet 2001) et la pré-éclampsie a été montrée associée à de faibles niveaux de HLA-G soluble (Yie, Li et *al.* 2004, Rizzo, Andersen et *al.* 2009).

3. Évolution de HLA-G soluble au cours des deux premières années de vie

L'évolution de HLA-G soluble chez les enfants de nos deux études recouvre deux périodes distinctes : la première, réalisée chez 165 enfants, concerne la première année de vie, tandis que dans la seconde étude l'évolution était décrite de la naissance à 24 mois. Ces études sont, à notre connaissance, les premières à être réalisées sur des enfants issus de la population générale.

Si les deux études se chevauchent la première année, elles présentent néanmoins une différence importante puisque la seconde ne comporte pas le même nombre de dosages sur la période du suivi. En effet, dans la première étude (Tori-Bossito), les dosages ont été réalisés à 0, 3, 6, 9 et 12 mois alors que, dans l'étude Tolimmunpal, les mesures de HLA-G soluble dans le plasma des enfants n'étaient disponibles qu'à 0, 6, 9 et 12 mois et aucun prélèvement n'était prévu à 3 mois. En superposant l'évolution au cours de la première année dans les deux études (Figure 34), une différence évidente apparaît liée à l'absence de prélèvement à 3 mois dans l'étude Tolimmunpal.

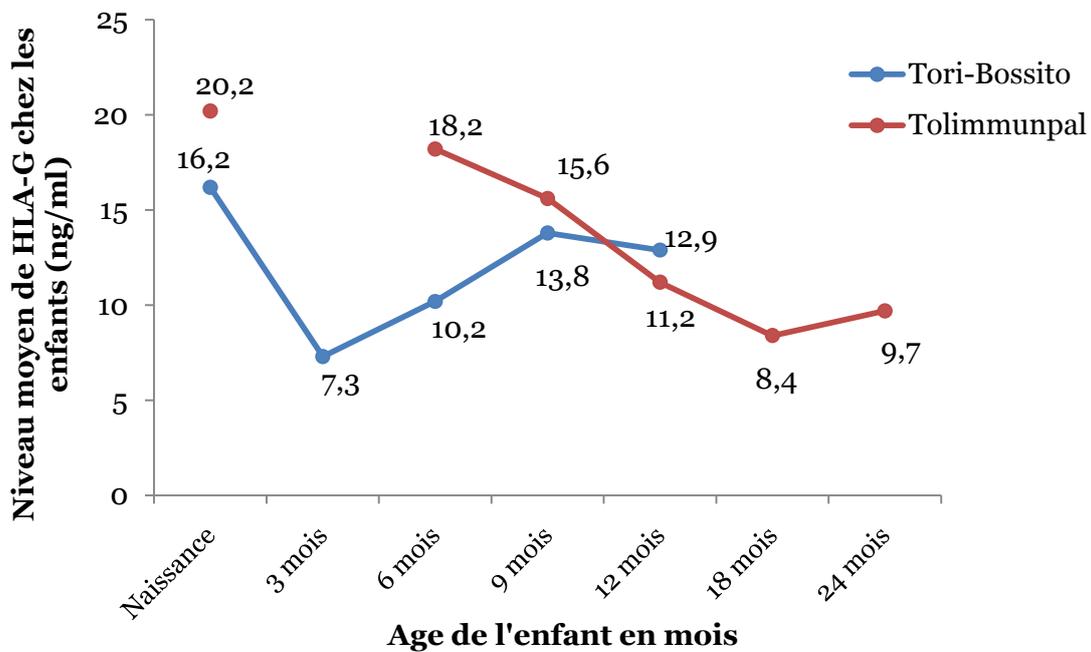


Figure 34 : Évolution comparée des niveaux de HLA-G soluble entre Tori-Bossito et Allada

Cependant, dans les deux études des similitudes existent. D'une part, les niveaux les plus élevés sont relevés dans le sang du cordon à l'accouchement et d'autre part, les valeurs à 9 et 12 mois sont relativement proches. Le niveau élevé de la molécule dans le sang du cordon au moment de l'accouchement pourrait s'expliquer par la présence

dans le sang du cordon de la protéine maternelle. Cette hypothèse est possible dans la mesure où la taille de la molécule HLA-G est compatible avec un passage transplacentaire potentiel de la molécule. Elle est également soutenue par les hauts niveaux de HLA-G soluble dans le sang périphérique de la mère au moment de l'accouchement. Dans leur étude faite en 2015, Klitkou et *al.* ainsi que Hackmon et *al.* retrouvent la même corrélation entre les niveaux de HLA-G soluble à terme et dans le sang du cordon (Hackmon, Hallak et *al.* 2004, Klitkou, Dahl et *al.* 2015). Les derniers auteurs (Klitkou et *al.*) évoquent également un possible passage transplacentaire. Ils retrouvent en effet un niveau plus élevé chez la mère que dans le sang du cordon, comme dans l'étude Tori-Bossito (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014), alors que dans l'étude Tolimmunpal, nous ne retrouvons pas cette différence, et estiment que la molécule HLA-G ne serait pas transférée librement à travers la barrière placentaire. Toutefois, même si l'hypothèse du passage placentaire est plausible sur des arguments de cinétique proche de celle des immunoglobulines et de la taille de protéine inférieure à celles-ci, rien ici ne permet de l'affirmer. D'autres possibilités, non exclusives, existent comme l'origine placentaire (principale source de production pendant la grossesse), de l'enfant lui-même (thymus?) ou encore des cellules ombilicales productrices de HLA-G (Buzzi, Alviano et *al.* 2012). Quoiqu'il en soit des études expérimentales sur modèles de placenta (Berveiller, Gil et *al.* 2016) devraient être entreprises pour tenter d'apporter une réponse au moins partielle à cette question.

Sur la première cohorte le niveau de HLA-G diminue fortement jusqu'à 3 mois puis amorce une remontée. Étant donné l'absence d'informations sur HLA-G à 3 mois dans la seconde il est difficile de rester strictement comparatif sans introduire une part de spéculation. Prenons ce risque et imaginons deux évolutions possibles du

niveau de HLA-G soluble entre la naissance et 6 mois dans Tolimmunpal. On pourrait dans un premier cas imaginer que le niveau de HLA-G soluble ait diminué de la naissance à 3 mois, de façon importante et semblable à celle observée dans la cohorte Tori-Bossito, puis qu'il y ait eu une augmentation du niveau de 3 mois à 6 mois. Dans ce cas, on aurait eu une évolution relativement similaire du niveau de HLA-G soluble dans les deux études de 0 à 6 mois, comparable à la cinétique des anticorps entre la naissance et 6 mois de vie chez les enfants, avec certes des niveaux supérieurs dans Tolimmunpal. Cette évolution pourrait s'expliquer par une disparition progressive entre 0 et 6 mois de la protéine d'origine maternelle qui aurait traversé la barrière placentaire en fin de grossesse ou à l'accouchement, ou encore à la disparition du placenta à l'accouchement, disparition non encore compensée par une production suffisante de HLA-G propre à l'enfant lui-même. Autour de 3 mois, la production de HLA-G provenant de l'enfant serait ensuite plus importante, et progressivement croissante jusqu'à 6 mois. Une autre évolution du niveau de HLA-G entre 0 et 6 mois dans la cohorte Tolimmunpal, tout autant spéculative, serait que le niveau diminuerait de façon moins importante. Dans ce dernier cas, l'évolution suivrait la tendance globale de diminution observée de 0 à 24 mois dans cette population. Ici également, la diminution proviendrait de l'absence des sources de production maternelle et placentaire au cours des premiers mois, associée à une faible production par l'enfant, probablement modulée par d'autres facteurs. Bien évidemment, de manière tout aussi théorique une augmentation du niveau de HLA-G soluble est possible à 3 mois, mais elle nous semble moins probable. Quoi qu'il en soit, une différence d'évolution de HLA-G soluble entre les deux populations reste possible et pourrait être due à des différences entre ces populations. Parmi ces différences notons la prévalence d'infection placentaire (30% dans un cas et 10% dans l'autre), mais également le suivi médical et la prise en charge des enfants. Ainsi les

enfants de la première cohorte ont été surveillés beaucoup plus intensément de façon hebdomadaire à la recherche de fièvre et traités systématiquement par un traitement antipalustre en cas de paludisme ou, de manière assez systématique également (Brembilla, Mauny et *al.* 2016), par antibiotiques et antipyrétiques. Cette prise en charge systématique de tout processus infectieux pourrait entraîner une modification des niveaux de HLA-G.

Par ailleurs, l'évolution de HLA-G a été analysée dans la cohorte de Tori Bossito par la méthode des classes latentes, en supposant l'existence de groupes d'enfants ayant des caractéristiques et une évolution particulière. Nous avons ainsi identifié trois évolutions possibles chez les 165 enfants de Tori-Bossito, caractérisées par des trajectoires tantôt élevées, très basses ou intermédiaires. Toutefois, il est indispensable de noter que nous sommes dans une approche statistique, et il n'est pas souhaitable de parler de groupes « distincts » qui pourraient être définitivement « caractérisés » en se basant sur certains caractères. En effet, chaque enfant a une probabilité d'appartenir à l'une et à l'autre des classes. Il est d'ailleurs important de noter que les facteurs pouvant moduler l'évolution de HLA-G soluble (infection, poids de naissance ...) sont les mêmes dans tous les groupes. Nous avons cependant mis en évidence que la présence de niveaux détectables de HLA-G dans le sang de cordon était associée avec une probabilité significativement plus importante pour un enfant d'appartenir à la trajectoire haute ou intermédiaire que basse. L'origine de ces classes latentes d'enfants -par définition non identifiable a priori- dans une population supposée homogène pourrait-elle être génétique ? La ressemblance mère-enfant que nous avons mise en évidence et qui sera discutée plus tard, pourrait être en faveur de l'intervention de facteurs génétiques. Plusieurs études ont en effet montré que des polymorphismes du gène *HLA-G* pouvaient être associés à une différence en termes

d'expression et donc de production de protéine soluble (Hiby, King et *al.* 1999, Hviid, Rizzo et *al.* 2006, Iversen, Nguyen et *al.* 2008, Jeong, Park et *al.* 2014). Nous avons recherché de telles associations entre des polymorphismes de la partie 3'UTR du gène et les niveaux de HLA-G dans la population de la seconde cohorte. Aucune association n'était significative (Annexe). Ces résultats n'ont pas été insérés dans la thèse car une étude plus étendue sur une population plus importante avec un séquençage complet du gène est en cours.

4. Ressemblance mère/enfant

Dans nos deux études, une corrélation positive entre les niveaux maternels de HLA-G soluble et ceux de l'enfant a été montrée. Cette association a été retrouvée initialement à l'accouchement dans la première analyse des données par un modèle mixte (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014) et il est tout à fait logique de la retrouver en utilisant un modèle de trajectoires latentes. Des résultats similaires sont déjà retrouvés par Hackmon et *al.* en 2004 (Hackmon, Hallak et *al.* 2004) et par Klitkou et *al.* en 2015 qui décrivent une association entre les niveaux de HLA-G soluble à terme chez la femme enceinte et dans le sang du cordon (Klitkou, Dahl et *al.* 2015). Cette corrélation pourrait être due au passage transplacentaire de la protéine maternelle. L'apport de l'analyse en classe latente est la possibilité qu'elle nous a donné de montrer que le niveau de HLA-G soluble dans le sang de cordon permet de prédire les niveaux au cours de la première année de vie. Les enfants avec des niveaux de HLA-G détectables dans le sang de cordon ont statistiquement plus de chance d'être dans la trajectoire haute ou intermédiaire. Bien évidemment, comme nous l'avons dit nous sommes dans le domaine des statistiques et ce résultat ne permet pas à lui seul de proposer un outil de prédiction. Nous verrons que cette question revêt

une importance majeure dans notre travail et que nous avons poursuivi son exploration. Celle-ci sera discutée plus avant. La corrélation materno-infantile de HLA-G soluble va au-delà de l'accouchement puisque nous montrons qu'elle existe tout au long de la grossesse. D'autre part, les mères ayant un profil de production de HLA-G soluble au cours de la grossesse avaient une probabilité plus élevée de donner naissance à des enfants ayant le même profil HLA-G pendant les deux premières années de vie. Ainsi, une femme enceinte avec des niveaux élevés de HLA-G au cours de la grossesse ne va pas seulement donner naissance à un enfant avec un niveau élevé à la naissance, mais cet enfant maintiendra ce niveau durant 24 mois. L'origine de cette ressemblance dépasse évidemment le cadre du transfert transplacentaire en fin de grossesse et à l'accouchement. Elle pourrait découler de l'influence de l'environnement familial et des habitudes de vie : les enfants et leurs mères vivent ensemble et dans les mêmes conditions, ils subissent l'influence des expositions extérieures similaire. On pourrait également évoquer une possible origine génétique ou épigénétique, d'autant plus qu'une étude a retrouvé une variation des niveaux de HLA-G soluble en lien avec certains polymorphismes du gène *HLA-G*, présents à la fois chez la mère et chez l'enfant (Dahl, Klitkou et *al.* 2015). Dans cette étude les auteurs montrent que le nombre total (mère+enfant) d'allèles « ins 14 pb » était associé avec des niveaux maternels élevés à terme sur un sous échantillon de mères (le groupe hétérozygote 14 bp ins/del). De plus, l'haplotype 14 bp ins/del et +3142C/G est également associé à des hauts niveaux de protéine soluble à terme, cette fois ci chez les mères hétérozygotes 14DelC/14InsG. Ces résultats sont intéressants car ils montrent que le polymorphisme génétique intervient dans ce phénotype quantitatif, mais également que les schémas de résultats obtenus (chacun dans un sous groupe de mère) soulignent la complexité probable de ce contrôle. Comme nous l'avons signalé précédemment nous avons effectués des analyses

génétiques sur divers phénotypes (niveaux de HLA-G, profils) en combinant ou non les génotypes (enfants seuls, mères seules, les deux combinés) et aucune association n'a été mise en évidence (Annexe 2). D'autres analyses sur le gène entier séquencé sont en cours.

5. HLA-G et faible poids de naissance

L'association entre de hauts niveaux de HLA-G soluble et le FPN dans notre première cohorte avait été décrite pour la première fois par Sadissou et *al.* (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014). Dans cette étude l'analyse avait été menée par l'intermédiaire d'un modèle mixte tenant compte de la non-indépendance des données chez un même enfant. Nous avons décidé de réaliser une nouvelle analyse avec un modèle de classes latentes essentiellement pour mieux explorer l'association complexe entre le paludisme et HLA-G soluble (cela sera discuté plus tard dans ce chapitre). Il était donc tout à fait attendu de retrouver l'association entre HLA-G et FPN. Cependant, l'analyse en classe latente a permis d'affiner cette association et de montrer que la proportion d'enfant avec un FPN était plus importante au sein de la trajectoire haute de HLA-G. Dans la seconde cohorte l'association entre FPN et HLA-G se retrouve mais elle apparaît moins nettement et seulement en présence d'une interaction avec l'âge. Cette interaction, au sens statistique du terme, signifie que l'effet de l'âge sur l'évolution de HLA-G soluble diffère chez les enfants de FPN par rapport aux enfants de poids normal. Une des raisons pour lesquelles cette association peut-être moins nettement mise en évidence dans cette cohorte peut être liée au fait que parmi les enfants perdus de vue à 12 mois, la proportion de faible poids de naissance est plus importante (13,3% versus 9%) que parmi ceux suivis au-delà. Cette diminution entraîne inévitablement une perte de puissance globale de cette analyse.

Le faible poids de naissance est largement décrit comme le principal indicateur de morbidité et de mortalité chez les enfants puisque la majorité des décès survenant au cours des premiers jours et mois de vie sont retrouvés au sein de ce groupe d'enfants (Lawn, Cousens et *al.* 2005). Dans une étude récente rapportée par Katz et al (Katz, Lee et *al.* 2013) sur des données recueillies entre 1982 et 2010 à partir de 20 études de cohorte et portant sur plus de 2 millions de naissances vivantes dans les pays en développement, le risque relatif (RR) de mortalité néonatale et post-néonatale était respectivement de 6,82 [IC95% : 3,56 ; 13,07] et 2,50 [IC95% : 1,48 ; 4,22] chez les nouveau-nés prématurés de FPN par rapport aux nouveau-nés à terme de poids normal. Au Brésil une étude a montré que le risque d'avoir un score d'APGAR inférieur à 7 à la 5ème minute de vie [RR=2,6; IC95% : 1,4 ; 4,9], d'être admis en soins intensifs néonataux [RR=1,6; IC95% : 1,2 ; 2,1] et d'être malade en période néonatale [RR=2,8; IC95% : 2,3 ; 3,5] étaient significativement plus élevés chez les enfants de FPN. Dans cette étude la morbidité néonatale était évaluée sur différents items incluant les infections (Santos, Matijasevich et *al.* 2008). L'association entre HLA-G et le faible poids de naissance renforce l'idée de fragilité qui pourrait être liée à des hauts niveaux de HLA-G rendant les enfants plus sensibles aux infections. L'élévation des niveaux de HLA-G soluble en cas de faible poids de naissance pourrait découler d'un stress oxydatif ou d'un stress cellulaire de l'enfant in utero (Kim, Hong et *al.* 2005, Min, Park et *al.* 2009) entraînant une variabilité de la production de HLA-G (Ibrahim, Morange et *al.* 2000, Oztekin, Fenkci et *al.* 2015), persistant même après la naissance. La conséquence pourrait être qu'un environnement de tolérance immunitaire s'installe, favorisant la survenue d'infections et responsable de la morbi-mortalité observée chez les enfants de faible poids de naissance. Il est intéressant de noter qu'une association entre l'allèle « Insertion de 14pb » de *HLA-G* et le FPN a été retrouvée chez des femmes subissant des fausses couches récurrentes inexplicables

(Christiansen, Kolte et *al.* 2012). La présence de l'allèle « insertion de 14pb » serait associée à une réduction de poids de naissance chez les premiers nés de sexe masculin.

6. HLA-G soluble et infection palustre

Au cours de la grossesse, nous n'avons pas mis en évidence d'association entre les niveaux de HLA-G soluble maternels et l'infection palustre. Cette observation pourrait résulter du faible nombre d'infections lié à la prise supervisée par toutes les femmes au cours de la grossesse du traitement préventif intermittent du paludisme dans le but de prévenir le paludisme. Lors de cet essai clinique il n'a pas été démontré de supériorité de l'une ou l'autre des molécules sur la variable d'intérêt principale qu'était le FPN. Par contre, une différence significative a été constatée entre les trois groupes pour des variables d'intérêt « secondaires » comme l'anémie maternelle ou les accès palustres, à l'accouchement et au cours de la grossesse. Dans les deux cas une meilleure protection semble associée à la prise de méfloquine. Cependant, les auteurs notent que la prise supervisée durant cet essai clinique a probablement été responsable d'une incidence relativement faible du paludisme sur l'ensemble des femmes de l'essai (Gonzalez, Mombo-Ngoma et *al.* 2014). Rappelons également que la surveillance des infections durant ce suivi était relativement passive et que, en zone de transmission stable, le paludisme donne rarement des signes cliniques chez la femme enceinte. Enfin l'utilisation déclarée des moustiquaires imprégnées d'insecticide était très élevée au cours de ce suivi, supérieure à 90% (Gonzalez, Mombo-Ngoma et *al.* 2014). Tout cela est donc probablement à l'origine à la fois d'une faible incidence mais aussi d'une difficulté diagnostique, des infections palustres. Dans la mesure où au cours de grossesse, la production de HLA-G est

importante car nécessaire pour le développement fœtal, il est possible que l'effet du paludisme, relativement diminué pour les raisons évoquées précédemment, n'ait pas été suffisant pour être significatif. L'augmentation liée à la grossesse est probablement bien plus importante que celle liée éventuellement à l'infection palustre.

Concernant les enfants ici encore il est important de discuter séparément les résultats des deux cohortes et de mettre ceux de la première en perspective de ceux obtenus dans la première analyse (Sadissou, d'Almeida et *al.* 2014). En effet, dans cette première étude il n'a pas été mis en évidence d'association significative entre le niveau de HLA-G soluble à un instant t et la présence d'une infection concomitante. Par contre il a été montré qu'un enfant ayant un niveau de HLA-G soluble élevé à un instant t avait une probabilité significativement plus élevée de faire un accès dans les jours/semaines suivant le dosage. Dans la présente étude avec l'utilisation des trajectoires latentes nous avons mis en évidence que les infections palustres étaient associées à une augmentation significative de HLA-G soluble et ce, quelle que soit la trajectoire de l'enfant. Ces deux résultats sont parfaitement complémentaires et soulignent la complexité de l'association HLA-G / paludisme, complexité qui nécessite probablement l'utilisation de méthodes d'analyses différentes et également complémentaires. La première analyse faisait l'hypothèse que notre échantillon d'enfants était issu d'une population homogène, alors que la seconde faisait l'hypothèse de l'existence de groupes d'enfants dont l'évolution de HLA-G soluble était différente au cours de la première année de vie. La première analyse est en faveur du fait que des niveaux élevés de HLA-G pourraient entraîner une inhibition de la réponse immune et donc la survenue d'infection. La seconde est compatible avec l'hypothèse que le parasite pourrait induire l'expression de HLA-G et la mise en place

d'une tolérance immunitaire et d'un échappement du parasite à la réponse de l'hôte. Ainsi, cette relation complexe semble sous tendue par des interactions également complexes entre HLA-G et le système immunitaire. HLA-G est un important check-point immunitaire (Carosella, Rouas-Freiss et *al.* 2015) qui interagit avec de nombreux effecteurs de la réponse immunitaire comme nous l'avons souligné au début de ce mémoire. La molécule interagit avec de nombreuses cellules immunitaires fortement impliqués dans la réponse humorale et la production d'anticorps. HLA-G peut ainsi intervenir en inhibant la production d'anticorps anti-palustre par les lymphocytes B, modifiant l'immunité qui constitue un facteur important dans le mécanisme de survenue d'une infection. Naji a en effet montré que la protéine pouvait inhiber la différenciation et la maturation des lymphocytes B, ainsi que la production d'immunoglobulines à leur niveau (Naji, Menier et *al.* 2014). L'action de HLA-G peut également passer par l'annulation de l'activité cytotoxique et cytolytique des cellules immunitaires (NK, CD8) ou par d'autres mécanismes revus dans le chapitre généralités. Il serait intéressant d'étudier cette molécule dans les différentes formes cliniques de paludisme afin apprécier son rôle dans la gravité de l'infection pour vérifier cette hypothèse. Dans l'étude Tolimmunpal, nous confirmons l'association entre infection palustre et HLA-G au cours des 24 premiers mois de vie. Nous avons choisi de ne pas rechercher d'association entre des niveaux élevés et la probabilité de survenue d'une infection car la surveillance des enfants durant la première année ne permettait pas cette analyse précise. Notons cependant que dans les deux analyses il apparaît une association significative entre la variable mesurant spécifiquement le risque de piqûre d'anophèles et le niveau de HLA-G. Cette association renforce à nos yeux l'existence de l'association entre HLA-G et le paludisme.

Il est difficile de comparer les résultats de notre thèse avec ceux de la littérature car à notre connaissance nous sommes les seuls à étudier cette thématique. Cependant des résultats portant sur d'autres infections montrent l'importance de cette molécule dans ce domaine. Ainsi, des observations dans ce sens ont été faites dans d'autres pathologies infectieuses comme la tuberculose (Saurabh, Thakral et *al.* 2016), l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* (Rizzo, Bergamini et *al.* 2016) avec des niveaux de HLA-G soluble plasmatique élevés. Dans l'infection à VIH également, une augmentation de la production plasmatique de HLA-G est notifiée et associée à l'évolution de la maladie (Thibodeau, Lajoie et *al.* 2011). La même situation est décrite pour les hépatites virales B (Shi, Lin et *al.* 2011, Park, Park et *al.* 2012, Han, Li et *al.* 2014) et C (Weng, Fu et *al.* 2011, Murdaca, Contini et *al.* 2015). S'il est possible pour certains pathogènes d'induire la production de HLA-G (Christiansen, Kolte et *al.* 2012, Amiot, Vu et *al.* 2014), un processus similaire n'a pas encore été décrit pour *Plasmodium* mais pourrait être évoqué. Des explorations demeurent nécessaires afin de préciser ces interactions entre le parasite et HLA-G. Parmi les parasitoses tropicales la trypanosomose humaine africaine (THA), ou maladie du sommeil, a été particulièrement étudiée. Les résultats de ces études confirment la complexité des interactions entre l'hôte et le parasite et le rôle potentiel du check-point immunitaire dans cette complexité. En effet, tout comme pour le paludisme il a été montré des niveaux plus élevés de HLA-G soluble chez les malades mais également que ces niveaux élevés pouvaient être associés avec un risque de développer la maladie chez des sujets infectés semblant contrôler leur infection (Gineau, Courtin et *al.* 2016). Ces sujets séropositifs sans parasitémie sont considérés comme non malades et certains d'entre eux semblent pouvoir évoluer vers une guérison spontanée (Jamonneau, Ilboudo et *al.* 2012). D'autres par contre vont développer la maladie mais rien ne permet, lors du dépistage de masse, de distinguer les deux groupes. Tous ces

individus sont donc laissés dans leurs villages sans surveillance, ou extrêmement passive, ni traitement. Outre le risque de développer la maladie et d'en mourir, ils représentent un réservoir de parasites qui entretient la transmission. Il a été montré que des hauts niveaux de HLA-G soluble pourraient être considérés comme un marqueur de risque de développer la maladie et donc pourraient, si cela se confirme, être un indicateur de traitement pour ces sujets (Gineau, Courtin et *al.* 2016). Ici encore, tout comme dans le paludisme, des associations entre des polymorphismes génétiques de *HLA-G* et la maladie ont été mis en évidence (Courtin, Milet et *al.* 2013, Garcia, Milet et *al.* 2013). Nous verrons que nos travaux sur le paludisme pourraient également permettre de faire l'hypothèse que HLA-G pourrait être un marqueur de risque de fragilité vis-à-vis de l'infection.

7. HLA-G et infection placentaire

En ce qui concerne l'infection placentaire, nous n'avons retrouvé aucune association directe avec les niveaux de HLA-G soluble ni chez l'enfant ni chez la mère.

Concernant la femme enceinte, la mise en évidence d'une infection placentaire lors de l'accouchement ne signe pas nécessairement l'existence d'une infection périphérique concomitante. Dans plusieurs études des auteurs ont montré que les génotypes de parasites présents dans le placenta pouvaient être différents de ceux présents dans le sang périphérique lors de l'accouchement (Kamwendo, Dzinjalama et *al.* 2002, Kassberger, Birkenmaier et *al.* 2002, Schleiermacher, Le Hesran et *al.* 2002, Mayengue, Rieth et *al.* 2004, Jafari-Guemouri, Ndam et *al.* 2005). Une étude récente montre même que certains des génotypes parasitaires présents dans le placenta à l'accouchement peuvent être recoupés avec des génotypes correspondants à des infections survenant tôt au cours de la grossesse (Cohee, Kalilani-Phiri et *al.* 2016).

L'absence d'association avec le niveau de HLA-G soluble peut être due au fait que l'infection placentaire est un phénomène complexe qui est certainement présent avant le dosage de HLA-G soluble. Nous avons souligné la complexité de l'association entre HLA-G et paludisme et l'absence d'association retrouvée ici peut être également une nouvelle illustration de cette complexité. Une autre raison pourrait être que la détection microscopique de l'infection placentaire utilisée dans notre étude manque de sensibilité par rapport à la PCR (Agudelo, Aristizabal et *al.* 2014). Ainsi, il est possible que certaines infections soient passées inaperçues entraînant un possible biais dans l'interprétation de ce résultat. Les résultats concernant l'effet de ces infections placentaires submicroscopiques restent contradictoires (Mankhambo, Kanjala et *al.* 2002, Singer, Newman et *al.* 2004, Adegnika, Verweij et *al.* 2006). Il nous semble indispensable de mettre sur pied des études fondamentales pour explorer les interactions entre les effecteurs de l'infection placentaire (l'antigène VAR2CSA et son récepteur placentaire, la chondroïtine sulfate A) et HLA-G. De telles études pourraient être réalisées grâce à des modèles de placenta (Berveiller, Gil et *al.* 2016).

Chez l'enfant si nous ne trouvons pas d'association significative entre l'infection placentaire et le niveau de HLA-G soluble en utilisant une approche par modèle mixte ou en classes latentes, nous avons montré que les femmes avec une infection placentaire avaient une probabilité élevée de donner naissance à des enfants dont le profil de HLA-G soluble sera très élevé pendant les deux premières années de vie. Ce résultat est obtenu en analyse multivariée avec ajustement sur le profil HLA-G de la mère. Ce résultat semble compatible avec l'hypothèse selon laquelle HLA-G serait impliqué dans le phénomène de tolérance immunitaire déclenchée par l'infection placentaire. En effet, lors des différentes études ayant montré que les enfants nés

d'un placenta infecté étaient plus rapidement infectés par *P. falciparum*, l'ensemble des auteurs a évoqué un phénomène de tolérance immunitaire (Le Hesran, Cot et al. 1997, Mutabingwa, Bolla et al. 2005, Schwarz, Adegnika et al. 2008, Le Port, Watier et al. 2011). Si ce phénomène est largement admis, aucune hypothèse explicative univoque n'a été proposée à notre connaissance (Malhotra, Dent et al. 2009). Il semble néanmoins que le passage de protéines parasitaires antigéniques via le sang de cordon entraîne l'orientation de la réponse immunitaire vers un versant régulateur avec une production importante d'IL10 (Broen, Brustoski et al. 2007, Dauby, Goetghebuer et al. 2012). HLA-G, nous l'avons maintes fois dit, représente un check-point immunitaire très important ayant une action inhibitrice en plusieurs points de la réponse immune. Parmi ces fonctions, la protéine provoque une inhibition de la réponse allogénique proliférative des lymphocytes T CD4+ et induit la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α (tumor necrosis factor α), l'IFN- γ ainsi que l'IL-10 (Creput, Durrbach et al. 2003, Amodio, de Albuquerque et al. 2014, Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015). Les interactions entre HLA-G et l'IL10 ont été décrites dans de nombreuses situations y compris en cancérologie (Ostapchuk, Cetin et al. 2015) et dans les greffes (Naji, Le Rond et al. 2007). Ces actions inhibitrices et régulatrices ont de nombreuses conséquences immunologiques et parmi celles-ci on note qu'au niveau des lymphocytes B, HLA-G inhibe la prolifération puis la différenciation cellulaire, de même que la sécrétion d'anticorps dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes (Amodio, de Albuquerque et al. 2014, Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015). L'hypothèse que nos travaux permettent d'émettre est donc que HLA-G est un élément intervenant dans la mise en place d'un milieu tolérogène chez le nouveau-né né d'un placenta infecté.

Nous avons vu que dans la THA, des niveaux élevés de HLA-G soluble pourraient être associé avec le développement de la maladie du sommeil chez des sujets présentant une trace sérologique d'infection mais chez qui le parasite n'est pas mis en évidence. La possibilité d'utiliser le dosage de HLA-G soluble comme marqueur de risque a été proposée, même si ces travaux sont encore très en amont et nécessitent d'être confirmés (Gineau, Courtin et *al.* 2016). Ce même type d'approche pourrait il être proposé dans le cas du paludisme gestationnel ? En tenant compte d'une part de la ressemblance des niveaux de HLA-G soluble entre une mère et son enfant pendant les deux premières années de vie, y compris entre le niveau en début de grossesse, et d'autre part des associations entre HLA-G soluble et le risque d'infection palustre, nous avons étudié l'association éventuelle entre le niveau de HLA-G maternel en début de grossesse et le délai de première infection. Nous avons montré par une analyse de survie que cette association existait. Les résultats du modèle de Cox utilisé pour l'analyse montrent l'absence d'effet de l'infection placentaire sur ce délai et un effet significatif du risque environnemental d'exposition à la piqûre du vecteur. Cette dernière association renforce à nos yeux la robustesse du résultat car elle confirme une précédente association obtenue dans la population de Tori Bossito dont est extraite la première cohorte (Cottrell, Mary et *al.* 2007, Cottrell, Kouwaye et *al.* 2012). L'association entre le niveau de HLA-G soluble en début de grossesse et le délai est significative avec la variable en quantitative ou en deux groupes identifiés selon la médiane de la distribution. L'évolution de la courbe de survie montre que cet effet est remarquable à partir de la fin de la première année de vie. Cela est compatible également avec le fait qu'entre la naissance et 12 mois la recherche des infections palustres n'était pas active. Notre analyse montre également que seul le niveau lors de la première mesure est associé au risque. Ce dosage lors du suivi des femmes enceintes est le seul qui ait été effectué en dehors de toute intervention,

notamment de prise de médicament. Mais il faut également noter que ce résultat confirme que le début de grossesse est certainement un moment important. En effet, Cottrell et *al.* avaient déjà montré que les infections en début de grossesse jouait un rôle primordial sur le risque de faible poids de naissance au Bénin (Cottrell, Mary et *al.* 2007), et le même constat a été fait au Burkina Faso (Valea, Tinto et *al.* 2012). Notons également que cette période est la seule à ne pas être couverte par le TPI de la femme enceinte. L'ensemble de ces éléments nous permet donc d'émettre une hypothèse, encore fragile et qui devra être confirmée, que le dosage de HLA-G soluble en début de grossesse pourrait être un marqueur de fragilité de l'enfant à naître. Si cette hypothèse se confirmait ce résultat pourrait avoir d'importantes conséquences en termes de santé publique.

Conclusion

A l'issue de ce travail de thèse un certain nombre de résultats importants ont été mis en évidence. Tout d'abord l'association entre le paludisme et les niveaux de HLA-G soluble a été confirmée par une méthodologie originale et dupliquée sur une seconde cohorte béninoise. Cette association est complexe et demande très certainement des explorations complémentaires, comme par exemple de travailler sur des accès sévères. L'association avec l'infection placentaire semble plus difficile à mettre en évidence. Pourtant c'est cette question qui était à la base de nos interrogations et de nos travaux. C'est plus précisément le caractère « spécifique du paludisme » de la tolérance immunitaire associée au paludisme placentaire qui nous posait problème pour plusieurs raisons. Un même type de phénomène est décrit en cas d'infections par les helminthes au cours de la grossesse et les conséquences chez le nouveau-né sont certes une sensibilité accrue à l'infection, mais également des perturbations de la réponse aux vaccinations ou aux allergènes ... Notre équipe d'accueil avait décrit pour la première fois sur la cohorte de Tori Bossito que les enfants nés d'un placenta infectés par *P. falciparum* étaient plus sensibles aux fièvres non palustres. HLA-G est une molécule tolérogène impliquée dans de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques ou une tolérance est décrite. Il nous paraissait donc indispensable d'explorer l'implication de HLA-G dans le phénomène de tolérance immunitaire sensé accompagner l'infection placentaire par *P. falciparum*. Nos résultats sont en faveur de notre hypothèse de départ nous permettent même d'aller au-delà de cette simple description. En effet, les constatations sur la ressemblance entre les mères et les enfants évoquées lors de la première étude au moment de l'accouchement ont été retrouvées et nous avons montré que cette ressemblance va bien au-delà de

l'accouchement. C'est ce résultat auquel nous ne nous attendions pas, renforcé par ceux obtenus par l'équipe sur la THA qui nous a permis de commencer à tester le potentiel rôle prédictif de HLA-G. Ce premier résultat est extrêmement important mais doit bien évidemment être confirmé. S'il l'était, il pourrait permettre de proposer un outil de dépistage de grossesses à risque car donnant potentiellement naissance à des enfants de faible poids de naissance et plus sensibles au paludisme ou (et autres infections ?) sur lesquels des actions de préventions pourraient être proposées.

Ce travail de confirmation est une priorité et l'étude d'autres infections en est une autre. Mon travail de thèse m'a permis de publier deux articles, un troisième sur HLA-G et les helminthes est soumis et un autre est en préparation sur l'analyse de survie et le pouvoir prédictif.

Références

Abediankenari, S., F. Farzad, Z. Rahmani and M. B. Hashemi-soteh (2015). "HLA-G5 and G7 Isoforms in Pregnant Women." Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology **14**(2): 217-221.

Accrombessi, M., S. Ouedraogo, G. C. Agbota, R. Gonzalez, A. Massougbodji, C. Menendez and M. Cot (2015). "Malaria in Pregnancy Is a Predictor of Infant Haemoglobin Concentrations during the First Year of Life in Benin, West Africa." PLoS One **10**(6).

Adegnika, A. A., J. J. Verweij, S. T. Agnandji, S. K. Chai, L. P. Breitling, M. Ramharter, M. Frolich, S. Issifou, P. G. Kremsner and M. Yazdanbakhsh (2006). "Microscopic and sub-microscopic Plasmodium falciparum infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight." Am J Trop Med Hyg **75**(5): 798-803.

Agudelo, O. M., B. H. Aristizabal, S. K. Yanow, E. Arango, J. Carmona-Fonseca and A. Maestre (2014). "Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia." Malar J **13**: 122.

Ahlonsou, L. S. and M. D. Houndonougbo (2005). Plan de développement de la commune de Tori-Bossito (2005-2009), Commune de Tori-Bossito: 142.

Alegre, E., A. Diaz-Lagares, J. Lemaoult, N. Lopez-Moratalla, E. D. Carosella and A. Gonzalez (2007). "Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy." Hum Immunol **68**(8): 661-667.

Alegre, E., R. Rizzo, D. Bortolotti, S. Fernandez-Landazuri, E. Fainardi and A. Gonzalez (2014). "Some Basic Aspects of HLA-G Biology." J Immunol Res.

Amiot, L., S. Ferrone, H. Grosse-Wilde and B. Seliger (2011). "Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention?" Cellular and Molecular Life Sciences **68**(3): 417-431.

Amiot, L., N. Vu and M. Samson (2014). "Immunomodulatory Properties of HLA-G in Infectious Diseases." J Immunol Res.

Amodio, G., R. S. de Albuquerque and S. Gregori (2014). "New insights into HLA-G mediated tolerance." Tissue Antigens **84**(3): 255-263.

Andruff, H., N. Carraro, A. Thompson, P. Gaudreau and B. Louvet (2009). "Latent class growth modelling: A tutorial." Tutorials in Quantitative Methods for Psychology **5**(1): 11-24.

Ansell, J., K. A. Hamilton, M. Pinder, G. E. Walraven and S. W. Lindsay (2002). "Short-range attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae* mosquitoes." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(2): 113-116.

Aponte, J. J., D. Schellenberg, A. Egan, A. Breckenridge, I. Carneiro, J. Critchley, I. Danquah, A. Doodoo, R. Kobbe, B. Lell, J. May, Z. Premji, S. Sanz, E. Sevene, R. Soulaymani-Becheikh, P. Winstanley, S. Adjei, S. Anemana, D. Chandramohan, S. Issifou, F. Mockenhaupt, S. Owusu-Agyei, B. Greenwood, M. P. Grobusch, P. G. Kremsner, E. Macete, H. Mshinda, R. D. Newman, L. Slutsker, M. Tanner, P. Alonso and C. Menendez (2009). "Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials." Lancet **374**(9700): 1533-1542.

Apps, R., L. Gardner and A. Moffett (2008). "A critical look at HLA-G." Trends in Immunology **29**(7): 313-321.

Ashley, E., R. McGready, S. Proux and F. Nosten (2006). "Malaria." Travel Med Infect Dis **4**(3-4): 159-173.

Attia, M. A., N. A. Nosair, A. Gawally, G. Elnagar and E. M. Elshafey (2014). "HLA-G Expression as a Prognostic Indicator in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia." Acta Haematologica **132**(1): 53-58.

Autino, B., A. Noris, R. Russo and F. Castelli (2012). "Epidemiology of malaria in endemic areas." Mediterr J Hematol Infect Dis **4**(1): e2012060.

Avokpaho, E. (2014). Association entre le niveau de HLA-G soluble et les infections helminthiques au cours de la grossesse : étude exploratoire au sud-Bénin. Master of research, Conservatoire national des arts et métiers

Ayres Pereira, M., T. Mandel Clausen, C. Pehrson, Y. Mao, M. Resende, M. Daugaard, A. Riis Kristensen, C. Spliid, L. Mathiesen, E. K. L, P. Damm, G. T. T, R. H. S, A. N. M and A. Salanti (2016). "Placental Sequestration of *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Is Mediated by the Interaction Between VAR2CSA and Chondroitin Sulfate A on Syndecan-1." PLoS Pathog **12**(8): e1005831.

Bardi, R., I. Sfar, H. Aounallah-Skhiri, C. Kallala, E. Abderrahim, T. Ben Abdallah and Y. Gorgi (2011). "Soluble human leukocyte antigen-G (SHLA-G) in Tunisian kidney transplantation." Arch Inst Pasteur Tunis **88**(1-4): 42-46.

Barker, E. D., J. R. Seguin, H. R. White, M. E. Bates, E. Lacourse, R. Carbonneau and R. E. Tremblay (2007). "Developmental trajectories of male physical violence and theft: relations to neurocognitive performance." Arch Gen Psychiatry **64**(5): 592-599.

Barsoum, R. S. (2000). "Malarial acute renal failure." J Am Soc Nephrol **11**(11): 2147-2154.

Bartoloni, A. and L. Zammarchi (2012). "Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria." Mediterr J Hematol Infect Dis **4**(1): e2012026.

Basturk, B., F. Karakayali, R. Emiroglu, O. Sozer, A. Haberal, D. Bal and M. Haberal (2006). "Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation." Transplantation Proceedings **38**(2): 571-574.

Battle, K. E., P. W. Gething, I. R. Elyazar, C. L. Moyes, M. E. Sinka, R. E. Howes, C. A. Guerra, R. N. Price, K. J. Baird and S. I. Hay (2012). "The global public health significance of *Plasmodium vivax*." Adv Parasitol **80**: 1-111.

Baudhuin, J., J. Migraine, V. Faivre, L. Loumagne, A. C. Lukaszewicz, D. Payen and B. Favier (2013). "Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(44): 17957-17962.

Beier, J. C., G. F. Killeen and J. I. Githure (1999). "Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa." Am J Trop Med Hyg **61**(1): 109-113.

Bernat, D. H., D. J. Erickson, R. Widome, C. L. Perry and J. L. Forster (2008). "Adolescent smoking trajectories: results from a population-based cohort study." J Adolesc Health **43**(4): 334-340.

Berveiller, P., S. Gil and F. Vialard (2016). "Placental perfusion: interest and limits." J Matern Fetal Neonatal Med: 1-2.

Biamonte, M. A., J. Wanner and K. G. Le Roch (2013). "Recent advances in malaria drug discovery." Bioorg Med Chem Lett **23**(10): 2829-2843.

Biedron, M., J. Rybka, T. Wrobel, I. Prajs, R. Poreba and K. Kuliczowski (2015). "The role of soluble HLA-G and HLA-G receptors in patients with hematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation." Medical Oncology **32**(8).

Biyik, I. (2014). "Maternal serum soluble HLA-G in complicated pregnancies." J Matern Fetal Neonatal Med **27**(4): 381-384.

Blaschitz, A., F. Lenfant, V. Mallet, M. Hartmann, A. Bensussan, D. E. Geraghty, P. Le Bouteiller and G. Dohr (1997). "Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G." Eur J Immunol **27**(12): 3380-3388.

Bortolotti, D., V. Gentili, A. Rotola, D. Di Luca and R. Rizzo (2014). "Implication of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms in human papillomavirus infection." Tissue Antigens **83**(2): 113-118.

Bourguignon, M., L. Yaghi, S. Flajollet, I. Radanne-Krawice, N. Rouas-Freiss, D. Lugin, J. P. Richalet, E. D. Carosella and P. Moreau (2010). "Increased soluble human leukocyte

antigen-G levels in peripheral blood from climbers on Mount Everest." Hum Immunol **71**(11): 1105-1108.

Brembilla, A., F. Mauny, A. Garcia, K. G. Koura, P. Deloron and J. F. Faucher (2016). "Antibiotics usage in infants during the first 18 months of life in Benin: a population-based cohort study." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **35**(4): 681-689.

Briand, V., J. Bottero, H. Noel, V. Masse, H. Cordel, J. Guerra, H. Kossou, B. Fayomi, P. Ayemonna, N. Fievet, A. Massougbojji and M. Cot (2009). "Intermittent treatment for the prevention of malaria during pregnancy in Benin: a randomized, open-label equivalence trial comparing sulfadoxine-pyrimethamine with mefloquine." J Infect Dis **200**(6): 991-1001.

Briand, V., S. Escolano, V. Journot, A. Massougbojji, M. Cot and P. Tubert-Bitter (2015). "Mefloquine Versus Sulfadoxine-Pyrimethamine for Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy: A Joint Analysis on Efficacy and Tolerability." Am J Trop Med Hyg **93**(2): 300-304.

Brick, C., O. Atouf, N. Benseffaj and M. Essakalli (2011). "Rejection of kidney graft: Mechanism and prevention." Nephrologie & Therapeutique **7**(1): 18-26.

Brock, P. M., K. M. Fornace, M. Parmiter, J. Cox, C. J. Drakeley, H. M. Ferguson and R. R. Kao (2016). "Plasmodium knowlesi transmission: integrating quantitative approaches from epidemiology and ecology to understand malaria as a zoonosis." Parasitology **143**(4): 389-400.

Broen, K., K. Brustoski, I. Engelmann and A. J. Luty (2007). "Placental Plasmodium falciparum infection: causes and consequences of in utero sensitization to parasite antigens." Mol Biochem Parasitol **151**(1): 1-8.

Brown, D., J. Trowsdale and R. Allen (2004). "The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease." Tissue Antigens **64**(3): 215-225.

Brown, H., T. T. Hien, N. Day, N. T. Mai, L. V. Chuong, T. T. Chau, P. P. Loc, N. H. Phu, D. Bethell, J. Farrar, K. Gatter, N. White and G. Turner (1999). "Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria." Neuropathol Appl Neurobiol **25**(4): 331-340.

Brown, H., S. Rogerson, T. Taylor, M. Tembo, J. Mwenechanya, M. Molyneux and G. Turner (2001). "Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children." Am J Trop Med Hyg **64**(3-4): 207-213.

Brown, J. L. and A. Eklund (1994). "Kin Recognition and the Major Histocompatibility Complex - an Integrative Review." American Naturalist **143**(3): 435-461.

Brugiere, O., G. Thabut, I. Krawice-Radanne, R. Rizzo, G. Dauriat, C. Danel, C. Suberbielle, H. Mal, M. Stern, C. Schilte, M. Pretolani, E. D. Carosella and N. Rouas-Freiss (2015). "Role of HLA-G as a Predictive Marker of Low Risk of Chronic Rejection in Lung Transplant

Recipients: A Clinical Prospective Study." American Journal of Transplantation **15**(2): 461-471.

Buzzi, M., F. Alviano, D. Campioni, M. Stignani, L. Melchiorri, A. Rotola, P. Tazzari, F. Ricci, C. Vaselli, A. Terzi, P. P. Pagliaro, A. Cuneo, F. Lanza, A. Bontadini, O. R. Baricordi and R. Rizzo (2012). "Umbilical cord blood CD34(+)cell-derived progeny produces human leukocyte antigen-G molecules with immuno-modulatory functions." Hum Immunol **73**(2): 150-155.

Cai, M. B., H. Q. Han, J. X. Bei, C. C. Liu, J. J. Lei, Q. Cui, Q. S. Feng, H. Y. Wang, J. X. Zhang, Y. Liang, L. Z. Chen, T. B. Kang, J. Y. Shao and Y. X. Zeng (2012). "Expression of Human Leukocyte Antigen G is associated with Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma." International Journal of Biological Sciences **8**(6): 891-900.

Cairo, C., N. Longinaker, G. Cappelli, R. G. Leke, M. M. Ondo, R. Djokam, J. Fogako, R. J. Leke, B. Sagnia, S. Sosso, V. Colizzi and C. D. Pauza (2014). "Cord blood Vgamma2Vdelta2 T cells provide a molecular marker for the influence of pregnancy-associated malaria on neonatal immunity." J Infect Dis **209**(10): 1653-1662.

Campbell, M. C. and S. A. Tishkoff (2008). "African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 403-433.

Carosella, E. D. (2011). "The tolerogenic molecule HLA-G." Immunol Lett **138**(1): 22-24.

Carosella, E. D. (2014). "HLA-G: from fetomaternal tolerance to organ acceptance." Bulletin De L Academie Nationale De Medecine **198**(4-5): 801-812.

Carosella, E. D., J. Dausset and N. Rouas-Freiss (1999). "Immunotolerant functions of HLA-G." Cell Mol Life Sci **55**(3): 327-333.

Carosella, E. D., S. Gregori, N. Rouas-Freiss, J. LeMaoult, C. Menier and B. Favier (2011). "The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis." Cellular and Molecular Life Sciences **68**(3): 353-368.

Carosella, E. D., N. Rouas-Freiss, P. Paul and J. Dausset (1999). "HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex." Immunol Today **20**(2): 60-62.

Carosella, E. D., N. Rouas-Freiss, D. T. Roux, P. Moreau and J. LeMaoult (2015). "HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule." Adv Immunol **127**: 33-144.

Carvalho, B. O., S. C. Lopes, P. A. Nogueira, P. P. Orlandi, D. Y. Bargieri, Y. C. Blanco, R. Mamoni, J. A. Leite, M. M. Rodrigues, I. S. Soares, T. R. Oliveira, G. Wunderlich, M. V. Lacerda, H. A. del Portillo, M. O. Araujo, B. Russell, R. Suwanarusk, G. Snounou, L. Renia and F. T. Costa (2010). "On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes." J Infect Dis **202**(4): 638-647.

Castelli, E. C., C. T. Mendes-Junior, J. L. V. de Camargo and E. A. Donadi (2008). "HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population." Tissue Antigens **72**(2): 149-157.

Catamo, E., C. Addobbati, L. Segat, T. S. Fragoso, A. D. Barbosa, A. T. Dantas, H. D. Mariz, L. F. da Rocha, A. L. B. P. Duarte, L. Monasta, P. Sandrin-Garcia and S. Crovella (2014). "HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients." Tissue Antigens **84**(3): 308-315.

Catamo, E., L. Zupin, L. Segat, F. Celsi and S. Crovella (2015). "HLA-G and susceptibility to develop celiac disease." Human Immunology **76**(1): 36-41.

Chakravorty, S. J., K. R. Hughes and A. G. Craig (2008). "Host response to cytoadherence in Plasmodium falciparum." Biochem Soc Trans **36**(Pt 2): 221-228.

Chatenoud, L. and J.-F. o. Bach (2012). Immunologie - 6e édition, Lavoisier.

Chen, H. X., B. G. Chen, W. W. Shi, R. Zhen, D. P. Xu, A. F. Lin and W. H. Yan (2011). "Induction of cell surface human leukocyte antigen-G expression in pandemic H1N1 2009 and seasonal H1N1 influenza virus-infected patients." Human Immunology **72**(2): 159-165.

Chene, A., S. Houard, M. A. Nielsen, S. Hundt, F. D'Alessio, S. B. Sirima, A. J. Luty, P. Duffy, O. Leroy, B. Gamain and N. K. Viebig (2016). "Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report." Malar J **15**: 476.

Chinen, J. and R. H. Buckley (2010). "Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow." Journal of Allergy and Clinical Immunology **125**(2): S324-S335.

Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, R. Suwanarusk, S. Pukrittayakamee, P. Wilairatana, J. G. Beeson, N. P. Day and N. J. White (2012). "Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans." PLoS One **7**(4): e34509.

Christiansen, O. B., A. M. Kolte, M. Dahl, E. C. Larsen, R. Steffensen, H. S. Nielsen and T. V. Hviid (2012). "Maternal homozygosity for a 14 base pair insertion in exon 8 of the HLA-G gene and carriage of HLA class II alleles restricting HY immunity predispose to unexplained secondary recurrent miscarriage and low birth weight in children born to these patients." Hum Immunol **73**(7): 699-705.

Ciprandi, G., A. Corsico and P. Pisati (2014). "Serum-Soluble HLA-G Is Associated with Specific IgE in Patients with Allergic Rhinitis and Asthma." Inflammation **37**(5): 1630-1634.

Ciprandi, G. and M. DeAmici (2014). "Soluble HLA-G serum levels depend on allergy type and IgE levels." Allergy Rhinol (Providence) **5**(1): 9-11.

Cirulli, V., J. Zalatan, M. McMaster, R. Prinsen, D. R. Salomon, C. Ricordi, B. E. Torbett, P. Meda and L. Crisa (2006). "The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G." Diabetes **55**(5): 1214-1222.

Clark, D. A. (1997). "HLA-G finally does something!" American Journal of Reproductive Immunology **38**(2): 75-78.

Coetzee, M. (2004). "Distribution of the African malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex." Am J Trop Med Hyg **70**(2): 103-104.

Cohee, L. M., L. Kalilani-Phiri, P. Mawindo, S. Joshi, M. Adams, L. Kenefic, C. G. Jacob, T. E. Taylor and M. K. Laufer (2016). "Parasite dynamics in the peripheral blood and the placenta during pregnancy-associated malaria infection." Malar J **15**(1): 483.

Colbern, G. T., M. H. Chiang and E. K. Main (1994). "Expression of the Nonclassic Histocompatibility Antigen Hla-G by Preeclamptic Placenta." American Journal of Obstetrics and Gynecology **170**(5): 1244-1250.

Colonna, M., F. Navarro, T. Bellon, M. Llano, P. Garcia, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella and M. Lopez-Botet (1997). "A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells." Journal of Experimental Medicine **186**(11): 1809-1818.

Colonna, M., J. Samaridis, M. Cella, L. Angman, R. L. Allen, C. A. O'Callaghan, R. Dunbar, G. S. Ogg, V. Cerundolo and A. Rolink (1998). "Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules." J Immunol **160**(7): 3096-3100.

Corbel, V., R. N'Guessan, C. Brengues, F. Chandre, L. Djogbenou, T. Martin, M. Akogbeto, J. M. Hougard and M. Rowland (2007). "Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa." Acta Trop **101**(3): 207-216.

Cot, M., J. Y. Le Hesran, P. Miailhes, M. Esveld, D. Etya'ale and G. Breart (1995). "Increase of birth weight following chloroquine chemoprophylaxis during the first pregnancy: results of a randomized trial in Cameroon." Am J Trop Med Hyg **53**(6): 581-585.

Cottrell, G., B. Kouwaye, C. Pierrat, A. le Port, A. Bouraima, N. Fonton, M. N. Hounkonnou, A. Massougbdji, V. Corbel and A. Garcia (2012). "Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in Benin and its implications for cohort study." PLoS One **7**(1): e28812.

Cottrell, G., J. Y. Mary, D. Barro and M. Cot (2007). "The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa." Am J Trop Med Hyg **76**(5): 849-854.

Cottrell, G., A. Moussiliou, A. J. Luty, M. Cot, N. Fievet, A. Massougbdji, P. Deloron and N. Tuikue Ndam (2015). "Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight." Clin Infect Dis **60**(10): 1481-1488.

Courtin, D., J. Milet, A. Sabbagh, J. D. Massaro, E. C. Castelli, V. Jamonneau, B. Bucheton, C. Sese, B. Favier, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, E. A. Donadi and A. Garcia (2013). "HLA-G 3' UTR-2 haplotype is associated with Human African trypanosomiasis susceptibility." Infect Genet Evol **17**: 1-7.

Cox, D. R. (1975). "Partial Likelihood." Biometrika **62**(2): 269-276.

Cramer, J. P. (2015). "Plasmodium knowlesi malaria: Overview Focussing on Travel-Associated Infections." Curr Infect Dis Rep **17**(3): 469.

Crawley, J., C. Chu, G. Mtove and F. Nosten (2010). "Malaria in children." Lancet **375**(9724): 1468-1481.

Creput, C., A. Durrbach, B. Charpentier, E. D. Carosella and N. Rouas-Freiss (2003). "[HLA-G: immunoregulatory molecule involved in allograft acceptance]." Nephrologie **24**(8): 451-456.

Crisa, L., M. T. McMaster, J. K. Ishii, S. J. Fisher and D. R. Salomon (1997). "Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts." Journal of Experimental Medicine **186**(2): 289-298.

Crispim, J. C., C. T. Mendes-Junior, I. J. Wastowski, R. Costa, E. C. Castelli, L. T. Saber and E. A. Donadi (2008). "Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome." Tissue Antigens **71**(1): 35-41.

Crispim, J. C. D., T. G. A. Silva, F. J. D. Souto, F. F. Souza, C. L. Bassi, C. P. Soares, S. Zucoloto, P. Moreau, A. D. C. Martinelli and E. A. Donadi (2012). "Upregulation of soluble and membrane-bound human leukocyte antigen G expression is primarily observed in the milder histopathological stages of chronic hepatitis C virus infection." Human Immunology **73**(3): 258-262.

Crispim, J. C. O., R. A. Duarte, C. P. Soares, R. Costa, J. S. Silva, C. T. Mendes-Junior, I. J. Wastowski, L. P. Faggioni, L. T. Saber and E. A. Donadi (2008). "Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection." Transplant Immunology **18**(4): 361-367.

Crutcher, J. M. and S. L. Hoffman (1996). Malaria. Medical Microbiology. S. Baron. Galveston (TX).

Dahl, M., S. Djurisic and T. V. Hviid (2014). "The many faces of human leukocyte antigen-G: relevance to the fate of pregnancy." J Immunol Res **2014**: 591489.

Dahl, M. and T. V. Hviid (2012). "Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss." Hum Reprod Update **18**(1): 92-109.

Dahl, M., L. Klitkou, O. B. Christiansen, S. Djurisic, Z. M. Piosik, P. Skovbo, A. M. Moller, R. Steffensen and T. V. Hviid (2015). "Human leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy

part II: associations between maternal and fetal HLA-G genotypes and soluble HLA-G." Hum Immunol **76**(4): 260-271.

Damien, G. B., A. Djenontin, C. Rogier, V. Corbel, S. B. Bangana, F. Chandre, M. Akogbeto, D. Kinde-Gazard, A. Massougboji and M. C. Henry (2010). "Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin." Malar J **9**: 380.

Darmochwal-Kolarz, D., B. Kolarz, J. Rolinski, B. Leszczynska-Gorzela and J. Oleszczuk (2012). "The concentrations of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia." Folia Histochem Cytobiol **50**(2): 286-291.

Dauby, N., T. Goetghebuer, T. R. Kollmann, J. Levy and A. Marchant (2012). "Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections." Lancet Infect Dis **12**(4): 330-340.

Dechavanne, C., I. Sadissou, A. Bouraima, C. Ahouangninou, R. Amoussa, J. Milet, K. Moutairou, A. Massougboji, M. Theisen, E. J. Remarque, D. Courtin, G. Nuel, F. Migot-Nabias and A. Garcia (2016). "Acquisition of natural humoral immunity to *P. falciparum* in early life in Benin: impact of clinical, environmental and host factors." Sci Rep **6**: 33961.

Desai, M., F. O. ter Kuile, F. Nosten, R. McGready, K. Asamoah, B. Brabin and R. D. Newman (2007). "Epidemiology and burden of malaria in pregnancy." Lancet Infect Dis **7**(2): 93-104.

Deschaseaux, F., D. Delgado, V. Pistoia, M. Giuliani, F. Morandi and A. Durrbach (2011). "HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications." Cellular and Molecular Life Sciences **68**(3): 397-404.

Di Cristofaro, J., M. Reynaud-Gaubert, F. Carlini, P. Roubertoux, A. Loundou, A. Basire, C. Frassati, P. Thomas, C. Gomez and C. Picard (2015). "HLA-G*01:04 approximately UTR3 Recipient Correlates With Lower Survival and Higher Frequency of Chronic Rejection After Lung Transplantation." Am J Transplant **15**(9): 2413-2420.

Ding, S. X., J. B. Ma, Y. R. Hu, A. R. Hu, Q. Shen and G. S. Gao (2016). "Outcomes of Interferon/Ribavirin Therapy in Patients with HCV Defined by Expression of Plasma Soluble Human Leukocyte Antigen-G but Not IL-37." Med Sci Monit **22**: 1398-1402.

Djogbenou, L., N. Pasteur, S. Bio-Bangana, T. Baldet, S. R. Irish, M. Akogbeto, M. Weill and F. Chandre (2010). "Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex." Acta Trop **114**(2): 116-122.

Djurisic, S. and T. V. Hviid (2014). "HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia." Front Immunol **5**: 652.

Donadi, E. A., E. C. Castelli, A. Arnaiz-Villena, M. Roger, D. Rey and P. Moreau (2011). "Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association." Cell Mol Life Sci **68**(3): 369-395.

Donaghy, L., F. Gros, L. Amiot, C. Mary, A. Maillard, C. Guiguen and J. P. Gangneux (2007). "Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis." Clinical and Experimental Immunology **147**(2): 236-240.

Dondorp, A. M., P. A. Kager, J. Vreeken and N. J. White (2000). "Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria." Parasitol Today **16**(6): 228-232.

Dondorp, A. M., S. J. Lee, M. A. Faiz, S. Mishra, R. Price, E. Tjitra, M. Than, Y. Htut, S. Mohanty, E. Bin Yunus, R. Rahman, F. Nosten, N. M. Anstey, N. P. J. Day and N. J. White (2008). "The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria." Clinical Infectious Diseases **47**(2): 151-157.

Dorling, A., N. Monk and R. Lechler (2000). "HLA-G inhibits the transendothelial cell migration of human NK cells: A strategy for inhibiting xenograft rejection." Transplantation Proceedings **32**(5): 938-938.

Du, X., X. L. Wu, R. Li, Y. Zhang, Z. P. Fan, Z. S. Yi and Q. F. Liu (2008). "[Role of membrane-bound human leukocyte antigen G in inducing immune tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **28**(12): 2202-2203.

El-Chennawi, F. A., F. A. Auf, A. M. El-Diasty, M. A. El-Daim, S. M. El-Sherbiny, A. Ali, M. El-Baz, M. A. El-Hameed, P. Paul, E. C. Ibrahim, E. Carosella and M. A. Ghoneim (2005). "Expression of HLA-G in cancer bladder." Egypt J Immunol **12**(1): 57-64.

Elliott, R. L., X. P. Jiang, J. T. Phillips, B. G. Barnett and J. F. Head (2011). "Human Leukocyte Antigen G Expression in Breast Cancer: Role in Immunosuppression." Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals **26**(2): 153-157.

Ellis, S. (1990). "Hla-G - at the Interface." American Journal of Reproductive Immunology **23**(3): 84-86.

Ellis, S. A., I. L. Sargent, C. W. G. Redman and A. J. McMichael (1986). "Evidence for a Novel Hla-Antigen Found on Human Extravillous Trophoblast and a Choriocarcinoma Cell-Line." Immunology **59**(4): 595-601.

ERAILS, T. a. p. o. a. (2014). "Cartographie de la commune d'Allada." from <http://www.erails.net/BJ/nf-benin/allada-2014/>.

Ezeakile, M., V. Portik-Dobos, J. Wu, D. D. Horuzsko, R. Kapoor, M. Jagadeesan, L. L. Mulloy and A. Horuzsko (2014). "HLA-G Dimers in the Prolongation of Kidney Allograft Survival." Journal of Immunology Research.

Fabris, A., L. Segat, E. Catamo, M. Morgutti, A. Vendramin and S. Crovella (2011). "HLA-G 14 bp Deletion/Insertion Polymorphism in Celiac Disease." American Journal of Gastroenterology **106**(1): 139-144.

- Farid, E., F. Al-Wedaie, K. Tabbara, A. E. El-Agroudy and S. M. Al-Ghareeb (2015). "Human leukocyte antigen G and renal allograft transplant." Exp Clin Transplant **13 Suppl 1**: 371-376.
- Foucault, M. L., V. Moules, M. Rosa-Calatrava and B. Riteau (2011). "Role for proteases and HLA-G in the pathogenicity of influenza A viruses." Journal of Clinical Virology **51**(3): 155-159.
- Fried, M., M. Avril, R. Chaturvedi, P. Fernandez, J. Lograsso, D. Narum, M. A. Nielsen, A. V. Oleinikov, M. Resende, A. Salanti, T. Saveria, K. Williamson, A. Dicko, A. Scherf, J. D. Smith, T. G. Theander and P. E. Duffy (2013). "Multilaboratory approach to preclinical evaluation of vaccine immunogens for placental malaria." Infect Immun **81**(2): 487-495.
- Fuzzi, B., R. Rizzo, L. Criscuoli, I. Noci, L. Melchiorri, B. Scarselli, E. Bencini, A. Menicucci and O. R. Baricordi (2002). "HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy." Eur J Immunol **32**(2): 311-315.
- Gallegos, C. E., S. Michelin, D. Dubner and E. D. Carosella (2016). "Immunomodulation of classical and non-classical HLA molecules by ionizing radiation." Cellular Immunology **303**: 16-23.
- Gangneux, J. P., Y. Poinsignon, L. Donaghy, L. Amiot, K. Tarte, C. Mary and F. Robert-Gangneux (2013). "Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as a potential biomarker of immune suppression during visceral leishmaniasis." Innate Immunity **19**(6): 564-568.
- Garcia, A., V. Jamonneau, E. Magnus, C. Laveissiere, V. Lejon, P. N'Guessan, L. N'Dri, N. Van Meirvenne and P. Buscher (2000). "Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population." Trop Med Int Health **5**(11): 786-793.
- Garcia, A., J. Milet, D. Courtin, A. Sabbagh, J. D. Massaro, E. C. Castelli, F. Migot-Nabias, B. Favier, N. Rouas-Freiss, E. A. Donadi and P. Moreau (2013). "Association of HLA-G 3' UTR polymorphisms with response to malaria infection: A first insight." Infection Genetics and Evolution **16**: 263-269.
- Gebreegiabiher, D., K. Desta, G. Desalegn, R. Howe and M. Abebe (2014). "The effect of maternal helminth infection on maternal and neonatal immune function and immunity to tuberculosis." PLoS One **9**(4): e93429.
- Gething, P. W., A. P. Patil, D. L. Smith, C. A. Guerra, I. R. Elyazar, G. L. Johnston, A. J. Tatem and S. I. Hay (2011). "A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010." Malar J **10**: 378.
- Gillio-Tos, A., G. Bicalho Mda, V. Fiano, C. Grasso, V. Tarallo, L. De Marco, M. Trevisan, M. Xavier, R. Slowik, N. S. Carvalho, C. A. Maestri, H. M. Lacerda, D. Zugna, L. Richiardi and F. Merletti (2012). "Case-control study of HLA-G promoter methylation status, HPV infection and cervical neoplasia in Curitiba, Brazil: a pilot analysis." BMC Cancer **12**: 618.

Gimenes, F., J. J. V. Teixeira, A. L. P. de Abreu, R. P. Souza, M. W. Pereira, V. R. S. da Silva, C. G. Boer, S. S. Maria-Engler, M. G. Bonini, S. D. Borelli and M. E. L. Consolaro (2014). "Human leukocyte antigen (HLA)-G and cervical cancer immunoediting: A candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker?" Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer **1846**(2): 576-589.

Gineau, L., D. Courtin, M. Camara, H. Ilboudo, V. Jamonneau, F. C. Dias, L. Tokplonou, J. Milet, P. B. Mendonca, E. C. Castelli, O. Camara, M. Camara, B. Favier, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, E. A. Donadi, B. Bucheton, A. Sabbagh and A. Garcia (2016). "Human leukocyte antigen-G: a promising prognostic marker of disease progression to improve the control of human African trypanosomiasis." Clin Infect Dis.

Gonzalez, R., G. Mombo-Ngoma, S. Ouedraogo, M. A. Kakolwa, S. Abdulla, M. Accrombessi, J. J. Aponte, D. Akerey-Diop, A. Basra, V. Briand, M. Capan, M. Cot, A. M. Kabanywany, C. Kleine, P. G. Kremsner, E. Macete, J. R. Mackanga, A. Massougbdgi, A. Mayor, A. Nhacolo, G. Pahlavan, M. Ramharter, M. Ruperez, E. Sevene, A. Vala, R. Zoleko-Manego and C. Menendez (2014). "Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with mefloquine in HIV-negative women: a multicentre randomized controlled trial." PLoS Med **11**(9): e1001733.

Guillaume, N. and J. P. Marolleau (2013). "Is immune escape via human leukocyte antigen expression clinically relevant in chronic lymphocytic leukemia? Focus on the controversies." Leukemia Research **37**(4): 473-477.

Guo, Q. Y., B. G. Chen, Y. Y. Ruan, A. Lin and W. H. Yan (2011). "HLA-G expression is irrelevant to prognosis in patients with acute myeloid leukemia." Leukemia Research **35**(10): 1350-1354.

Hackmon, R., M. Hallak, M. Krup, D. Weitzman, E. Sheiner, B. Kaplan and Y. Weinstein (2004). "HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy." Fetal Diagn Ther **19**(5): 404-409.

Han, M. Y., Y. Z. Jiang, K. X. Lao, X. Y. Xu, S. W. Zhan, Y. L. Wang and X. M. Hu (2014). "sHLA-G Involved in the Apoptosis of Decidual Natural Killer Cells Following Toxoplasma gondii Infection." Inflammation **37**(5): 1718-1727.

Han, Q. Y., N. Li, Q. Q. Zhu, Z. Li, G. Y. Zhang, J. H. Chen, Y. Lv, Y. W. Wang, Z. W. Liu and C. Q. Hao (2014). "Association of serum soluble human leukocyte antigen-G levels with chronic hepatitis B virus infection." Clinical and Experimental Medicine **14**(1): 35-43.

Hay, S. I., D. L. Smith and R. W. Snow (2008). "Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission." Lancet Infect Dis **8**(6): 369-378.

Hiby, S. E., A. King, A. Sharkey and Y. W. Loke (1999). "Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo." Tissue Antigens **53**(1): 1-13.

- Higgins, J. R. and M. de Swiet (2001). "Blood-pressure measurement and classification in pregnancy." Lancet **357**(9250): 131-135.
- Hoeve, M., A. Blokland, J. S. Dubas, R. Loeber, J. R. Gerris and P. H. van der Laan (2008). "Trajectories of delinquency and parenting styles." J Abnorm Child Psychol **36**(2): 223-235.
- Hong, H. A., M. Paximadis, G. E. Gray, L. Kuhn and C. T. Tiemessen (2015). "Maternal human leukocyte antigen-G (HLA-G) genetic variants associate with in utero mother-to-child transmission of HIV-1 in Black South Africans." Infection Genetics and Evolution **30**: 147-158.
- Hora, R., P. Kapoor, K. K. Thind and P. C. Mishra (2016). "Cerebral malaria--clinical manifestations and pathogenesis." Metab Brain Dis **31**(2): 225-237.
- Houlihan, J. M., P. A. Biro, H. M. Harper, H. J. Jenkinson and C. H. Holmes (1995). "The Human Amnion Is a Site of Mhc Class Ib Expression - Evidence for the Expression of Hla-E and Hla-G." Journal of Immunology **154**(11): 5665-5674.
- Houssou, V. M. C., M. B. Hounsou, U. C. S. Y. Alle, C. S. Houssou and E. K. Agbossou (2016). "Rainfall variability and impact on the water balance of soils under pineapple cultivation in the southeast Benin." International Journal of Innovation and Applied Studies **15**(4): 830-845.
- HoWangYin, K. Y., M. Loustau, J. Wu, E. Alegre, M. Daouya, J. Caumartin, S. Sousa, A. Horuzsko, E. D. Carosella and J. LeMaout (2012). "Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors." Cellular and Molecular Life Sciences **69**(23): 4041-4049.
- Hu, W. Y., L. Q. Wu, Z. Su, X. F. Pang and B. Zhang (2014). "Expression of human leukocyte antigen-G and acute rejection in patients following liver transplantation." Experimental and Therapeutic Medicine **8**(4): 1291-1295.
- Huang, J. H., P. Burke, Y. Yang, K. Seiss, J. Beamon, T. Cung, I. Toth, F. Pereyra, M. Lichterfeld and X. G. Yu (2010). "Soluble HLA-G Inhibits Myeloid Dendritic Cell Function in HIV-1 Infection by Interacting with Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor B2." Journal of Virology **84**(20): 10784-10791.
- Hunt, J. S., L. Jadhav, W. Chu, D. E. Geraghty and C. Ober (2000). "Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy." Am J Obstet Gynecol **183**(3): 682-688.
- Hunt, J. S., D. K. Langat, R. H. McIntire and P. J. Morales (2006). "The role of HLA-G in human pregnancy." Reprod Biol Endocrinol **4 Suppl 1**: S10.
- Hunt, J. S., M. G. Petroff, R. H. McIntire and C. Ober (2005). "HLA-G and immune tolerance in pregnancy." FASEB J **19**(7): 681-693.

Hussein, J., A. Hirose, O. Owolabi, M. Imamura, L. Kanguru and F. Okonofua (2016). "Maternal death and obstetric care audits in Nigeria: a systematic review of barriers and enabling factors in the provision of emergency care." Reprod Health **13**: 47.

Huynh, B. T., G. Cottrell, M. Cot and V. Briand (2015). "Burden of Malaria in Early Pregnancy: A Neglected Problem?" Clinical Infectious Diseases **60**(4): 598-604.

Huynh, B. T., N. Fievet, G. Gbaguidi, S. Dechavanne, S. Borgella, B. Guezo-Mevo, A. Massougboji, N. T. Ndam, P. Deloron and M. Cot (2011). "Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin." Am J Trop Med Hyg **85**(2): 214-220.

Hviid, L. and A. T. Jensen (2015). "PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis." Adv Parasitol **88**: 51-84.

Hviid, T. V. (2006). "HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications." Hum Reprod Update **12**(3): 209-232.

Hviid, T. V. F., L. G. Larsen, A. M. Hoegh and M. Bzorek (2004). "HLA-G expression in placenta in relation to HLA-G genotype and polymorphisms." American Journal of Reproductive Immunology **52**(3): 212-217.

Hviid, T. V. F., N. Milman, S. Hylenius, K. Jakobsens, M. S. Jensens and L. G. Larsen (2006). "HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis." Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases **23**(1): 30-37.

Hviid, T. V. F., R. Rizzo, L. Melchiorri, M. Stignani and O. R. Baricordi (2006). "Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression." Human Immunology **67**(1-2): 53-62.

Ibrahim, E. C., M. Morange, J. Dausset, E. D. Carosella and P. Paul (2000). "Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines." Cell Stress Chaperones **5**(3): 207-218.

Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin (2004). RGPH3: Cahier des villages et quartiers de ville-Département de l'ATLANTIQUE. Cotonou, Direction des Etudes Démographiques.

Institut national de la statistique et de l'analyse économique du Bénin (2015). RGPH4 : Que retenir des effectifs de population 2013 ? Cotonou, Direction des Etudes Démographiques.

Ioannidis, L. J., C. Q. Nie and D. S. Hansen (2014). "The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye." Parasitology **141**(5): 602-613.

Ito, T., N. Ito, M. Saathoff, B. Stampachiachiere, A. Bettermann, S. Bulfone-Paus, M. Takigawa, B. J. Nickoloff and R. Paus (2005). "Immunology of the human nail apparatus:

The nail matrix is a site of relative immune privilege." Journal of Investigative Dermatology **125**(6): 1139-1148.

Iversen, A. C., O. T. D. Nguyen, L. F. Tommerdal, I. P. Eide, V. M. Landsem, N. Acar, R. Myhre, H. Klungland and R. Austgulen (2008). "The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidual HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies." Journal of Reproductive Immunology **78**(2): 158-165.

Jafari-Guemouri, S., N. T. Ndam, G. Bertin, E. Renart, S. Sow, J. Y. Le Hesran and P. Deloron (2005). "Demonstration of a high level of parasite population homology by quantification of Plasmodium falciparum alleles in matched peripheral, placental, and umbilical cord blood samples." J Clin Microbiol **43**(6): 2980-2983.

Jamonneau, V., H. Ilboudo, J. Kabore, D. Kaba, M. Koffi, P. Solano, A. Garcia, D. Courtin, C. Laveissiere, K. Lingue, P. Buscher and B. Bucheton (2012). "Untreated human infections by Trypanosoma brucei gambiense are not 100% fatal." PLoS Negl Trop Dis **6**(6): e1691.

Jeong, S., S. Park, B. W. Park, Y. Park, O. J. Kwon and H. S. Kim (2014). "Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Polymorphism and Expression in Breast Cancer Patients." Plos One **9**(5).

Jiang, Y., S. Chen, S. Jia, Z. Zhu, X. Gao, D. Dong and Y. Gao (2011). "Association of HLA-G 3' UTR 14-bp insertion/deletion polymorphism with hepatocellular carcinoma susceptibility in a Chinese population." DNA Cell Biol **30**(12): 1027-1032.

Jin, H. L., C. R. Li, L. Xiao, B. Y. Shi, M. Cai, Z. L. Li, S. Wang, L. P. Chen, S. L. Zhan and P. C. Li (2012). "Clinical Relevance of sHLA-G-Mediated With Better Graft Acceptance in Early Posttransplantation." Transplantation Proceedings **44**(5): 1259-1261.

Jin, Z. K., C. X. Xu, P. X. Tian, W. J. Xue, X. M. Ding, J. Zheng, C. G. Ding, G. Q. Ge, T. C. Mao and Y. Lin (2012). "Impact of HLA-G 14-bp polymorphism on acute rejection and cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients from northwestern China." Transplant Immunology **27**(2-3): 69-74.

Jung, Y. W., Y. T. Kim, S. W. Kim, S. Kim, J. H. Kim, N. H. Cho and J. W. Kim (2009). "Correlation of Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression and Disease Progression in Epithelial Ovarian Cancer." Reproductive Sciences **16**(11): 1103-1111.

Juriscicova, A., R. F. Casper, N. J. MacLusky, G. B. Mills and C. L. Librach (1996). "HLA-G expression during preimplantation human embryo development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 161-165.

Kalilani, L., I. Mofolo, M. Chaponda, S. J. Rogerson and S. R. Meshnick (2010). "The effect of timing and frequency of Plasmodium falciparum infection during pregnancy on the risk of low birth weight and maternal anemia." Trans R Soc Trop Med Hyg **104**(6): 416-422.

Kamishikiryo, J. and K. Maenaka (2009). "HLA-G molecule." Curr Pharm Des **15**(28): 3318-3324.

Kamwendo, D. D., F. K. Dzinjalama, G. Snounou, M. C. Kanjala, C. G. Mhango, M. E. Molyneux and S. J. Rogerson (2002). "Plasmodium falciparum: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(2): 145-149.

Kaneku, H. (2006). "Detection of soluble HLA-G and its correlation with kidney transplant outcome." Clin Transpl: 447-454.

Kassberger, F., A. Birkenmaier, A. Khattab, P. G. Kremsner and M. Q. Klinkert (2002). "PCR typing of Plasmodium falciparum in matched peripheral, placental and umbilical cord blood." Parasitol Res **88**(12): 1073-1079.

Katz, J., A. C. Lee, N. Kozuki, J. E. Lawn, S. Cousens, H. Blencowe, M. Ezzati, Z. A. Bhutta, T. Marchant, B. A. Willey, L. Adair, F. Barros, A. H. Baqui, P. Christian, W. Fawzi, R. Gonzalez, J. Humphrey, L. Huybregts, P. Kolsteren, A. Mongkolkeha, L. C. Mullany, R. Ndyomugenyi, J. K. Nien, D. Osrin, D. Roberfroid, A. Sania, C. Schmiedel, M. F. Silveira, J. Tielsch, A. Vaidya, S. C. Velaphi, C. G. Victora, D. Watson-Jones, R. E. Black and C. S.-f.-G.-A.-P. B. W. Group (2013). "Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis." Lancet **382**(9890): 417-425.

Kelly-Hope, L. A. and F. E. McKenzie (2009). "The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa." Malar J **8**: 19.

Khalil-Daher, I., B. Riteau, C. Menier, C. Sedlik, P. Paul, J. Dausset, E. D. Carosella and N. Rouas-Freiss (1999). "Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself." J Reprod Immunol **43**(2): 175-182.

Khorrami, S., H. Mohammadpour, K. Shahzamani, M. N. Zarif, A. H. Sharifi, S. Merat and H. Poustchi (2015). "The relationship between HLA-G and viral loads in non-responder HCV-infected patients after combined therapy with IFN-alpha 2 alpha and ribavirin." Human Immunology **76**(2-3): 181-186.

Kim, S. K., J. H. Chung, D. H. Kim, D. H. Yun, S. J. Hong and K. H. Lee (2012). "Lack of association between promoter polymorphisms of HLA-G gene and rheumatoid arthritis in Korean population." Rheumatology International **32**(2): 509-512.

Kim, Y. J., Y. C. Hong, K. H. Lee, H. J. Park, E. A. Park, H. S. Moon and E. H. Ha (2005). "Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction." Reprod Toxicol **19**(4): 487-492.

King, R., R. Jackson, E. Dietsch and A. Hailemariam (2015). "Barriers and facilitators to accessing skilled birth attendants in Afar region, Ethiopia." Midwifery **31**(5): 540-546.

- Kiszewski, A., A. Mellinger, A. Spielman, P. Malaney, S. E. Sachs and J. Sachs (2004). "A global index representing the stability of malaria transmission." Am J Trop Med Hyg **70**(5): 486-498.
- Klein, J. and A. Sato (2000). "The HLA system. First of two parts." N Engl J Med **343**(10): 702-709.
- Klitkou, L., M. Dahl, T. V. Hviid, S. Djuricic, Z. M. Piosik, P. Skovbo, A. M. Moller, R. Steffensen and O. B. Christiansen (2015). "Human leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy part I: correlations between maternal soluble HLA-G at midterm, at term, and umbilical cord blood soluble HLA-G at term." Hum Immunol **76**(4): 254-259.
- Knafel, A., P. Basta, K. Pitynski, P. Mach, W. Bednarek, M. Klimek, J. Zietek, K. Zajac, L. Dancewicz, M. Iwaniec, A. Basta and L. Wicherek (2009). "Soluble HLA-G changes in maternal blood serum during the progression of labor." Neuro Endocrinol Lett **30**(1): 67-73.
- Kotze, D., T. F. Kruger, C. Lombard, T. Padayachee, L. Keskinetepe and G. Sher (2013). "The effect of the biochemical marker soluble human leukocyte antigen G on pregnancy outcome in assisted reproductive technology--a multicenter study." Fertil Steril **100**(5): 1303-1309.
- Kovats, S., E. K. Main, C. Librach, M. Stubblebine, S. J. Fisher and R. Demars (1990). "A Class-I Antigen, Hla-G, Expressed in Human Trophoblasts." Science **248**(4952): 220-223.
- Kowal, A., A. Wisniewski, P. Kusnierczyk and R. Jankowska (2015). "Human leukocyte antigen (HLA)-G gene polymorphism in patients with non-small cell lung cancer." Thoracic Cancer **6**(5): 613-619.
- Kraemer, S. M. and J. D. Smith (2006). "A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease." Curr Opin Microbiol **9**(4): 374-380.
- Kuhn, K. G., D. H. Campbell-Lendrum and C. R. Davies (2002). "A continental risk map for malaria mosquito (Diptera : Culicidae) vectors in Europe." Journal of Medical Entomology **39**(4): 621-630.
- Kumar, A., R. Moirangthem, S. K. Gahlawat, J. Chandra, P. Gupta, N. Valecha, A. Anvikar and V. Singh (2015). "Emergence of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Indian isolates of Plasmodium falciparum in the last two decades." Infect Genet Evol **36**: 190-198.
- Laaribi, A. B., I. Zidi, N. Hannachi, H. Ben Yahia, H. Chaouch, D. Bortolotti, N. Zidi, A. Letaief, S. Yacoub, A. Boudabous, R. Rizzo and J. Boukadida (2015). "Association of an HLA-G 14-bp Insertion/Deletion polymorphism with high HBV replication in chronic hepatitis." Journal of Viral Hepatitis **22**(10): 835-841.
- Labeaud, A. D., I. Malhotra, M. J. King, C. L. King and C. H. King (2009). "Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination?" PLoS Negl Trop Dis **3**(5): e442.

Lafon, M., C. Prehaud, F. Megret, M. Lafage, G. Mouillot, M. Roa, P. Moreau, N. Rouas-Freiss and E. D. Carosella (2005). "Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections." Journal of Virology **79**(24): 15226-15237.

Lagerberg, R. E. (2008). "Malaria in pregnancy: a literature review." J Midwifery Womens Health **53**(3): 209-215.

Lajoie, J., J. Fontaine, C. Tremblay, J. P. Routy, J. Poudrier and M. Roger (2009). "Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection." Aids **23**(11): 1437-1440.

Laloo, D. G., D. Shingadia, D. J. Bell, N. J. Beeching, C. J. Whitty, P. L. Chiodini and P. H. E. A. C. o. M. P. i. U. Travellers (2016). "UK malaria treatment guidelines 2016." J Infect **72**(6): 635-649.

Larreche, S., C. Rapp, H. Delacour, N. Sanmartin, C. Ficko, C. Bigaillon, D. Andriamanantena, J. E. Pilo and A. Merens (2014). "Sensitivity of parasitological tests in imported Plasmodium vivax malaria in adults and impact of chemoprophylaxis and attack type." J Travel Med **21**(3): 195-200.

Larsen, M. H., M. Bzorek, M. B. Pass, L. G. Larsen, M. W. Nielsen, S. G. Svendsen, A. Lindhard and T. V. Hviid (2011). "Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma." Mol Hum Reprod **17**(12): 727-738.

Lartey, A. (2008). "Maternal and child nutrition in Sub-Saharan Africa: challenges and interventions." Proc Nutr Soc **67**(1): 105-108.

Lawn, J. E., S. Cousens, J. Zupan and L. N. S. Steering (2005). "Neonatal survival 1 - 4 million neonatal deaths: When? where? why?" Lancet **365**(9462): 891-900.

Le Bouteiller, P. (2001). "Molécules HLA, immunité et gestation." Gynécologie obstétrique & fertilité **29**(7): 523-531.

Le Bouteiller, P. (2015). "HLA-G in human early pregnancy: control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling." Biomed J **38**(1): 32-38.

Le Bouteiller, P. and F. Lenfant (1997). "Gène HLA-G: le plus classique des non classiques."

Le Bouteiller, P., C. Solier, J. Proll, M. Aguerre-Girr, S. Fournel and F. Lenfant (1999). "Mini symposium - The major histocompatibility complex in pregnancy: Part II - Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for?" Hum Reprod Update **5**(3): 223-233.

Le Discorde, M., P. Moreau, P. Sabatier, J. M. Legeais and E. D. Carosella (2003). "Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue." Hum Immunol **64**(11): 1039-1044.

Le Hesran, J. Y., M. Cot, P. Personne, N. Fievet, B. Dubois, M. Beyeme, C. Boudin and P. Deloron (1997). "Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life." *Am J Epidemiol* **146**(10): 826-831.

Le Maux, A., G. Noel, B. Birebent, J. M. Grosset, N. Vu, S. De Guibert, M. Bernard, G. Semana and L. Amiot (2008). "Soluble human leucocyte antigen-G molecules in peripheral blood haematopoietic stem cell transplantation: a specific role to prevent acute graft-versus-host disease and a link with regulatory T cells." *Clinical and Experimental Immunology* **152**(1): 50-56.

Le Port, A., G. Cottrell, F. Chandre, M. Cot, A. Massougbdji and A. Garcia (2013). "Importance of adequate local spatiotemporal transmission measures in malaria cohort studies: application to the relation between placental malaria and first malaria infection in infants." *Am J Epidemiol* **178**(1): 136-143.

Le Port, A., G. Cottrell, Y. Martin-Prevel, F. Migot-Nabias, M. Cot and A. Garcia (2012). "First malaria infections in a cohort of infants in Benin: biological, environmental and genetic determinants. Description of the study site, population methods and preliminary results." *BMJ Open* **2**(2): e000342.

Le Port, A., L. Watier, G. Cottrell, S. Ouedraogo, C. Dechavanne, C. Pierrat, A. Rachas, J. Bouscaillou, A. Bouraima, A. Massougbdji, B. Fayomi, A. Thiebaut, F. Chandre, F. Migot-Nabias, Y. Martin-Prevel, A. Garcia and M. Cot (2011). "Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and environmental factors." *PLoS One* **6**(11): e27516.

LeBouder, F., K. Khoufache, C. Menier, Y. Mandouri, M. Keffous, N. Lejal, I. Krawice-Radanne, E. D. Carosella, N. Rouas-Freiss and B. Riteau (2009). "Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection." *Human Immunology* **70**(12): 1016-1019.

Lee, Y. H., S. C. Bae and G. G. Song (2015). "Meta-analysis of associations between functional HLA-G polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." *Rheumatology International* **35**(6): 953-961.

Lelliott, P. M., B. J. McMorran, S. J. Foote and G. Burgio (2015). "The influence of host genetics on erythrocytes and malaria infection: is there therapeutic potential?" *Malar J* **14**: 289.

LeMaoult, J., M. Daouya, J. Wu, M. Loustau, A. Horuzsko and E. D. Carosella (2013). "Synthetic HLA-G proteins for therapeutic use in transplantation." *Faseb Journal* **27**(9): 3643-3651.

LeMaoult, J., K. Zafaranloo, C. Le Danff and E. D. Carosella (2005). "HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells." *Faseb Journal* **19**(1): 662-+.

- Levine, R. S., A. T. Peterson and M. Q. Benedict (2004). "Distribution of members of *Anopheles quadrimaculatus* Say s.l. (Diptera : Culicidae) and implications for their roles in malaria transmission in the United States." Journal of Medical Entomology **41**(4): 607-613.
- Li, B. L., A. Lin, X. J. Zhang, X. Zhang, J. G. Zhang, Q. Wang, W. J. Zhou, H. X. Chen, T. J. Wang and W. H. Yan (2009). "Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma." Tissue Antigens **74**(3): 213-221.
- Li, J., C. Koike-Soko, J. Sugimoto, T. Yoshida, M. Okabe and T. Nikaido (2015). "Human Amnion-Derived Stem Cells Have Immunosuppressive Properties on NK Cells and Monocytes." Cell Transplantation **24**(10): 2065-2076.
- Lila, N., C. Amrein, R. Guillemain, P. Chevalier, C. Latremouille, J. N. Fabiani, J. Dausset, E. D. Carosella and A. Carpentier (2002). "Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection." Circulation **105**(16): 1949-1954.
- Lila, N., A. Carpentier, C. Amrein, I. Khalil-Daher, J. Dausset and E. D. Carosella (2000). "Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance." Lancet **355**(9221): 2138-2138.
- Lin, A., H. X. Chen, C. C. Zhu, X. Zhang, H. H. Xu, J. G. Zhang, Q. Wang, W. J. Zhou and W. H. Yan (2010). "Aberrant human leukocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma." Journal of Cellular and Molecular Medicine **14**(8): 2162-2171.
- Lin, A. F., X. Zhang, W. J. Zhou, Y. Y. Ruan, D. P. Xu, Q. Wang and W. H. Yan (2011). "Human leukocyte antigen-G expression is associated with a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." International Journal of Cancer **129**(6): 1382-1390.
- Lindsay, S., J. Ansell, C. Selman, V. Cox, K. Hamilton and G. Walraven (2000). "Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes." Lancet **355**(9219): 1972.
- Liu, H., Y. K. Chen, L. Xuan, X. L. Wu, Y. Zhang, Z. P. Fan, F. Huang, X. Zhang, Q. L. Jiang, J. Sun and Q. F. Liu (2013). "Soluble Human Leukocyte Antigen G Molecule Expression in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Good Predictor of Acute Graft-versus-Host Disease." Acta Haematologica **130**(3): 160-168.
- Luque, J., M. I. Torres, M. D. Aumente, J. M. Lozano, G. Garcia-Jurado, R. Gonzalez, M. R. Alvarez-Lopez, J. M. Arizon and J. Pena (2006). "sHLA-G levels in the monitoring of immunosuppressive therapy and rejection following heart transplantation." Transplant Immunology **17**(1): 70-73.
- Macdonald, G. (1956). "Epidemiological basis of malaria control." Bull World Health Organ **15**(3-5): 613-626.
- Macdonald, G. (1957). The epidemiology and control of malaria. London, New York., Oxford University Press.

Mackintosh, C. L., J. G. Beeson and K. Marsh (2004). "Clinical features and pathogenesis of severe malaria." Trends Parasitol **20**(12): 597-603.

Maitland, K. (2015). "Management of severe paediatric malaria in resource-limited settings." BMC Med **13**: 42.

Maitland, K. and K. Marsh (2004). "Pathophysiology of severe malaria in children." Acta Trop **90**(2): 131-140.

Malhotra, I., A. Dent, P. Mungai, A. Wamachi, J. H. Ouma, D. L. Narum, E. Muchiri, D. J. Tisch and C. L. King (2009). "Can Prenatal Malaria Exposure Produce an Immune Tolerant Phenotype?: A Prospective Birth Cohort Study in Kenya." PLoS Med **6**(7).

Manguin, S., C. Garros, I. Dusfour, R. E. Harbach and M. Coosemans (2008). "Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of Anopheles subgenus Cellia in Southeast Asia: an updated review." Infect Genet Evol **8**(4): 489-503.

Mankhambo, L., M. Kanjala, S. Rudman, V. M. Lema and S. J. Rogerson (2002). "Evaluation of the OptiMAL rapid antigen test and species-specific PCR to detect placental Plasmodium falciparum infection at delivery." J Clin Microbiol **40**(1): 155-158.

Martelli-Palomino, G., J. A. Pancotto, Y. C. Muniz, C. T. Mendes-Junior, E. C. Castelli, J. D. Massaro, I. Krawice-Radanne, I. Poras, V. Rebmann, E. D. Carosella, N. Rouas-Freiss, P. Moreau and E. A. Donadi (2013). "Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population." PLoS One **8**(10): e71742.

Matangila, J. R., P. Mitashi, R. A. Inocencio da Luz, P. T. Lutumba and J. P. Van Geertruyden (2015). "Efficacy and safety of intermittent preventive treatment for malaria in schoolchildren: a systematic review." Malar J **14**: 450.

Mayengue, P. I., H. Rieth, A. Khattab, S. Issifou, P. G. Kremsner, M. Q. Klinkert and F. Ntoumi (2004). "Submicroscopic Plasmodium falciparum infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women." Trop Med Int Health **9**(9): 949-958.

McDevitt, M. A., J. Xie, V. Gordeuk and R. Bucala (2004). "The anemia of malaria infection: role of inflammatory cytokines." Curr Hematol Rep **3**(2): 97-106.

McFee, R. B. (2013). "Malaria (Plasmodium)." Dis Mon **59**(12): 441-442.

Medana, I. M. and G. D. Turner (2006). "Human cerebral malaria and the blood-brain barrier." Int J Parasitol **36**(5): 555-568.

Mehta, R. S., A. Rodriguez, M. Chico, I. Guadalupe, N. Broncano, C. Sandoval, F. Tupiza, E. Mitre and P. J. Cooper (2012). "Maternal geohelminth infections are associated with an

increased susceptibility to geohelminth infection in children: a case-control study." PLoS Negl Trop Dis **6**(7): e1753.

Metcalfe, S., M. Roger, M. C. Faucher, F. Coutlee, E. L. Franco and P. Brassard (2013). "The association between human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphisms and human papillomavirus (HPV) infection in Inuit women of northern Quebec." Human Immunology **74**(12): 1610-1615.

Miller, L. H., M. F. Good and G. Milon (1994). "Malaria pathogenesis." Science **264**(5167): 1878-1883.

Milner, D. A., J. Montgomery, K. B. Seydel and S. J. Rogerson (2008). "Severe malaria in children and pregnancy: an update and perspective." Trends in Parasitology **24**(12): 590-595.

Min, J., B. Park, Y. J. Kim, H. Lee, E. Ha and H. Park (2009). "Effect of oxidative stress on birth sizes: consideration of window from mid pregnancy to delivery." Placenta **30**(5): 418-423.

Ministère de la santé du Bénin (2014). Annuaire des statistiques sanitaires 2013. Cotonou, Direction de la programmation et de la prospective.

Misra, M. K., S. Prakash, R. Kapoor, S. K. Pandey, R. K. Sharma and S. Agrawal (2013). "Association of HLA-G promoter and 14-bp insertion-deletion variants with acute allograft rejection and end-stage renal disease." Tissue Antigens **82**(5): 317-326.

Monneret, G., N. Voirin, I. Krawice-Radanne, J. Bohe, A. Lepape, N. Rouas-Freiss and E. D. Carosella (2007). "Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: Marked and persisting elevation as a predictor of survival." Critical Care Medicine **35**(8): 1942-1947.

Montoya, A. E., J. Menco, N. Osorio, M. A. Zuluaga, J. Duque, G. Torres and M. Restrepo (2008). "Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis." Biomedica **28**(2): 252-261.

Moreau, P., F. Adrian-Cabestre, C. Menier, V. Guiard, L. Gourand, J. Dausset, E. D. Carosella and P. Paul (1999). "IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes." Int Immunol **11**(5): 803-811.

Moreau, P., S. Flajollet and E. D. Carosella (2009). "Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update." Journal of Cellular and Molecular Medicine **13**(9B): 2973-2989.

Moya-Alvarez, V., R. Abellana and M. Cot (2014). "Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences." Malar J **13**: 271.

Murdaca, G., P. Contini, P. Cagnati, S. Marengo, G. Pieri, F. Lantieri, A. Picciotto and F. Puppò (2015). "Behavior of soluble HLA-A, -B, -C and HLA-G molecules in patients with chronic hepatitis C virus infection undergoing pegylated interferon-alpha and ribavirin treatment: potential role as markers of response to antiviral therapy." Clin Exp Med.

- Murdaca, G., P. Contini, S. Negrini, G. Ciprandi and F. Puppo (2016). "Immunoregulatory Role of HLA-G in Allergic Diseases." J Immunol Res **2016**: 6865758.
- Murdaca, G., P. Contini, M. Setti, P. Cagnati, F. Lantieri, F. Indiveri and F. Puppo (2009). "Behavior of non-classical soluble HLA class G antigens in human immunodeficiency virus 1-infected patients before and after HAART: Comparison with classical soluble HLA-A, -B, -C antigens and potential role in immune-reconstitution." Clinical Immunology **133**(2): 238-244.
- Murdaca, G., P. Contini, M. Setti, P. Cagnati, F. Spano, F. Lantieri and F. Puppo (2011). "Soluble human leukocyte antigen-G serum levels in patients with acquired immune deficiency syndrome affected by different disease-defining conditions before and after antiretroviral treatment." Human Immunology **72**(9): 712-716.
- Murray, C. K., R. A. Gasser, Jr., A. J. Magill and R. S. Miller (2008). "Update on rapid diagnostic testing for malaria." Clin Microbiol Rev **21**(1): 97-110.
- Mutabingwa, T. K., M. C. Bolla, J. L. Li, G. J. Domingo, X. Li, M. Fried and P. E. Duffy (2005). "Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria." PLoS Med **2**(12): e407.
- N'Dao, C. T., J. L. N'Diaye, A. Gaye and J. Y. Le Hesran (2006). "[Placental malaria and pregnancy outcome in a peri urban area in Senegal]." Rev Epidemiol Sante Publique **54**(2): 149-156.
- Nagin, D. (2005). Group-based modeling of development. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
- Naing, C., N. K. Sandhu and V. N. Wai (2016). "The Effect of Malaria and HIV Co-Infection on Anemia: A Meta-Analysis." Medicine (Baltimore) **95**(14): e3205.
- Naing, C., M. A. Whittaker, V. N. Wai and J. W. Mak (2014). "Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis." Plos Neglected Tropical Diseases **8**(8).
- Naji, A., S. Le Rond, A. Durrbach, I. Krawice-Radanne, C. Creput, M. Daouya, J. Caumartin, J. LeMaoult, E. D. Carosella and N. Rouas-Freiss (2007). "CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance." Blood **110**(12): 3936-3948.
- Naji, A., C. Menier, F. Morandi, S. Agaue, G. Maki, E. Ferretti, S. Bruel, V. Pistoia, E. D. Carosella and N. Rouas-Freiss (2014). "Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses." J Immunol **192**(4): 1536-1546.
- Nangbe, F. (2006). Monographie de la commune d'Allada. Bénin Afrique Conseil: 37 pages.

- Ndam, N. T., L. Denoed-Ndam, J. Doritchamou, F. Viwami, A. Salanti, M. A. Nielsen, N. Fievet, A. Massougboji, A. J. Luty and P. Deloron (2015). "Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor Outcomes during Pregnancy, Benin." Emerg Infect Dis **21**(5): 813-823.
- Newbold, C., A. Craig, S. Kyes, A. Rowe, D. Fernandez-Reyes and T. Fagan (1999). "Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*." Int J Parasitol **29**(6): 927-937.
- Newton, C. R. and S. Krishna (1998). "Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment." Pharmacol Ther **79**(1): 1-53.
- Noci, I., B. Fuzzi, R. Rizzo, L. Melchiorri, L. Criscuoli, S. Dabizzi, R. Biagiotti, S. Pellegrini, A. Menicucci and O. R. Baricordi (2005). "Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos." Human Reproduction **20**(1): 138-146.
- Nunes, L. M., F. M. Ayres, I. C. M. Francescantonio, V. A. Saddi, M. A. G. Avelino, R. D. G. Alencar, R. C. da Silva, A. J. Meneghini and I. J. Wastowski (2013). "Association between the HLA-G molecule and lymph node metastasis in papillary thyroid cancer." Human Immunology **74**(4): 447-451.
- Nweneka, C. V., C. P. Doherty, S. Cox and A. Prentice (2010). "Iron delocalisation in the pathogenesis of malarial anaemia." Trans R Soc Trop Med Hyg **104**(3): 175-184.
- Olliaro, P. (2008). "Editorial commentary: mortality associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria increases with age." Clin Infect Dis **47**(2): 158-160.
- Onno, M., C. Pangault, G. Le Friec, V. Guilloux, P. Andre and R. Fauchet (2000). "Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: Specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection." Journal of Immunology **164**(12): 6426-6434.
- Oraneli, B. U., O. C. Okeke and P. O. Ubachukwu (2013). "Effect of placental malaria on birth weight of babies in Nnewi, Anambra state, Nigeria." J Vector Borne Dis **50**(1): 13-17.
- Organisation Mondiale de la Santé (2013). Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle: Guide du participant. O. M. d. I. Santé. Malte.
- Ostapchuk, Y. O., E. A. Cetin, Y. V. Perfilyeva, A. Yilmaz, Y. A. Skiba, A. P. Chirkin, N. A. Omarbaeva, S. G. Talaeva, N. N. Belyaev and G. Deniz (2015). "Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-beta in healthy donors and breast cancer patients." Cell Immunol **298**(1-2): 37-46.
- Oztekin, O., S. M. Fenkci, V. Fenkci, Y. Enli and U. Cabus (2015). "Serum HLA-G levels in women with polycystic ovary syndrome." Gynecol Endocrinol **31**(3): 243-246.

Oztekin, O., S. M. Fenkci, V. Fenkci, Y. Enli and U. Cabus (2015). "Serum HLA-G levels in women with polycystic ovary syndrome." Gynecological Endocrinology **31**(3): 243-246.

Pantaleo, A., M. C. Pau, H. D. Chien and F. Turrini (2015). "Artemisinin resistance, some facts and opinions." Journal of Infection in Developing Countries **9**(6): 597-599.

Papamitsou, T., A. Toskas, K. Papadopoulou, A. Sioga, S. Lakis, M. Chatzistamatiou, Z. Economou and L. Adriopoulou (2014). "Immunohistochemical study of immunological markers: HLAG, CD16, CD25, CD56 and CD68 in placenta tissues in recurrent pregnancy loss." Histol Histopathol **29**(8): 1047-1055.

Park, Y., Y. Park, H. S. Lim, Y. S. Kim, D. J. Hong and H. S. Kim (2012). "Soluble human leukocyte antigen-G expression in hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma." Tissue Antigens **79**(2): 97-103.

Pasternak, N. D. and R. Dzikowski (2009). "PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite Plasmodium falciparum." Int J Biochem Cell Biol **41**(7): 1463-1466.

Pasvol, G. (2005). "Tropical infections 2Malaria." Medicine **33**(8): 39-43.

Perez-Chacon, G., S. Rosado, N. Rebolleda, I. Losada-Fernandez, J. A. Vargas, M. Morado, J. Jorda and P. Perez-Aciego (2009). "Prognostic irrelevance of HLA-G in B-cell chronic lymphocytic leukemia." International Journal of Laboratory Hematology **31**(3): 327-337.

Perkins, D. J., T. Were, G. C. Davenport, P. Kempaiah, J. B. Hittner and J. M. Ong'echa (2011). "Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis." Int J Biol Sci **7**(9): 1427-1442.

Pierrat, C. (2010). Des moustiques et des hommes, les territoires du paludisme à Tori-Bossito (Sud du Bénin). Ph. D, Université Paris I Panthéon Sorbonne.

Polakova, K., H. Bandzuchova, Z. Zilinska, S. Chrenova, D. Kuba and G. Russ (2015). "Analysis of HLA-G expression in serum and biopsy samples of kidney transplant recipients." Immunobiology **220**(4): 533-537.

Pradhan, P. (2009). "Malarial anaemia and nitric oxide induced megaloblastic anaemia: a review on the causes of malarial anaemia." J Vector Borne Dis **46**(2): 100-108.

Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin). (2011). "Plan Stratégique Nationale de Lutte contre le paludisme au Bénin 2006-2010: Rapport de la Revue de performance." from http://www.sante.gouv.bj/documents/PNLP/Rapport_Final_Revue_de_Performance.pdf.

Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) (2012). "Plan de suivi-évaluation du programme national de lutte contre le paludisme 2011-2015." 101.

Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) (2014). Rapport annuel d'activités 2013. Cotonou, Bénin.

Programme national de lutte contre le Paludisme (Bénin) (2015). Rapport annuel d'activités 2014. Cotonou, Bénin: 43.

Puppo, F., S. Brenci, L. Lanza, O. Bosco, M. A. Imro, M. Scudeletti, F. Indiveri and S. Ferrone (1994). "Increased Level of Serum Hla Class-I Antigens in Hiv-Infection - Correlation with Disease Progression." Human Immunology **40**(4): 259-266.

Qiu, J., P. I. Terasaki, J. Miller, K. Mizutani, J. Cai and E. D. Carosella (2006). "Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance." Am J Transplant **6**(9): 2152-2156.

Rachas, A., A. Le Port, G. Cottrell, J. Guerra, I. Choudat, J. Bouscaillou, A. Massougbodji and A. Garcia (2012). "Placental Malaria is Associated With Increased Risk of Nonmalaria Infection During the First 18 Months of Life in a Beninese Population." Clinical Infectious Diseases **55**(5): 672-678.

Rajagopalan, S. and E. O. Long (1999). "A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells." Journal of Experimental Medicine **189**(7): 1093-1099.

Rajagopalan, S. and E. O. Long (2012). "KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G." Front Immunol **3**: 258.

Rebmann, V., D. Bartsch, A. Wunsch, P. Mollenbeck, T. Golda, R. Viebahn and H. Grosse-Wilde (2009). "Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen-G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation." Hum Immunol **70**(12): 995-999.

Rebmann, V., J. LeMaoult, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella and H. Grosse-Wilde (2007). "Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms." Tissue Antigens **69**: 143-149.

Rebmann, V., F. D. Nardi, B. Wagner and P. A. Horn (2014). "HLA-G as a Tolerogenic Molecule in Transplantation and Pregnancy." J Immunol Res.

Rebmann, V., H. Nuckel, U. Duhrsen and H. Grosse-Wilde (2007). "HLA-G in B-chronic lymphocytic leukaemia: Clinical relevance and functional implications." Seminars in Cancer Biology **17**(6): 430-435.

Rebmann, V., K. Pfeiffer, M. Passler, S. Ferrone, S. Maier, E. Weiss and H. Grosse-Wilde (1999). "Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid." Tissue Antigens **53**(1): 14-22.

Redman, C. W. G., A. J. McMichael, G. M. Stirrat, C. A. Sunderland and A. Ting (1984). "Class-1 Major Histocompatibility Complex Antigens on Human Extra-Villous Trophoblast." Immunology **52**(3): 457-468.

Reiner, R. C., Jr., M. Geary, P. M. Atkinson, D. L. Smith and P. W. Gething (2015). "Seasonality of Plasmodium falciparum transmission: a systematic review." Malar J **14**: 343.

Rene, C., C. Lozano and J. F. Eliaou (2016). "Expression of classical HLA class I molecules: regulation and clinical impacts: Julia Bodmer Award Review 2015." HLA **87**(5): 338-349.

Richter, J., G. Franken, M. C. Holtfreter, S. Walter, A. Labisch and H. Mehlhorn (2016). "Clinical implications of a gradual dormancy concept in malaria." Parasitol Res **115**(6): 2139-2148.

Rizzo, R., A. S. Andersen, M. R. Lassen, H. C. Sorensen, T. Bergholt, M. H. Larsen, L. Melchiorri, M. Stignani, O. R. Baricordi and T. V. Hviid (2009). "Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy." Am J Reprod Immunol **62**(5): 320-338.

Rizzo, R., G. Bergamini, D. Bortolotti, T. Leal, C. D'Orazio, E. Pintani, L. Melchiorri, E. Zavatti, B. M. Assael, C. Sorio and P. Melotti (2016). "HLA-G expression and regulation during Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients." Future Microbiol **11**(3): 363-373.

Rizzo, R., D. Bortolotti, S. Bolzani and E. Fainardi (2014). "HLA-G Molecules in Autoimmune Diseases and Infections." Front Immunol **5**: 592.

Rizzo, R., D. Campioni, F. Lanza and O. R. Baricordi (2008). "Cotransplantation of mesenchymal cells and a higher relapse rate: a role for HLA-G molecules?" Leukemia **22**(12): 2273-2273.

Rizzo, R., B. Fuzzi, M. Stignani, L. Criscuoli, L. Melchiorri, S. Dabizzi, D. Campioni, F. Lanza, A. Marzola, F. Branconi, I. Noci and O. R. Baricordi (2007). "Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF?" J Reprod Immunol **74**(1-2): 133-142.

Rizzo, R., M. Stignani, P. Amoudruz, C. Nilsson, L. Melchiorri, O. Baricordi and E. Sverremark-Ekstrom (2009). "Allergic Women have Reduced sHLA-G Plasma Levels at Delivery." American Journal of Reproductive Immunology **61**(5): 368-376.

Rizzo, R., M. Vercammen, H. van de Velde, P. A. Horn and V. Rebmann (2011). "The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells." Cellular and Molecular Life Sciences **68**(3): 341-352.

Robert-Gangneux, F., J. P. Gangneux, N. Vu, S. Jaillard, C. Guiguen and L. Amiot (2011). "High level of soluble HLA-G in amniotic fluid is correlated with congenital transmission of Toxoplasma gondii." Clinical Immunology **138**(2): 129-134.

Rossati, A., O. Bargiacchi, V. Kroumova, M. Zaramella, A. Caputo and P. L. Garavelli (2016). "Climate, environment and transmission of malaria." Infez Med **24**(2): 93-104.

- Rouas-Freiss, N., R. M. Goncalves, C. Menier, J. Dausset and E. D. Carosella (1997). "Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11520-11525.
- Rouas-Freiss, N., I. Khalil-Daher, B. Riteau, C. Menier, P. Paul, J. Dausset and E. D. Carosella (1999). "The immunotolerance role of HLA-G." Seminars in Cancer Biology **9**(1): 3-12.
- Rouas-Freiss, N., M. Kirszenbaum, J. Dausset and E. D. Carosella (1997). "[Fetomaternal tolerance: role of HLA-G molecule in the protection of the fetus against maternal natural killer activity]." C R Acad Sci III **320**(5): 385-392.
- Rouas-Freiss, N., R. E. Marchal, M. Kirszenbaum, J. Dausset and E. D. Carosella (1997). "The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?" Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5249-5254.
- Rouas-Freiss, N., P. Moreau, J. LeMaout and E. D. Carosella (2014). "The Dual Role of HLA-G in Cancer." J Immunol Res.
- Roussev, R. G. and C. B. Coulam (2007). "HLA-G and its role in implantation (review)." J Assist Reprod Genet **24**(7): 288-295.
- Sabbagh, A., D. Courtin, J. Milet, J. D. Massaro, E. C. Castelli, F. Migot-Nabias, B. Favier, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, A. Garcia and E. A. Donadi (2013). "Association of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms with antibody response against Plasmodium falciparum antigens: preliminary results." Tissue Antigens **82**(1): 53-58.
- Sabbagh, A., P. Luisi, E. C. Castelli, L. Gineau, D. Courtin, J. Milet, J. D. Massaro, H. Laayouni, P. Moreau, E. A. Donadi and A. Garcia (2014). "Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity." Genes and Immunity **15**(2): 95-106.
- Sabbatani, S., S. Fiorino and R. Manfredi (2010). "The emerging of the fifth malaria parasite (Plasmodium knowlesi): a public health concern?" Braz J Infect Dis **14**(3): 299-309.
- Sadissou, I., T. d'Almeida, G. Cottrell, A. Luty, I. Krawice-Radanne, A. Massougboji, P. Moreau, K. Moutairou, A. Garcia, B. Favier, N. Rouas-Freiss and D. Courtin (2014). "High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy." Malaria Journal **13**.
- Salanti, A., M. Dahlback, L. Turner, M. A. Nielsen, L. Barfod, P. Magistrado, A. T. Jensen, T. Lavstsen, M. F. Ofori, K. Marsh, L. Hviid and T. G. Theander (2004). "Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria." J Exp Med **200**(9): 1197-1203.

Santos, I. S., A. Matijasevich, M. F. Silveira, I. K. Sclowitz, A. J. Barros, C. G. Victora and F. C. Barros (2008). "Associated factors and consequences of late preterm births: results from the 2004 Pelotas birth cohort." Paediatr Perinat Epidemiol **22**(4): 350-359.

Sarr, D., L. Marrama, A. Gaye, J. M. Dangou, M. Niang, O. Mercereau-Puijalon, J. Y. Lehesran and R. Jambou (2006). "High prevalence of placental malaria and low birth weight in Sahelian periurban area." Am J Trop Med Hyg **75**(1): 171-177.

Sartelet, H., D. Schleiermacher, J. Y. Le-Hesran, O. Graesslin, D. Gaillard, M. Fe, C. Lechki, A. Gaye, P. Le Bouteiller and P. Birembaut (2005). "Less HLA-G expression in Plasmodium falciparum-infected third trimester placentas is associated with more natural killer cells." Placenta **26**(6): 505-511.

Saurabh, A., D. Thakral, M. K. Mourya, A. Singh, A. Mohan, A. K. Bhatnagar, D. K. Mitra and U. Kanga (2016). "Differential expression of HLA-G and ILT-2 receptor in human tuberculosis: Localized versus disseminated disease." Hum Immunol **77**(9): 746-753.

Schlagenhauf, P., R. Steffen and L. Loutan (2003). "Migrants as a major risk group for imported malaria in European countries." J Travel Med **10**(2): 106-107.

Schleiermacher, D., J. Y. Le Hesran, J. L. Ndiaye, R. Perraut, A. Gaye and O. Mercereau-Puijalon (2002). "Hidden Plasmodium falciparum parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta." Infect Genet Evol **2**(2): 97-105.

Schumacher, R. F. and E. Spinelli (2012). "Malaria in children." Mediterr J Hematol Infect Dis **4**(1): e2012073.

Schutt, P., B. Schutt, M. Switala, S. Bauer, G. Stamatis, B. Opalka, W. Eberhardt, M. Schuler, P. A. Horn and V. Rebmann (2010). "Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients." Hum Immunol **71**(5): 489-495.

Schwarz, N. G., A. A. Adegnik, L. P. Breitling, J. Gabor, S. T. Agnandji, R. D. Newman, B. Lell, S. Issifou, M. Yazdanbakhsh, A. J. Luty, P. G. Kremsner and M. P. Grobusch (2008). "Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life." Clin Infect Dis **47**(8): 1017-1025.

Segat, L. and S. Crovella (2012). "HLA-G 14bp del/ins genetic variation: association with susceptibility to human immunodeficiency virus-1 vertical transmission but not with human immunodeficiency virus-1 infection through horizontal transmission." Tissue Antigens **80**(1): 12-13.

Segat, L., L. Zupin, H. Y. Kim, E. Catamo, D. M. Thea, C. Kankasa, G. M. Aldrovandi, L. Kuhn and S. Crovella (2014). "HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV." Tissue Antigens **83**(3): 161-167.

Seliger, B. (2013). "The non-classical antigens of HLA-G and HLA-E as diagnostic and prognostic biomarkers and as therapeutic targets in transplantation and tumors." Clin Transpl: 465-472.

Seliger, B. (2016). "Role of microRNAs on HLA-G expression in human tumors." Hum Immunol **77**(9): 760-763.

Sher, G., L. Keskindepe, M. Nouriani, R. Roussev and J. Batzofin (2004). "Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome." Reprod Biomed Online **9**(1): 74-78.

Shi, W. W., A. F. Lin, D. P. Xu, W. G. Bao, J. G. Zhang, S. Y. Chen, J. Li and W. H. Yan (2011). "Plasma soluble human leukocyte antigen-G expression is a potential clinical biomarker in patients with hepatitis B virus infection." Human Immunology **72**(11): 1068-1073.

Shiroishi, M., K. Kuroki, L. Rasubala, K. Tsumoto, I. Kumagai, E. Kurimoto, K. Kato, D. Kohda and K. Maenaka (2006). "Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d)." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16412-16417.

Shukla, M., N. Singh and M. P. Singh (2011). "Spleen rates and infant parasite rates as surveillance tool for malaria control in remote hard to reach areas of central India." Malaria Journal **10**.

Singer, G., V. Rebmann, Y. C. Chen, H. T. Liu, S. Z. Ali, J. Reinsberg, M. T. McMaster, K. Pfeiffer, D. W. Chan, E. Wardelmann, H. Grosse-Wilde, C. C. Cheng, R. J. Kurman and I. M. Shih (2003). "HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites." Clinical Cancer Research **9**(12): 4460-4464.

Singer, L. M., R. D. Newman, A. Diarra, A. C. Moran, C. S. Huber, G. Stennies, S. B. Sirima, A. Konate, M. Yameogo, R. Sawadogo, J. W. Barnwell and M. E. Parise (2004). "Evaluation of a malaria rapid diagnostic test for assessing the burden of malaria during pregnancy." Am J Trop Med Hyg **70**(5): 481-485.

Singh, B., L. Kim Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S. S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas and D. J. Conway (2004). "A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings." Lancet **363**(9414): 1017-1024.

Souto, F. J. D., J. C. O. Crispim, S. C. Ferreira, A. S. M. da Silva, C. L. Bassi, C. P. Soares, S. Zucoloto, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, A. L. C. Martinelli and E. A. Donadi (2011). "Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection." Journal of Viral Hepatitis **18**(2): 102-105.

Souza, D. M., J. Genre, T. G. Silva, C. P. Soares, K. B. Rocha, C. N. Oliveira, C. A. Jatoba, J. M. Andrade, P. Moreau, C. Medeiros Ada, E. A. Donadi and J. C. Crispim (2016). "Upregulation of Soluble HLA-G5 and HLA-G6 Isoforms in the Milder Histopathological

Stages of *Helicobacter pylori* Infection: A Role for Subverting Immune Responses?" Scand J Immunol **83**(1): 38-43.

Stanisic, D. I., K. A. Moore, F. Baiwog, A. Ura, C. Clapham, C. L. King, P. M. Siba, J. G. Beeson, I. Mueller, F. J. Fowkes and S. J. Rogerson (2015). "Risk factors for malaria and adverse birth outcomes in a prospective cohort of pregnant women resident in a high malaria transmission area of Papua New Guinea." Trans R Soc Trop Med Hyg **109**(5): 313-324.

Storm, J. and A. G. Craig (2014). "Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence." Front Cell Infect Microbiol **4**: 100.

Swysen, C., J. Vekemans, M. Bruls, S. Oyakhirome, C. Drakeley, P. Kremsner, B. Greenwood, O. Ofori-Anyinam, B. Okech, T. Villafana, T. Carter, B. Savarese, A. Duse, A. Reijman, C. Ingram, J. Frean, B. Ogutu and C. Clinical Trials Partnership (2011). "Development of standardized laboratory methods and quality processes for a phase III study of the RTS, S/AS01 candidate malaria vaccine." Malar J **10**: 223.

Sylvester, B., D. B. Gasarasi, S. Aboud, D. Tarimo, S. Massawe, R. Mpembeni and G. Swedberg (2016). "Prenatal exposure to *Plasmodium falciparum* increases frequency and shortens time from birth to first clinical malaria episodes during the first two years of life: prospective birth cohort study." Malar J **15**(1): 379.

Tabiasco, J., S. Perrier d'Hauterive, F. Thonon, J. Parinaud, R. Leandri, J. M. Foidart, G. Chaouat, C. Munaut, R. Lombroso, J. Selva, M. Bergere, I. Hammoud, N. Kozma, M. Aguerre-Girr, A. K. Swales, I. L. Sargent, P. Le Bouteiller and N. Ledee (2009). "Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study." Reprod Biomed Online **18**(3): 374-381.

Takem, E. N. and U. D'Alessandro (2013). "Malaria in pregnancy." Mediterr J Hematol Infect Dis **5**(1): e2013010.

Tangpukdee, N., C. Duangdee, P. Wilairatana and S. Krudsood (2009). "Malaria diagnosis: a brief review." Korean J Parasitol **47**(2): 93-102.

Teixeira, A. C., C. T. Mendes-Junior, F. F. Souza, L. A. Marano, N. H. Deghaide, S. C. Ferreira, E. D. Mente, A. K. Sankarankutty, J. Elias-Junior, O. Castro-e-Silva, E. A. Donadi and A. L. Martinelli (2013). "The 14bp-deletion allele in the HLA-G gene confers susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population." Tissue Antigens **81**(6): 408-413.

Thaddeus, S. and D. Maine (1994). "Too Far to Walk - Maternal Mortality in Context." Social Science & Medicine **38**(8): 1091-1110.

Thibodeau, V., J. Lajoie, A. C. Labbe, M. D. Zannou, K. R. Fowke, M. Alary, J. Poudrier and M. Roger (2011). "High Level of Soluble HLA-G in the Female Genital Tract of Beninese Commercial Sex Workers Is Associated with HIV-1 Infection." Plos One **6**(9).

- Thorsby, E. (2009). "A short history of HLA." Tissue Antigens **74**(2): 101-116.
- Trampuz, A., M. Jereb, I. Muzlovic and R. M. Prabhu (2003). "Clinical review: Severe malaria." Crit Care **7**(4): 315-323.
- Trampuz, A., M. Jereb, I. Muzlovic and R. M. Prabhu (2003). "Clinical review: Severe malaria." Critical Care **7**(4): 315-323.
- Tuikue-Ndam, N. and P. Deloron (2015). "Developing vaccines to prevent malaria in pregnant women." Expert Opin Biol Ther **15**(8): 1173-1182.
- Turk, W. J., J. Kimani, T. Bielawny, C. Wachihi, T. B. Ball, F. A. Plummer and M. Luo (2013). "Associations of human leukocyte antigen-G with resistance and susceptibility to HIV-1 infection in the Pumwani sex worker cohort." AIDS **27**(1): 7-15.
- Tutterrow, Y. L., M. Avril, K. Singh, C. A. Long, R. J. Leke, G. Sama, A. Salanti, J. D. Smith, R. G. Leke and D. W. Taylor (2012). "High levels of antibodies to multiple domains and strains of VAR2CSA correlate with the absence of placental malaria in Cameroonian women living in an area of high Plasmodium falciparum transmission." Infect Immun **80**(4): 1479-1490.
- Uneke, C. J. (2007). "Impact of placental Plasmodium falciparum malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa: I: introduction to placental malaria." Yale J Biol Med **80**(2): 39-50.
- Uneke, C. J. (2007). "Impact of placental Plasmodium falciparum malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa: II: effects of placental malaria on perinatal outcome; malaria and HIV." Yale J Biol Med **80**(3): 95-103.
- Valea, I., H. Tinto, M. K. Drabo, L. Huybregts, H. Sorgho, J. B. Ouedraogo, R. T. Guiguemde, J. P. van Geertruyden, P. Kolsteren, U. D'Alessandro and F. M. s. Group (2012). "An analysis of timing and frequency of malaria infection during pregnancy in relation to the risk of low birth weight, anaemia and perinatal mortality in Burkina Faso." Malar J **11**: 71.
- van der Meer, A., H. G. M. Lukassen, M. J. C. van Lierop, F. Wijnands, S. Mosselman, D. D. M. Braat and I. Joosten (2004). "Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells." Mol Hum Reprod **10**(3): 189-195.
- van der Ven, K., S. Skrabin, C. Ober and D. Krebs (1998). "HLA-G polymorphisms: Ethnic differences and implications for potential molecule function." American Journal of Reproductive Immunology **40**(3): 145-157.
- van Wijk, I. J., S. Griffioen, M. L. Tjoa, M. A. M. Mulders, J. M. G. van Vugt, Y. W. Loke and C. B. M. Oudejans (2001). "HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy." Am J Obstet Gynecol **184**(5): 991-997.

Veit, T. D., C. P. S. de Lima, L. C. Cavaleiro, S. M. Callegari-Jacques, C. V. Brenol, J. C. T. Brenol, R. M. Xavier, M. F. L. D. Sauma, E. J. M. dos Santos and J. A. B. Chies (2014). "HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil." Tissue Antigens **83**(4): 260-266.

Vercammen, M., A. Verloes, P. Haentjens and H. Van de Velde (2009). "Can soluble human leucocyte antigen-G predict successful pregnancy in assisted reproductive technology?" Current Opinion in Obstetrics & Gynecology **21**(3): 285-290.

Vercammen, M. J., A. Verloes, H. Van de Velde and P. Haentjens (2008). "Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis." Hum Reprod Update **14**(3): 209-218.

von Websky, M. W., K. Kitamura, I. Ludwig-Portugall, C. Kurts, M. von Laffert, J. LeMaout, E. D. Carosella, K. Abu-Elmagd, J. C. Kalff and N. Schafer (2016). "Recombinant HLA-G as Tolerogenic Immunomodulant in Experimental Small Bowel Transplantation." Plos One **11**(7).

Walker, N. F., B. Nadjm and C. J. M. Whitty (2010). "Malaria." Medicine **38**(1): 41-46.

Walther, B., D. J. Miles, P. Waight, M. S. Palmero, O. Ojuola, E. S. Touray, H. Whittle, M. van der Sande, S. Crozier and K. L. Flanagan (2012). "Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination." BMC Infect Dis **12**: 6.

Wang, Y., Z. Ye, X. Q. Meng and S. S. Zheng (2011). "Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma." Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International **10**(2): 158-163.

Warner, C. M., P. W. Lampton, J. A. Newmark and J. Cohen (2008). "Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success." Reprod Biomed Online **17**(4): 470-485.

Wells, M., B. L. Hsi and W. P. Faulk (1984). "Class-I Antigens of the Major Histocompatibility Complex on Cytotrophoblast of the Human Placental Basal Plate." American Journal of Reproductive Immunology **6**(4): 167-174.

Weng, P. J., Y. M. Fu, S. X. Ding, D. P. Xu, A. F. Lin and W. H. Yan (2011). "Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection." Human Immunology **72**(5): 406-411.

White, N. J., S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu and A. M. Dondorp (2014). "Malaria." Lancet **383**(9918): 723-735.

WHO (2012). "Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of September 2012 meeting." Malar J **11**: 424.

Wilczynski, J. R. (2006). "Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape." Chemotherapy **52**(3): 107-110.

William, T., J. Jelip, J. Menon, F. Anderios, R. Mohammad, T. A. Awang Mohammad, M. J. Grigg, T. W. Yeo, N. M. Anstey and B. E. Barber (2014). "Changing epidemiology of malaria in Sabah, Malaysia: increasing incidence of Plasmodium knowlesi." Malar J **13**: 390.

Wilson, A. L. and I. P. Taskforce (2011). "A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of intermittent preventive treatment of malaria in children (IPTc)." PLoS One **6**(2): e16976.

World Health Organization (2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." Trans R Soc Trop Med Hyg **94 Suppl 1**: S1-90.

World Health Organization (2013). WHO policy brief for the implementation of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy using sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP). Geneva.

World Health Organization (2014). "Severe malaria." Trop Med Int Health **19 Suppl 1**: 7-131.

World Health Organization (2015). Guidelines for the Treatment of Malaria. Guidelines for the Treatment of Malaria. Geneva.

World Health Organization. (2015). World malaria report 2015. Geneva, Switzerland, World Health Organization: 280.

Xiao, L., W. Q. Zhou, B. Y. Shi, K. Feng, X. Y. He, Y. X. Wei, Y. Gao, X. Y. Meng and W. Xiao (2013). "HLA-G expression in the peripheral blood of live kidney transplant recipients." Chinese Medical Journal **126**(14): 2652-2655.

Xu, H. H., W. W. Shi, A. Lin and W. H. Yan (2014). "HLA-G 3' untranslated region polymorphisms influence the susceptibility for human papillomavirus infection." Tissue Antigens **84**(2): 216-222.

Yan, W. H. (2010). "HLA-G expression in hematologic malignancies." Expert Review of Hematology **3**(1): 67-80.

Yan, W. H. (2011). "HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **11**(1): 76-89.

Yan, W. H., A. Lin, B. G. Chen and S. Y. Chen (2009). "Induction of Both Membrane-Bound and Soluble HLA-G Expression in Active Human Cytomegalovirus Infection." Journal of Infectious Diseases **200**(5): 820-826.

Yao, G. D., Y. M. Shu, S. L. Shi, Z. F. Peng, W. Y. Song, H. X. Jin and Y. P. Sun (2014). "Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development." PLoS One **9**(3): e92889.

Ye, S. R., H. Yang, K. Li, D. D. Dong, X. M. Lin and S. M. Yie (2007). "Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer." Modern Pathology **20**(3): 375-383.

Yelavarthi, K. K., J. L. Fishback and J. S. Hunt (1991). "Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization." J Immunol **146**(8): 2847-2854.

Yie, S. M. and Z. B. Hu (2011). "Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) as a marker for diagnosis, prognosis and tumor immune escape in human malignancies." Histology and Histopathology **26**(3): 409-420.

Yie, S. M., L. H. Li, Y. M. Li and C. Librach (2004). "HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **191**(2): 525-529.

Yie, S. M., H. Yang, S. R. Ye, K. Li, D. D. Dong and X. M. Lin (2007). "Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer." Lung Cancer **58**(2): 267-274.

Yie, S. M., H. Yang, S. R. Ye, K. Li, D. D. Dong and X. M. Lin (2007). "Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma." Annals of Surgical Oncology **14**(10): 2721-2729.

Yokoyama, W. M. (1997). "The mother-child union: the case of missing-self and protection of the fetus." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 5998-6000.

Zarkhin, V., A. Talisetti, L. Li, L. J. Wozniak, S. V. McDiarmid, K. Cox, C. Esquivel and M. M. Sarwal (2010). "Expression of Soluble HLA-G Identifies Favorable Outcomes in Liver Transplant Recipients." Transplantation **90**(9): 1000-1005.

Zheng, J. Y., C. S. Xu, D. K. Chu, X. Y. Zhang, J. P. Li, G. Ji, L. Hong, Q. X. Feng, X. H. Li, G. S. Wu, J. J. Du and Q. C. Zhao (2014). "Human leukocyte antigen G is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis." Immunology Letters **161**(1): 13-19.

Zidi, I. and A. Bartegi (2008). "Importance of HLA-G in Therapy of Cancer." Therapie **63**(4): 327-332.

Zidi, I., H. Ben Yahia, D. Bortolotti, L. Mouelhi, A. B. Laaribi, S. Ayadi, N. Zidi, F. Houissa, R. Debbech, A. Boudabous, T. Najjar, D. Di Luca and R. Rizzo (2015). "Association between sHLA-G and HLA-G 14-bp deletion/insertion polymorphism in Crohn's disease." International Immunology **27**(6): 289-296.

Annexes

Annexe 1

Le document présenté ici décrit de façon détaillée la procédure utilisée pour la quantification de la molécule HLA-G dans nos travaux. Il a été extrait de la thèse de Sadissou Ibrahim, qui a effectué les dosages.

PROCEDURE	
PROTOCOLE POUR DOSAGE DES ISOFORMES SOLUBLES HLA-G1 et HLA-G5	Version : 1
	Date : 03/12/2013

1. Introduction

L'antigène leucocytaire humain G (HLA-G) est une molécule du système HLA de classe I non classique. La molécule HLA-G joue un rôle crucial dans la modulation des réponses immunitaires et en particulier dans la tolérance materno-fœtale. Il existe sept isoformes à savoir : 4 isoformes membranaires (HLA-G1, G2, G3 et G4) et 3 solubles isoformes (HLA-G5, G6 et G7). L'isoforme membranaire HLA- G1 peut se retrouver sous forme soluble après un clivage protéolytique.

2. Objectif

L'objectif est de pouvoir quantifier les niveaux des isoformes solubles HLA-G1 et HLA-G5 dans le plasma.

3. Matériels

3.1. Chimiques	Référence	Fournisseur
Tween 20	Merck cat. no 822184	Merck Eurolab
TMB	4444 15 ml/plaque	SIGMA
Tablettes de Phosphate buffered Saline (PBS)	18912-014	Gibco
Acide chlorhydrique (HCL)		

3.2. Solutions	Produits	Référence
Tampon de Coating	Diluant DAKO	S 3022
Tampon de blocage	Diluant DAKO	S 3022
Tampon de dilution du	Diluant DAKO	S 3022
Tampon de revelation	TMB	4444 15 ml/plaque
Tampon de dilution des réactifs	Diluant DAKO	S 3022
DAKO ENVISION System HRP rabbit	DAKO	K4002
PBS (1X)	Annexe A	

Tampon de lavage	Annexe B	
HCl (1 N).	Annexe C	

3.3. Anticorps	Référence	Fournisseur
Rabbit-anti-Human β_2 microglobulin (Conservé +4°)	A0072	DAKO

3.4. Contrôles	Référence	Fournisseur
Blanc : (Diluant DAKO +4°)	S 3022	DAKO
Contrôle positif : Surnagent M8G5 (Conservé à 80°)		IMETI/CEA/hôpital StLouis Paris
Contrôle négatif : Surnagent M8pcDNA		IMETI/CEA/hospital St Louis Paris

3.5. Antigène	Référence	Fournisseur
MEM-G/9 (Conservé à 80°)	11-292-M001	EXBIO

3.6. Instruments et logiciels	Référence	Fournisseur
Pipettes : 0,5-10 μ l ,2-20 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l	Ref : 060811 ; 060812 ;	<i>DISCOVERY</i> Dominique
Pipettes Multicanales de 8 : 5-50 μ l 50-300 μ l	Ref 060821 Ref 060823	<i>DISCOVERY</i> Dominique
Laveur de plaque ELISA	Ref 047203	Dominique Dustscher
Lecteur de plaque ELISA	Ref 047966	Dominique Dustscher
Compteur/Décompteur	Ref 053268	
Ordinateur		
Logiciel d'analyse des donnés		Excel
Mini barreaux d'agitation (2x2 ; 3x3 ; 5x2)	Ref : 045945 ; 045957 ;	Dominique Dustscher
Agitateurs magnétique chauffants	Ref 001124	Dominique
Agitateur pour Microplaque (SSM5)	Ref 090794	Dominique
Vortex	Ref 144200	Dominique
Balance de precision	Ref 146833	Dominique

Centrifugeuse Eppendorf avec rotor	Ref 033915	Dominique Dustscher
------------------------------------	------------	---------------------

3.7. Matériels en plastique	Référence	Fournisseur
Réservoir en plastique pour les tampons et les solutions	Ref 006795	Dominique Dustscher
Plaques microtitration de 96 puits polystyrène	Ref 2121P	High Bind FISHER
Cônes de 200µl et de 1000µl		

3.8 Préparation des échantillons et de la gamme

3.8.1 Plasma

Dilution de l'échantillon :

Disposer au moins un volume de 200µl de plasma dans des tubes eppendorf. Centrifuger les échantillons à 7000 tpm pendant 8 minutes.

Faire une pré-dilution des échantillons au 1/2 avec le Diluent Dako (DD) dans une plaque de pré-dilution : **80 µl d'échantillons+80 µl de DD.**

3.8.2 Préparation de la gamme

Pour la quantification de la protéine HLA-G, inclure dans chaque plaque, une gamme (courbe standard) de concentration connue (200ng/µl). Préparer 5 dilutions différentes avec le premier point de gamme à une concentration de 200ng/ µl, et la distribuer dans la première colonne de la plaque de pré-dilution.

Ajouter dans la plaque de pré-dilution au niveau des 3 derniers puits restant dans la première colonne (1) successivement :

- Blanc (300 µl de Diluent Dako)
- Témoin positif : le surnagent M8G5 dilué au 1/2 (150µl de M8G5 + 150µl Diluent Dako)
- Témoin négatif : le surnagent M8pcDNA (300µl)

3.9. Dépôt des échantillons à doser et de la gamme

Après la phase d'incubation et le lavage de la plaque :

- déposer 50 µl de la gamme dans les colonnes **1** et **2** de même que le blanc et les témoins (positif et négatif) ainsi que les échantillons à partir de la ligne **A** colonnes **3** et **4** en duplicate dans la plaque de manipulation.
- Compléter 50 µl de Diluent Dako dans toute la plaque de manipulation et incuber la plaque pendant 2h sous agitation.

4. Méthodologie

4.1 Précautions

- Respecter les temps et les conditions d'incubation
- Centrifuger les plasmas avant dilution
- Bien laver les plaques afin d'éviter des biais issus de résidus de lavage
- Préparer les tampons selon les protocoles (annexes)

4.2 Mode opératoire

1) La protéine MEM-G/9 (Mouse-anti-human HLA-G mAb) est diluée au 1/100 dans du PBS afin d'obtenir une concentration de (10 µg/ml). La protéine est aliquotée à raison de 120µl dans des tubes eppendorf.

Le 1^{er} jour : Pour coater une plaque prendre 120µl de protéine MEM-G/9 pour 12 ml de PBS. (Annexe A)

Distribuer 100 µl d'anticorps dans chaque puit, et garder la plaque (plaque de manipulation) toute la nuit à 4 ° C. Couvrir la plaque avec un film plastique. Chaque plaque doit être identifiée par un numéro, la date et le nom de la protéine.

2) Le 2^{ème} jour : Retirer la plaque du réfrigérateur et laver 4 fois avec (300 µl/puits) du tampon de lavage (Annexe B). Tapoter la plaque sur du papier absorbant après le dernier lavage. Après lavage, distribuer 300 µl de tampon de saturation (Diluent DAKO prêt à l'emploi). Incuber la plaque pendant 2h à température ambiante sous agitation.

3) Retirer la plaque de l'agitateur et laver 4 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage (Annexe B). Tapoter la plaque sur du papier absorbant après le dernier lavage. Après la phase d'incubation et le lavage de la plaque :

- A partir de la plaque pré-dilution, déposer 50 µl de la gamme dans les colonnes **1** et **2** de même que le blanc et les témoins (positif et négatif) ainsi que les échantillons à partir de la ligne **A** colonnes **3** et **4** en duplicat dans la plaque de manipulation.
- Compléter 50 µl de Diluent Dako dans toute la plaque de manipulation et incuber la plaque pendant 2h sous agitation.

4) Retirer la plaque de l'agitateur et laver 4 fois avec (300 µl/puits) du tampon de lavage (Annexe B). Tapoter la plaque sur du papier absorbant après le dernier lavage. Ajouter l'anticorps de détection (anticorps de lapin anti-β2-microglobuline) dilué au 1/10 000 dans du PBS 1X (soit 2.0 µl d'anticorps dans 20 ml PBS par plaque). Distribuer 100 µl/puits d'anticorps dilué et incuber la plaque à température ambiante pendant 1h sous agitation.

5) Pour améliorer la sensibilité du test, la réaction est amplifiée grâce au système Dako Envision HRP. Le système est dilué (1:200 dans du PBS soit 60 µl / 12 ml). Distribuer 100 µl de tampon dilué/puit puis incuber la plaque à température ambiante pendant 1h sous agitation.

6) Après quatre lavages (300 µl/puit de tampon de lavage), ajouter dans chaque puit 150 µl/puits de substrat pour la révélation (TMB super-sensible sigma). Incuber à l'obscurité pendant 20 min.

7) Stopper la réaction avec du HCl (1 N) Annexe C.

8) Lire la plaque au spectrophotomètre à 450 nm.

9) La conversion des valeurs de l'absorbance en unité Arbitraire est réalisée en utilisant Microsoft Excel.

10) Plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gamme 200ng/ml 1	Gamme 200ng/ml 1	Ech - 1	Ech -1	Ech - 9	Ech - 9	Ech - 17	Ech - 17	Ech - 25	Ech -25	Ech - 33	Ech -33
B	Gamme 100ng/ml 1	Gamme 100ng/ml 1	Ech - 2	Ech -2	Ech - 10	Ech - 10	Ech - 18	Ech - 18	Ech - 26	Ech -26	Ech - 34	Ech -34
C	Gamme 50ng/ml	Gamme 50ng/ml 1	Ech - 3	Ech -3	Ech - 11	Ech - 11	Ech - 19	Ech - 19	Ech - 27	Ech -27	Ech - 35	Ech -35
D	Gamme 25ng/ml	Gamme 25ng/ml 1	Ech - 4	Ech -4	Ech - 12	Ech - 12	Ech - 20	Ech - 20	Ech - 28	Ech -28	Ech - 36	Ech -36
E	Gamme 12,5ng/ml	Gamme 12,5ng/ml	Ech - 5	Ech -5	Ech - 13	Ech - 13	Ech - 21	Ech - 21	Ech - 29	Ech -29	Ech - 37	Ech -37
F	Blanc	Blanc	Ech - 6	Ech -6	Ech - 14	Ech - 14	Ech - 22	Ech - 22	Ech - 30	Ech -30	Ech - 38	Ech -38
G	Surnageant M8-HLA- G5 dil 1/2		Ech- 7	Ech - 7	Ech -15	Ech- 15	Ech -23	Ech- 23	Ech -31	Ech - 31	Ech -39	Ech - 39
H	Surnageant M8-pcDNA		Ech- 8	Ech - 8	Ech -16	Ech - 16	Ech -24	Ech - 24	Ech -32	Ech - 32	Ech -40	Ech - 40

5. Références

Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED: Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94:11520-11525.

Carosella ED, Moreau P, LeMaout J, Rouas-Freiss N: HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol.* 2008, 29:125-132.

Rebmann V, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H. Report of the Wet Workshop for Quantification of Soluble HLA-G in Essen, 2004. *Hum Immunol.* 2005 août;66(8):853-63.

Menier C, Saez B, Horejsi V, Martinozzi S, Krawice-Radanne I, Bruel S, et al. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. Hum Immunol. 2003 Mar;64(3):315-26.

6. Annexes

Annexe A : Préparation PBS (1X) : (1L) Procédure

Mettre 2 tablettes de PBS (tablette de 500ml) dans un flacon contenant 1000ml de H₂O distillée et un barreau magnétique, puis placer le flacon sur agitateur magnétique sans chauffage. A conserver pendant 03 semaines à +4°C.

Annexe B : Préparation Tampon de lavage : PBS 1X + 0,01% Tween-20 : (1L) Procédure

Mettre 2 tablettes de PBS (tablette de 500ml) dans un flacon contenant 1000 ml de H₂O distillée et un barreau magnétique, puis placer le flacon sur agitateur magnétique sans chauffage.

Ajouter 1ml de Tween 20 et agiter jusqu'à obtenir une solution homogène. A conserver une semaine à température ambiante

Annexe C : Préparation HCL (1N) : (1L) avec HCL pur de concentration 36.46g/mol

Procédure

Mettre 969,6 ml de H₂O distillée dans un flacon, ajouter lentement 30,4 ml de HCL pur de concentration 36,46g/mol. Conserver à température ambiante.

NB : Le flacon contenant de H₂O distillée dans être placé dans de la glace (au frais) avant d'y ajouter HCL pur.

Annexe 2

Tableau 23 : Distribution des polymorphismes du gène *HLA-G* au sein de notre échantillon

SNP	Enfants (n=337)		Mères (n=266)	
	effectif	pourcentage	effectif	pourcentage
14pb				
DD	158	47%	109	41%
DI	134	40%	136	51%
II	45	13%	21	8%
+3001C/T				
CC	334	99,1%	258	97%
CT	3	0,9%	8	3%
TT	-	-	-	-
+3003T/C				
TT	248	74%	3	1%
TC	81	24%	67	25%
CC	7	2%	196	74%
+3010C/G				
CC	139	38%	100	38%
CG	159	49%	131	49%
GG	38	13%	35	13%
+3027C/A				
CC	336	99,7%	266	100%
CA	-	-	0	0
AA	1	0,3%	0	0
+3035C/T				
CC	281	83,4%	209	79%
CT	52	15,4%	52	19%
TT	4	1,2%	5	2%
+3142G/C				
CC	50	15%	33	12%
GC	148	44%	133	50%
GG	139	41%	100	38%
+3187A/G				
AA	266	78,9%	202	76%
AG	69	20,5%	55	21%
GG	2	0,6%	9	3%
+3196C/G				
CC	193	57,3%	141	53%
CG	125	37,1%	119	45%
GG	19	5,6%	6	2%