



HAL
open science

Lymphocytes B et immunoglobulines néonatales dans un contexte d'infection parasitaire congénitale : stratégies méthodologiques de caractérisation

Magalie Dambrun Dit Tambrun

► To cite this version:

Magalie Dambrun Dit Tambrun. Lymphocytes B et immunoglobulines néonatales dans un contexte d'infection parasitaire congénitale : stratégies méthodologiques de caractérisation. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB118 . tel-02517078

HAL Id: tel-02517078

<https://theses.hal.science/tel-02517078v1>

Submitted on 24 Mar 2020

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.

Université Paris Descartes

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Unité Mixte de Recherche 216 « Mère et enfant face aux infections tropicales »

**Lymphocytes B et immunoglobulines néonatales dans
un contexte d'infection parasitaire congénitale :
stratégies méthodologiques de caractérisation**

Par Magalie Dambrun

Thèse de doctorat en Immunologie

Dirigée par Florence Migot-Nabias

Présentée et soutenue publiquement le 20 novembre 2018

Devant un jury composé de :

Dr Florence Migot-Nabias	IRD, Université Paris Descartes	Directrice de thèse
Pr Pascal Rihet	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Pr Florence Robert-Gangneux	Université de Rennes-1	Examinatrice
Pr Pierre Tissières	Université Paris sud	Rapporteur
Dr Marie-Noëlle Ungeheuer	Université Pierre et Marie Curie	Examinatrice



Carpe Diem

Horace

« Dead Poets Society »

***Plus on travaille sur un tableau et
plus il devient impossible de le finir***

Alberto Giacometti

« The final Portrait »

REMERCIEMENTS

Table des matières

Liste des abréviations	7
Liste des figures	10
Liste des tableaux.....	12
Préambule : à la découverte d'un projet scientifique	13
PARTIE 1 - CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	14
I-Infections parasitaires congénitales	15
I-1-Généralités sur les infections parasitaires congénitales.....	15
I-2-Grandes lignes sur la maladie de Chagas congénitale	16
I-3-La toxoplasmose.....	19
I-3-1- <i>Toxoplasma gondii</i> : un parasite rusé	19
I-3-1-1-Un peu d'histoire.....	19
I-3-1-2-La biologie du parasite.....	20
I-3-1-3-Formes cliniques de la toxoplasmose.....	21
I-3-1-4-Les différents génotypes de <i>T. gondii</i> et la notion de virulence.....	22
I-3-2-La toxoplasmose congénitale	24
I-3-2-1-Généralités et signes cliniques.....	24
I-3-2-2-Les souches rencontrées dans la toxoplasmose congénitale.....	26
I-3-2-3-L'infection du placenta par <i>T. gondii</i>	27
I-3-2-4-Traitement de la toxoplasmose congénitale.....	29
I-3-2-5-La séroprévalence toxoplasmique.....	30
I-4-POINTS A RETENIR.....	34
II-La gestion de la prise en charge - un délicat consensus	35
II-1-Les politiques de santé publique	35
II-1-1-La maladie de Chagas congénitale	35
II-1-2-La toxoplasmose congénitale	36
II-2-Les techniques de diagnostic et leurs limites	38
II-2-1-La maladie de Chagas congénitale	38
II-2-2-La toxoplasmose congénitale	40
II-2-2-1-Les techniques de diagnostic direct	40
II-2-2-2-Les techniques de diagnostic indirect.....	41
II-2-2-3-Les nouvelles approches.....	45
II-3-La complexité du diagnostic biologique.....	46
II-3-1-La maladie de Chagas congénitale	46
II-3-2-La toxoplasmose congénitale	47
II-4-POINTS A RETENIR	51
III-Les anticorps néonataux, un outil de diagnostic ?	52
III-1-Les immunoglobulines ou anticorps	52
III-1-1-Structure protéique des immunoglobulines.....	52
III-1-2-Structure moléculaire des immunoglobulines.....	53
III-2-Le système immunitaire adaptatif humoral	57
III-2-1-Rappel de quelques notions	57
III-2-2-Le développement et la différenciation des lymphocytes B.....	59
III-2-2-1-Chez l'adulte	59
III-2-2-2-Durant la vie intra-utérine	61
III-3- Particularités de l'immunité néonatale.....	62
III-3-1-Une défense précoce	63
III-3-2-Le passage placentaire des immunoglobulines G ou la protection maternelle	64
III-3-3-Utilisation du polymorphisme de la chaîne lourde IGH.....	65
III-4-POINTS A RETENIR	67
PARTIE 2 - PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	68

PARTIE 3 - POLYMORPHISME DU FRAGMENT Fc : VALIDATION MOLECULAIRE D'UNE APPROCHE UTILISANT LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	73
I-L'approche protéomique à valider.....	74
II-L'approche moléculaire entreprise	76
III-Article	77
IV-Commentaires	110
PARTIE 4 - ADAPTATION DE LA TECHNIQUE ELISPOT POUR METTRE EN EVIDENCE LES LYMPHOCYTES B NEONATAUX	112
I-La technique ELISPOT	113
I-1-Son principe	113
I-2-Ses applications.....	114
II-Mode opératoire classique de l'ELISPOT.....	114
III-Adaptation de la technique ELISPOT à la toxoplasmose congénitale.....	118
III-1-Choix de l'antigène parasitaire.....	118
III-2-Le temps d'activation cellulaire.....	121
III-3-Les autres paramétrages effectués.....	123
IV-Bilan actuel et points clefs à développer	125
PARTIE 5 - L'ACCES AU MATERIEL BIOLOGIQUE D'INTERET	128
I-Étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose au Bénin à partir de la cohorte STOPPAM.....	130
I-1-L'idée de départ	130
I-2-Description de la cohorte STOPPAM	130
I-3-Matériel et méthode	131
I-3-1-Les échantillons biologiques.....	131
I-3-2-Les techniques sérologiques utilisées	132
I-4-Les résultats préliminaires et interprétations	134
II-Projet CoaLa : étude de terrain au Bénin sur la toxoplasmose en fin de grossesse.....	138
II-1-But du projet et choix géographique.....	138
II-2-Les étapes antérieures au terrain.....	138
II-3-La mission CoaLa	139
II-3-1-Cadre de l'étude	139
II-3-2-Méthode d'étude.....	139
II-3-2-1-Population cible et constitution des groupes	139
II-3-2-2-Logistique du recrutement et prélèvements effectués	141
II-3-3-Activités au laboratoire	142
II-3-3-1-Echantillonnage.....	142
II-3-3-2-Sérologie de la toxoplasmose	143
II-3-3-3-Extraction d'ADN des prélèvements de placenta.....	146
II-4-Résultats préliminaires	147
II-5-Bilan et perspectives.....	149
III-Essai clinique TOXODIAG : étude de terrain en Ile de France sur la toxoplasmose au cours de la grossesse.....	152
III-1-Conception du projet.....	152
III-2-Déroulement de la mise en place d'une recherche clinique.....	153
III-3-Organisation annexe de l'étude	154
III-4-Etat d'avancement du projet.....	155
III-5-Interconnexion des projets TOXODIAG et CoaLa.....	156
PARTIR 6 - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	157

PARTIE 7 - REFERENCES DES SOURCES UTILISEES 162
PARTIE 8- ANNEXES 181
RESUME - ABSTRACT 202

Liste des abréviations

Ac :	<u>A</u> nti <u>c</u> orps
ADN :	<u>A</u> cide <u>D</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
AEC :	3- <u>a</u> mino-9- <u>é</u> thyl <u>c</u> arbazole
Afssa :	<u>A</u> gence <u>F</u> rançaise de <u>S</u> écurité <u>S</u> anitaire des <u>A</u> liments
Ag :	<u>A</u> ntigène
AI :	<u>A</u> ntibody <u>I</u> ndice ou indice d'anticorps
ANSM :	<u>A</u> gence <u>N</u> ationale de <u>S</u> écurité du <u>M</u> édicament et des produits de santé
APA :	<u>A</u> ccès et <u>P</u> artage des <u>A</u> vantages
AP-HP :	<u>A</u> ssistance <u>P</u> ublique- <u>H</u> ôpitaux de <u>P</u> aris
ASC :	<u>A</u> ntibody <u>S</u> ecreting <u>C</u> ells
BSA :	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
BU :	<u>B</u> ottom- <u>U</u> p
CD :	<u>C</u> luster de <u>d</u> ifférenciation
CDC :	<u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and <u>P</u> revention
CDR :	<u>C</u> omplementarity <u>D</u> etermining <u>R</u> egion
CHU-MEL :	<u>C</u> entre <u>H</u> ospitalier <u>U</u> niversitaire de la <u>M</u> ère et de l' <u>E</u> nfant de la <u>L</u> agune
CMN :	<u>C</u> ellules <u>M</u> ono <u>n</u> ucléées
CMV :	<u>C</u> yto <u>m</u> é <u>g</u> alo <u>v</u> irus
CNERS :	<u>C</u> omité <u>N</u> ational d' <u>É</u> thique pour la <u>R</u> echerche en <u>S</u> anté du Bénin
CNIL :	<u>C</u> ommission <u>N</u> ationale de l' <u>I</u> nformatique et des <u>L</u> ibertés
CNR :	<u>C</u> entre <u>N</u> ational de <u>R</u> éférence
CoaLa :	<u>C</u> aractérisation de la production d'immuno <u>g</u> lobulines spécifiques d'antigènes <u>p</u> arasitaires par les <u>L</u> ymphocytes B néon <u>a</u> taux dans le cadre d'infections congénitales
CPDA :	<u>C</u> itrate <u>P</u> hosphate <u>D</u> extrose <u>A</u> dénine
CpG :	<u>C</u> ytosine <u>p</u> hosphorothionate <u>G</u> uanine
CPN :	<u>C</u> onsultation <u>P</u> ré <u>n</u> atale
CPP :	<u>C</u> omité de <u>P</u> rotection des <u>P</u> ersonnes
DALY :	<u>D</u> isability <u>A</u> adjusted <u>L</u> ife <u>Y</u> ears
DHU :	<u>D</u> épartement <u>H</u> ospitalo- <u>U</u> niversitaire
DIG-ELISA :	<u>D</u> iffusion <u>I</u> n <u>G</u> el- <u>ELISA</u>
DMSO :	<u>D</u> iméthylsulfoxyde
DPBS :	<u>D</u> ulbecco's <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline
DRCD :	<u>D</u> épartement de la <u>R</u> echerche <u>C</u> linique et du <u>D</u> éveloppement

DRCI :	<u>D</u> élégation à la <u>R</u> echerche <u>C</u> linique et à l' <u>I</u> nnovation
e-CRF :	<u>e</u> lectronic <u>C</u> ase <u>R</u> eport <u>F</u> orm
EDTA :	<u>E</u> thylène <u>D</u> iamine <u>T</u> étra <u>A</u> cétique
ELFA :	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>F</u> luorescent <u>A</u> ssay
ELISA :	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
ELISPOT :	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>SPOT</u>
EVCI :	<u>E</u> spérance de <u>V</u> ie <u>C</u> orrigée de l' <u>I</u> ncapacité
Fc :	<u>F</u> ragment <u>c</u> ristallisable/ <u>F</u> ragment <u>c</u> rySTALLIZABLE
FSS :	<u>F</u> aculté des <u>S</u> ciences de la <u>S</u> anté de Cotonou
G6PD :	<u>G</u> lucose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphate- <u>D</u> éshydrogénase
Gm :	<u>G</u> amma <u>m</u> arker
GRA :	g ranules denses
HAS :	<u>H</u> aute <u>A</u> utorité de <u>S</u> anté
ICT :	<u>I</u> mmuno- <u>c</u> hromatography <u>t</u> est
IdeS :	<u>I</u> mmunoglobulin- <u>d</u> egrading enzyme of <u>S</u> treptococcus pyogenes
IFI :	<u>I</u> mmunofluorescence <u>i</u> ndirecte
IFN :	<u>I</u> nterferon
Ig :	<u>I</u> mmunoglobuline
IGRA :	<u>I</u> nterferon <u>G</u> amma <u>R</u> elease <u>A</u> ssay
IMEA :	<u>I</u> nstitut de <u>M</u> édecine et d' <u>E</u> pidémiologie <u>A</u> ppiquée-Fondation Internationale Léon Mba
IMG :	<u>I</u> nterruption <u>M</u> édicale de <u>G</u> rossesse
ISAgA :	<u>I</u> mmuno- <u>S</u> orbent <u>A</u> gglutination <u>A</u> ssay
Ly :	<u>L</u> ymphocytes
MAG :	<u>m</u> atrix <u>a</u> ntigen
MEM :	<u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
MIC :	m icronèmes
MRC5 :	<u>M</u> edical <u>R</u> esearch <u>C</u> ouncil cell strain- <u>5</u>
MS :	<u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry
NGS :	<u>N</u> ext- <u>G</u> eneration <u>S</u> equencing
NIH :	<u>N</u> ational <u>I</u> nstitutes of <u>H</u> ealth
NLM :	<u>N</u> ational <u>L</u> ibrary of <u>M</u> edecine
ODN :	<u>O</u> ligo <u>D</u> éoxy <u>N</u> ucléotide
OMS :	<u>O</u> rganisation <u>M</u> ondiale de la <u>S</u> anté (<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization, WHO)
PAHO :	<u>P</u> an <u>A</u> merican <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization (<u>O</u> rganisation <u>P</u> anaméricaine de la <u>S</u> anté, OPS)
PCR :	<u>P</u> olymerisation <u>C</u> hain <u>R</u> eaction

PEV : Programme Elargi de Vaccination
 POC : Point Of Care
 PVDF : Polyvinylidène Difluoride
 QALY : Quality-Addjusted Life Years
 RFLP : Restriction Fragment Lenght Polymorphism
 RIPH : Recherches Impliquant la Personne Humaine
 ROP : rhoptries
 RPMI : Roswell Park Memorial Intitut medium
 SA : Semaines d'Aménorrhée
 SAG : Surface Antigen
 SP : Sulfadoxine-Piriméthamine
 STOPPAM : Strategies TO Prevent Pregnancy Associated Malaria
 SVF : Sérum de Veau Fœtal
 TC : Toxoplasmose congénitale
T. cruzi : Trypanosoma cruzi
T. gondii : Toxoplasma gondii
 TLR : Toll Like Receptor
 TMB : TétraMéthylBenzidine
 ToRC : Toxoplasmose Rubéole Cytomégalovirus
 ToRCH : Toxoplasmose Rubéole Cytomégalovirus Herpes
 TPin-SP : Traitement Préventif intermittent du nourrisson à la Sulfadoxine-Piriméthamine
 TPip-SP : Traitement Préventif intermittent pour le paludisme à la Sulfadoxine-Piriméthamine
 UI : Unité Internationale
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UNICEF : United Nations International Children's Emergency Fund (Fonds des Nations Unies pour l'Enfance)
 URC PNVS : Unité de Recherche Clinique Paris Nord Val de Seine
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
 WHO : World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé, **OMS**)

Liste des figures

Figure n°1. <i>Trypanosoma cruzi</i> et son vecteur.	16
Figure n°2. Distribution de la maladie de Chagas.....	18
Figure n°3. <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Figure n°4. <i>Toxoplasma gondii</i> : cycle de vie (A) et sources d'infections chez les humains (B).	21
Figure n°5. Signes cliniques et transmission du parasite en fonction de l'âge gestationnel...	26
Figure n°6. Coupe longitudinale schématique du fœtus et du placenta (A) et d'une villosité placentaire (B).....	28
Figure n°7. Évolution de la formation des capillaires fœtaux.	28
Figure n°8. Nombre de cas de TC diagnostiqués en France pour 1000 naissances.	31
Figure n°9. Séroprévalence générale de la toxoplasmose chez les femmes enceintes.	31
Figure n°10. Issues des toxoplasmoses congénitales diagnostiquées en France en 2015.	32
Figure n°11. Schéma théorique de la cinétique évolutive des Ig durant une toxoplasmose. .	42
Figure n°12. Comparaison du profil sérologique du couple mère/enfant.....	45
Figure n°13. Algorithme de dépistage de la maladie de Chagas chez la femme enceinte.	47
Figure n°14. Algorithme de diagnostic de la maladie de Chagas congénitale chez le nouveau- né.	47
Figure n°15. Examens biologiques pratiqués sur la femme enceinte et l'enfant suspecté de toxoplasmose congénitale.....	49
Figure n°16. Algorithme décisionnel pour le nouveau-né issu de mère infectée par <i>T. gondii</i> ou fortement suspectée d'infection durant la grossesse.	49
Figure n°17. Schématisation de la population des IgG chez le fœtus et le nouveau-né.	50
Figure n°18. Représentation schématique d'une Ig soluble.	53
Figure n°19. Schéma simplifié de l'organisation des gènes des chaînes légères.	54
Figure n°20. Schéma simplifié de l'organisation de la chaîne H sur le chromosome 14.	54
Figure n°21. Représentations schématisées des RSS et des recombinaisons VDJ de la chaîne lourde IGH.....	55
Figure n°22. Représentation schématique de la commutation de classe.	56
Figure n°23. Réponse primaire et secondaire de l'immunité adaptative humorale.	58
Figure n°24. Devenir des LyB naïfs dans les organes secondaires et suivant la nature de l'Ag.	60
Figure n°25. Schéma des principaux sites de développement des LyB durant la vie intra- utérine.	61
Figure n°26. Schéma simplifié de la MS-BU sur une IgG.....	75
Figure n°27. Représentation simplifiée des polymorphismes en acides aminés portés par les allèles des 4 IGHG.	75
Figure n°28. Alignement des allèles IGHG et positionnement des amorces d'amplification. .	76
Figure n°29. Schéma du principe de l'ELISPOT B.	113
Figure n°30. Organelles sécrétoires contenant des protéines caractéristiques chez <i>T. gondii</i>	119
Figure n°31. Détermination d'ASC sécrétrices d'IgG dirigées contre SAG1 (expérience A) vs. lysate de <i>T. gondii</i> de type I (expérience B).	121
Figure n°32. Suivi de l'apparition des ASC anti-IgG totales et spécifiques du lysate parasitaire issues de CMN d'un individu séropositif à la toxoplasmose.	122
Figure n°33. Comparaison de réactivité entre cellules fraîches et cellules cryoconservées décongelées.....	123

Figure n°34. Comparaison de la réactivité cellulaire suivant l'anticoagulant et le réactif de séparation cellulaire utilisés sur des CMN fraîchement recueillies d'un individu sain.	124
Figure n°35. Impact des conditions de stockage et du temps d'acheminement des prélèvements sanguins.	125
Figure n°36. Situation géographique du Bénin et de la zone de recrutement STOPPAM.....	131
Figure n°37. Déroulé de l'étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose à partir de la cohorte STOPPAM.....	132
Figure n°38. Diagramme de flux du devenir des échantillons.....	134
Figure n°39. Situation géographique des sites de travail.....	139
Figure n°40. Diagramme de flux des recrutements du projet CoaLa.	141
Figure n°41. Technologie du test unique VIDAS®.	145
Figure n°42. Taux de réussite du génotypage de <i>T. gondii</i> en fonction de l'origine des échantillons biologiques.....	146
Figure n°43. Constitution des groupes mère/enfant(s) suivant le statut sérologique de la mère.	148
Figure n°44. Séroprévalence de la toxoplasmose suivant la méthode utilisée.	149
Figure n°45. Diagramme de flux du projet TOXODIAG.	152
Figure n°46. Répartition des inclusions des couples mère/enfant(s) en fonction des groupes d'étude depuis le démarrage du projet TOXODIAG.	156
Figure n°47. Apport mutuel des projets TOXODIAG et CoaLa.	156

Liste des tableaux

Tableau n°1. Exemples des différentes appellations des génotypes de <i>T. gondii</i>	23
Tableau n°2. Liste des allotypes Gm répertoriés.....	65
Tableau n°3. Liste des haplotypes G3m.....	66
Tableau n°4. Nombre de publications où le test ELISPOT est utilisé dans les maladies dues aux protozoaires.	114
Tableau n°5. Réactifs déposés pour préparer la plaque ELISPOT.	116
Tableau n°6. Schéma expérimental de conditionnement des échantillons.	124
Tableau n°7. Valeurs seuils du kit BioPlex®2200 ToRC IgG.....	133
Tableau n°8. Valeurs seuils du kit Platelia™ Toxo IgG.	134
Tableau n°9. Séroprévalence de la toxoplasmose et de la rubéole.	135
Tableau n°10. Séroprévalence de la toxoplasmose et de la rubéole suivant l'âge des femmes enceintes.	135
Tableau n°11. Valeurs seuils du test recomWell <i>Toxoplasma</i>	144
Tableau n°12. Valeurs seuils des kits VIDAS® TOXO.	146
Tableau n°13. Attribution d'un groupe sérologique suivant les résultats recomWell <i>Toxoplasma</i>	148
Tableau n°14. Séroprévalence de la toxoplasmose suivant la tranche d'âge.....	149

Préambule : à la découverte d'un projet scientifique ...

Si je devais considérer mon parcours professionnel comme une randonnée jalonnée d'étapes et mon arrivée au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) 216 « Mère et enfant face aux infections tropicales » comme l'entrée dans un village, alors l'aventure de ma thèse débiterait au moment où j'entre dans l'humble chaumière de Florence Migot-Nabias.

De par son travail sur le paludisme et entourée de ses étudiants-collaborateurs, Florence a combiné deux problématiques scientifiques pour les faire converger.

D'une part, il s'agit de ce qu'elle a pu tirer de sa réflexion sur le rôle des facteurs génétiques de l'hôte dans la réponse clinique et immunologique de cette parasitose, en l'occurrence les allotypes Gm (*Gamma marker*) des immunoglobulines (Ig) G développés plus loin dans le manuscrit. D'autre part, intervient ce qui a découlé de la réflexion sur la construction de la réponse immunitaire spécifique du paludisme chez le jeune enfant, où la question de la proportion dans le sang du nouveau-né des IgG néosynthétisées par l'enfant et des IgG maternelles est posée.

Ainsi, depuis 2010, son groupe de travail et elle butinent autour de cette petite molécule qu'est l'immunoglobuline. En utilisant des techniques biologiques comme la spectrométrie de masse, la biologie moléculaire ou cellulaire, son projet cherche à mieux caractériser la réponse immunitaire propre à l'enfant en étudiant l'immunoglobuline spécifique du nouveau-né lors d'infections de la mère durant la grossesse. L'intérêt est aussi d'utiliser ce potentiel biologique comme outil de diagnostic pour les infections parasitaires congénitales, notamment dans les cas de la toxoplasmose et de la maladie de Chagas.

La différenciation des Ig sériques basée sur le polymorphisme peptidique du fragment Fc (Fragment cristallisable) en utilisant une approche par spectrométrie de masse est la partie la plus avancée du projet global. Elle a donné lieu à un brevet et suit son évolution. Ce travail a ouvert de nouvelles pistes de réflexion sur l'Ig quant à l'utilisation de certaines de ses caractéristiques pour aider au développement de nouveaux outils de diagnostic biologique.

Mon projet de thèse dans tout ça ? Un peu de patience. Je l'aborderai après avoir décrit le contexte scientifique découpé en trois parties. Les infections parasitaires congénitales ouvriront les festivités avec un focus sur la toxoplasmose. Les techniques de diagnostic et leurs limites poursuivront cette introduction. Enfin, les Ig ou anticorps (Ac) néonataux clôtureront cette partie.

PARTIE 1 - CONTEXTE SCIENTIFIQUE¹

¹ Avertissement : plusieurs documents, ouvrages et sites internet scientifiques spécialisés m'ont servi à rédiger les trois chapitres de cette partie. Bien qu'énumérés dans « Références des sources utilisées », ils ne sont cités que ponctuellement suivant la pertinence de l'information apportée, afin d'alléger la lecture du manuscrit. Seuls les articles scientifiques sont cités dans le texte.

I-Infections parasitaires congénitales

I-1-Généralités sur les infections parasitaires congénitales

Pour Carlier *et al.* (2012) l'infection parasitaire congénitale au sens strict est une « infection résultant de la transmission de parasites vivants d'une femme enceinte infectée à son fœtus et qui persiste après la naissance » et pouvant survenir avant ou au moment de la délivrance. L'infection parasitaire, en dehors des conditions de vie des individus, est également favorisée par différents facteurs de risque comme le terrain immunitaire de la mère, la charge et le génotype parasitaire (Carlier, 2007 ; Carlier *et al.*, 2012 ; Cevallos et Hernández, 2014). Privilégiée par le passage sanguin du parasite durant son cycle dans l'hôte, la principale voie de transmission est la voie transplacentaire. D'autres voies de transmission parasitaire sont également possibles, comme les voies digestive ou respiratoire *via* le liquide amniotique (Carlier *et al.*, 2012). Pour prévenir une infection chez la femme enceinte et ainsi éviter une transmission *in utero* chez son fœtus, un suivi durant la grossesse reste le meilleur moyen préventif associé à des conseils sanitaires (Carlier *et al.*, 2012). Si cela ne peut être réalisé, la prise en charge précoce du nouveau-né reste la démarche nécessaire afin d'éviter les séquelles, et cette démarche consiste dans la détection et le traitement de l'infection (Carlier *et al.*, 2012).

Plusieurs parasites sont susceptibles d'être transmis *in utero* de la mère à l'enfant (Denis, ouvrage 2002). De rares cas ont été décrits pour certains d'entre eux, comme pour *Trichomonas vaginalis*, les helminthes, la trypanosomose humaine africaine (Lindner et Priotto, 2010) et la leishmaniose, avec une particularité pour *Plasmodium sp* qui s'apparente plus à une infection placentaire (Carlier *et al.*, 2012). Sinon, les deux principaux protozoaires identifiés lors d'infections congénitales sont *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas et *Toxoplasma gondii*, responsable de la toxoplasmose (Carlier *et al.*, 2012).

Comme cité dans le préambule, la conception du projet scientifique s'articule dans le contexte des infections parasitaires congénitales. Ainsi, après avoir abordé succinctement la maladie de Chagas pour mettre en avant les préoccupations qu'elle suscite, un chapitre détaillé est consacré à la toxoplasmose congénitale, qui a été choisie pour initier mon travail.

I-2-Grandes lignes sur la maladie de Chagas congénitale

La maladie de Chagas, causée par *Trypanosoma cruzi*, est contractée suite au contact avec les déjections d'une punaise hématophage appartenant à la famille des *Reduviidae*, sous-famille des *Triatominae*, vecteur du parasite (figure n°1). Environ 8 à 10 millions de personnes sont infectées dans le monde, principalement en Amérique du Sud. Les principaux facteurs de risque sont la résidence en zone de transmission vectorielle, les voyages des femmes enceintes vers une zone d'endémie ou bien la réactivation du parasite suite à une immunodépression (Cevallos et Hernández, 2014). Une autre voie de transmission est décrite depuis quelques années, il s'agit de la transmission par voie orale après consommation de nourriture ou de fruits souillés (Peireira et al., 2010 ; Noya et al., 2015).



Figure n°1. *Trypanosoma cruzi* et son vecteur.
Source : [Site du CDC](#).

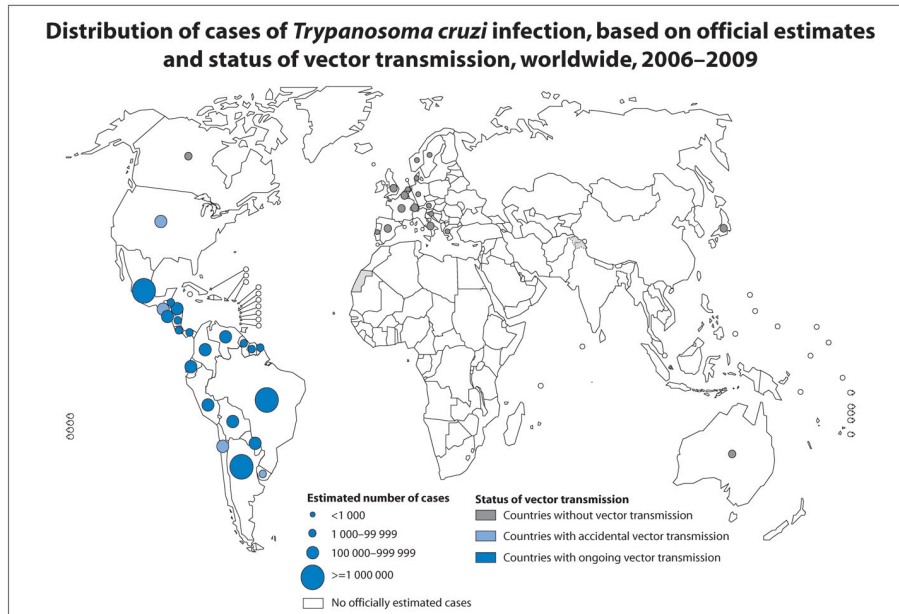
Cette parasitose se présente sous deux aspects : une phase aiguë où un nombre élevé de parasites circulent dans le sang durant environ 2 mois et où il y a peu ou pas de symptômes chez l'individu ; et une phase chronique où les parasites se localisent au niveau des muscles cardiaques et digestifs et peuvent entraîner une fin tragique suite à la destruction de ces derniers.

Au niveau clinique, l'infection congénitale mène à des symptômes variables allant du cas asymptomatique, majoritaire, à une infection mortelle. Dans le premier cas, les signes non spécifiques peuvent être confondus avec ceux du syndrome ToRCH - Toxoplasmose, Rubéole, Cytomégalovirus, Herpes (Carlier, 2007 ; Brutus et al., 2009). Sinon, dans les cas graves, les enfants congénitalement atteints présentent un tableau clinique assez lourd, pouvant associer : une prématurité, un faible poids à la naissance, un retard de croissance, une détresse respiratoire, une hépatosplénomégalie, des œdèmes ou de la fièvre ; et dans les cas

extrêmement graves et dont l'issue est souvent délétère, le cerveau et le cœur sont touchés, induisant une méningoencéphalite associée ou non à une microencéphalie ou une myocardite aiguë avec cardiomégalie et arythmie (Carlier, 2007 ; Brutus *et al.*, 2009 ; Cevallos et Hernández, 2014). Il est observé pour ces signes une forte mortalité qui est constatée 48h après la naissance dans 10% des cas (Carlier, 2007). Les co-infections, notamment avec le VIH mais aussi avec *Plasmodium vivax*, augmenteraient la transmission congénitale et la gravité des signes cliniques (Brutus *et al.*, 2009 ; Cevallos et Hernández, 2014). Administré précocement et sur deux mois, le traitement, benznidazole ou nifurtimox, donne de bons résultats (Cevallos et Hernández, 2014).

Concernant le suivi des enfants nés de mères infectées, un diagnostic biologique devrait être répété plusieurs fois durant la première année de vie. Ce diagnostic est réalisé par la mise en évidence du parasite dans le sang avant les 6 mois de vie de l'enfant et par la recherche d'Ac sériques après 10 mois de vie, après la clairance des Ac maternels. Actuellement, cette démarche est essentielle puisque dans de nombreux cas l'infection est démasquée à un stade ultérieur. Ainsi, si le diagnostic est posé de façon précoce, la réponse clinique est bonne (Cevallos et Hernández, 2014). Cependant dans les zones d'endémie la population à risque a un accès limité au diagnostic et au traitement (Basile *et al.*, 2011).

Bien que la maladie de Chagas soit toujours importante et circonscrite en Amérique Latine et Centrale, elle se propage en dehors de sa zone vectorielle vers d'autres continents, notamment en Europe (Schmunis et Yadon, 2010 ; Basile *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Guerineau *et al.*, 2014 ; Requena-Méndez *et al.*, 2015). La circulation des personnes chroniquement infectées et asymptomatiques, source de cette diffusion (Cevallos et Hernández, 2014), est notifiée sur la figure n°2, dernière mise à jour de la distribution de la maladie faite par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figure n°2. Distribution de la maladie de Chagas.

Source : http://gamapservier.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png

Parmi les populations migrant des zones d'endémie vers les régions non endémiques, 3 à 5 % des individus sont porteurs du parasite (Schmunis et Yadon, 2010), ce pourcentage est entravé par le nombre de personnes non recensées pour faute de papiers officiels (Basile *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Guerineau *et al.*, 2014). Ainsi, hors zone vectorielle, les sources principales de diffusion de la parasitose sont la transfusion sanguine, le don d'organes et la transmission *in utero* de la mère à l'enfant (Schmunis et Yadon, 2010 ; Basile *et al.*, 2011).

Dans les pays endémiques pour la maladie de Chagas, des campagnes de prévention utilisant la lutte anti-vectorielle ont été mises en place et ont permis de réduire l'incidence de la maladie (Cevallos et Hernández, 2014). Cependant, comme le mentionne l'OMS dans ses recommandations, il est important de réaliser un dépistage chez les nouveau-nés de mères infectées, de rester vigilant quant à la dissémination de la maladie notamment suite aux mouvements des populations, d'autant plus que la transmission peut être trans-générationnelle (Brutus *et al.*, 2009 ; Carlier *et al.*, 2011), et d'étendre l'accès au diagnostic et au traitement.

Au problème de santé publique lié au flux migratoire (WHO, 2010 b) s'ajoute une inquiétude relative au peu d'expérience des professionnels de la santé vis-à-vis de cette parasitose. Effectivement, même si le taux moyen global de transmission congénitale est de 4,7% (Cevallos et Hernández, 2014), la maladie de Chagas congénitale, qui fait partie des infections tropicales dites négligées (WHO, 2010 b) et qui représenterait 3 naissances sur 1000 en Europe (Basile *et al.*, 2011), n'est pas familière du corps médical pour une prise en charge rapide dans les pays non endémiques (Basile *et al.*, 2011 ; Pays, 2011 ; CDC, 2012 ; Woodhall *et al.*, 2014). Ainsi, l'OMS a réuni plusieurs pays européens afin d'établir des recommandations (WHO, 2010 a), et en attendant une harmonisation de la procédure, certains d'entre eux, principalement l'Espagne, ont mis en place des programmes de surveillance (Basile *et al.*, 2011 ; Rodari *et al.*, 2018).

Malgré les différentes techniques proposées pour réaliser un diagnostic biologique de la maladie de Chagas congénitale, le besoin de disposer d'une solution précoce pour identifier cette pathologie sans multiplier les examens se fait ressentir (Cevallos et Hernández, 2014). L'OMS le souligne également en souhaitant développer des réseaux dont l'un des objectifs est la « promotion de la recherche de tests de diagnostic pour le dépistage et de diagnostic de l'infection ». Cela limiterait l'importance des perdus de vues parmi les enfants (55%) car perdus de vue dans les pays endémiques et aiderait le personnel de santé dans les pays non-endémiques où le sous-diagnostic est important (>90%), représentant un cas diagnostiqué pour six cas non diagnostiqués (Cevallos et Hernández, 2014).

I-3-La toxoplasmose

I-3-1-Toxoplasma gondii : un parasite rusé

I-3-1-1-Un peu d'histoire

Le parasite responsable de la toxoplasmose est le protozoaire *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (figure n°3). Il a été découvert pour la première fois en 1908 à l'Institut Pasteur de Tunis par Nicolle et Manceaux chez un petit rongeur du désert *Ctenodactylus gondii*.

Le premier cas de toxoplasmose congénitale a été décrit en 1923 par un ophtalmologiste tchèque, Joseph Jankù. La mise en évidence du parasite dans un cas d'encéphalite chez l'enfant a été faite en 1939. La première technique de diagnostic immunologique a été mise au point en 1948. Dans les années 1960, le nombre élevé de cas de toxoplasmose congénitale

à l'origine de troubles sévères neurologiques et oculaires a été mis en avant grâce aux travaux de Desmonts et Couvreur. Le cycle parasitaire a été totalement élucidé en 1969. Dans les années 1970, débute l'intérêt de la communauté scientifique sur la réactivation du parasite chez les immunodéprimés et dans les années 1990 les études sur les génotypes de *T. gondii* commencent ([Robert-Gangneux et Dardé, 2012](#)).

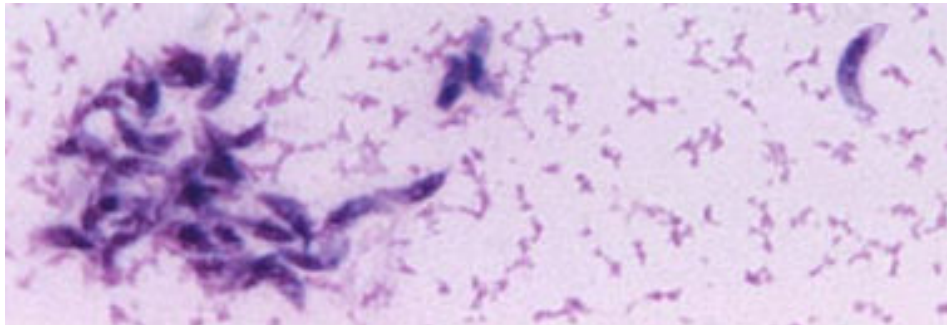


Figure n°3. *Toxoplasma gondii*.
Source : [Site du CDC](#).

I-3-1-2-La biologie du parasite

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire appartenant à la famille des *Sarcocystidae*. Il est hébergé dans deux hôtes, l'hôte définitif, les félinés et en particulier les chats, où se déroule son cycle sexué, et l'hôte intermédiaire, les mammifères homéothermes également qualifiés de faune sentinelle ([Givens et Marley, 2008](#)) et les êtres humains, chez lesquels se déroule son cycle asexué ([Boothroyd et Grigg, 2002](#) ; [Robert-Gangneux et Dardé, 2012](#)). Sa transmission est dynamique, intra-hôte intermédiaires ou inter-hôtes (hôte définitif-hôte intermédiaire), de façon directe ou indirecte. Chez l'être humain, les trois formes infectieuses sont les oocystes, lors de l'ingestion des parasites venant du milieu extérieur, les tachyzoïtes, formes invasives à multiplication rapide de tous types cellulaires et les bradyzoïtes, formes kystiques des hôtes intermédiaires ingérées par l'intermédiaire des viandes ([Boothroyd et Grigg, 2002](#)). La figure n°4 illustre le cycle parasitaire et les sources de contamination pour l'être humain.

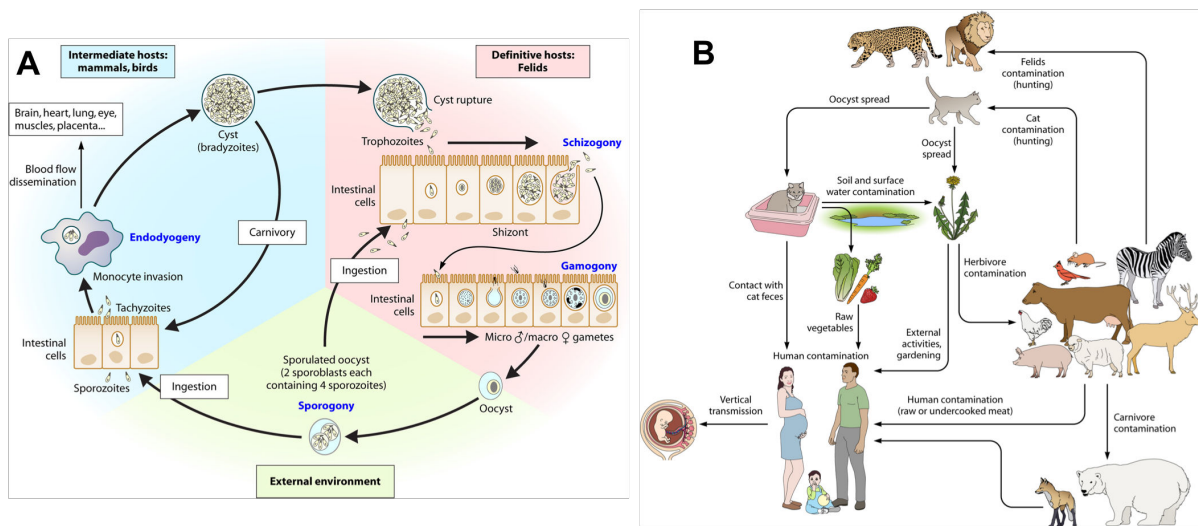


Figure n°4. *Toxoplasma gondii* : cycle de vie (A) et sources d'infections chez les humains (B).
 Source : Robert-Gangneux et Dardé, 2012

Après contamination par le parasite, les personnes restent immunisées toute leur vie, cela étant dû à l'enkystement des parasites dans les tissus des individus, au niveau du cerveau et de la rétine (CNR Toxoplasmose, 2017 ; Robert-Gangneux et Dardé, 2012). Malgré cette impasse parasitaire, chez les immunodéprimés, une réactivation des bradyzoïtes en tachyzoïtes est possible (Robert-Gangneux et Dardé, 2012).

I-3-1-3-Formes cliniques de la toxoplasmose

La toxoplasmose est une maladie cosmopolite, généralement asymptomatique et bénigne dans 80% des cas, sauf chez les immunodéprimés et le fœtus lors d'une primo-infection chez la femme durant sa grossesse, appelée toxoplasmose congénitale et détaillée plus loin.

Chez les personnes immunocompétentes, les formes symptomatiques bénignes sont comparables à une mononucléose accompagnée d'une fièvre modérée. La guérison est spontanée. De rares cas de complications sont observables lorsque la souche du parasite est peu adaptée à son hôte intermédiaire (Robert-Gangneux et Darde, 2012). Des formes oculaires sont observées comme localisation secondaire des kystes de toxoplasme chez les jeunes sujets immunocompétents ayant eu une toxoplasmose congénitale passée inaperçue. Chez les personnes immunodéprimées, ayant un déficit important de l'immunité cellulaire, la toxoplasmose fait suite à une réactivation des bradyzoïtes. C'est le cas pour les personnes

infectées par le VIH, celles ayant un cancer ou ayant subi une greffe ou bien celles qui sont séronégatives à la toxoplasmose et qui ont reçu une greffe d'un donneur positif.

I-3-1-4-Les différents géotypes de *T. gondii* et la notion de virulence

Les échantillons permettant des études sur la biologie des populations du parasite proviennent principalement d'Europe, d'Amérique du Nord et du Sud. Les cas cliniques, alimentant ces données, émanent notamment des immunodéprimés (VIH, greffes), des cas de toxoplasmose congénitale ou oculaire (Boothroyd et Grigg, 2002). Ces données seront de plus en plus enrichies par celles provenant d'Asie et d'Afrique, en raison de l'intérêt croissant sur la distribution géographique du parasite à travers ses différents hôtes, notamment intermédiaires. Cette contribution permettra de capitaliser les informations concernant la génétique évolutive du parasite et d'améliorer la connaissance sur les relations entre virulence et souche parasitaire (Boothroyd et Grigg, 2002).

Ainsi, si je prends comme exemple et fais un comparatif avec les données fournies par les projets 1000 Génomes et *African Genome Variant Project* qui sont des outils utiles pour le suivi et la compréhension de l'évolution des populations humaines, des études plus fines sur la diversité génétique de *T. gondii* permettent de proposer des classifications (Su et al., 2012) et de constater une distribution des différents géotypes dépendante de la zone géographique (Shwab et al., 2014). En effet, les avancées technologiques qui ont eu lieu au fil des années ont rendu possible une caractérisation plus précise du parasite. La première classification est structurale, repose sur une analyse du profil iso-enzymatique et regroupe schématiquement les parasites en trois principales lignées clonales les types I, II et III, et une lignée non clonale représentée par les souches atypiques (Howe et Sibley, 1995 ; Dardé, 2004 ; Schwab et al., 2014). Cette classification, toujours utilisée, devient cependant obsolète face aux données fournies par les multiples techniques de géotypage - étude des microsatellites, amplification après restriction enzymatique (PCR-RFLP, *Polymerisation Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), séquençage haut débit aussi appelé *Next-Generation Sequencing* (NGS). Ces techniques ont permis de répertorier environ 230 géotypes, notés #1 à #n (site ToxoDB ; Schwab et al., 2014), appartenant à 16 haplogroupes, où sont réunis les organismes qui ont un profil génétique similaire mais non identique et qui partagent un ancêtre commun, eux-mêmes regroupés en 6 clades (Su et al., 2012). Il n'y a pas

de nomenclature standard pour désigner un génotype, car suivant la technique utilisée pour génotyper *T. gondii*, l'appellation est différente. L'étude des microsatellites dénomine le parasite suivant la zone géographique, *i.e.* Africa 1, tandis que les parasites identifiés par PCR-RFLP portent un numéro spécifique attribué par la base de données ToxoDB, *i.e.* génotype #13, qui inclut uniquement les séquences issues de cette technique (Shwab *et al.*, 2014). Le tableau n°1 tente de regrouper les différentes informations concernant les génotypes parasitaires les plus souvent mentionnés.

Génotype déclaré dans ToxoDB (PCR-RFLP)	Clone/ Lignée clonale/Haplogroupe d'appartenance Autres informations	Localisation
Génotype #1	Type II/Lignée Type II/ Haplogroupe 2	Amérique du Nord Europe
Génotype #2	Type III/Lignée Type III/ Haplogroupe 3	Afrique Amérique du Nord Europe
Génotype #3	Variant Type II/Lignée Type II	Afrique Amérique du Nord Europe
Génotype #4	Type 12/Atypique	Amérique du Nord
Génotype #5	Type 12/Atypique	Amérique du Nord
Génotype #6	-/Atypique/Haplogroupe 6/ Africa 1 Grande similarité avec le Type I Virulence positive vis-à-vis de la souris	Afrique
Génotype #9	-/Atypique/Chinoise 1	Asie
Génotype #10	Type I/Lignée Type I Virulence positive vis-à-vis de la souris	Amérique du Nord Europe
	-/-/Haplogroupe 14/Africa 3 Forte probabilité de recombinaison entre Africa 1, type II et type III Virulence positive vis à vis de la souris	Afrique

Tableau n°1. Exemples des différentes appellations des génotypes de *T. gondii*.
D'après le site [CRB Toxoplasma](#), Schwab *et al.*, 2014 et Galal *et al.*, 2018.

Cependant, toutes techniques confondues, les trois lignées clonales I, II et III sont les plus retrouvées en Europe et en Amérique du Nord, avec une prédominance pour le type II suivi du III et du type 12 respectivement (Boothroyd et Grigg, 2002 ; Ajzenberg *et al.*, 2009 ; Galal *et al.*, 2018). Les données montrent que les souches de l'hémisphère nord sont apparues récemment avec peu de dérive génétique, donc sont génétiquement proches (Howe et Sibley, 1995 ; Boothroyd et Grigg, 2002), en comparaison de celles des zones tropicales, notamment en Amérique du Sud, où une plus grande diversité existe (Dardé, 2004 ; Ajzenberg *et al.*, 2009 ; Su *et al.*, 2012 ; Schwab *et al.*, 2014).

En Afrique, bien que peu d'échantillons biologiques proviennent de ce continent et permettent une étude approfondie de la distribution et de la circulation des souches de toxoplasme, des études ont montré la présence des génotypes de type II ou de recombinants génétiques portant l'un des principaux allèles des types I, II ou III comme le génotype Africa (Velmurugan *et al.*, 2008 ; Ajzenberg *et al.*, 2009 ; Mercier *et al.*, 2010). Récemment, bien que circonscrite à un échantillonnage dont le profil est domestique, une revue montre une séparation géographique entre l'Afrique du Nord et de l'Est et l'Afrique de l'Ouest (Galal *et al.*, 2018). Au Nord et à l'Est, les lignées archétypales avirulentes de type II et III prédominent, se rapprochant de celles de l'Amérique du Nord et de l'Europe, tandis qu'à l'Ouest, une plus grande hétérogénéité existe : les souches Africa 1 et 3 y sont retrouvées ainsi que d'autres qui partagent des haplotypes communs avec celles de l'Amérique du Sud (Ajzenberg *et al.*, 2009 ; Galal *et al.*, 2018). La troisième lignée principalement retrouvée en Afrique centrale est l'haplogroupe 13 qui aurait un lien avec les souches asiatiques (Galal *et al.*, 2018).

La virulence d'une souche de toxoplasme est quant à elle déterminée de façon expérimentale suivant l'effet induit chez la souris. Bien que très informative, elle ne peut être totalement transposable à l'être humain (Boothroyd et Grigg, 2002 ; Saeij *et al.*, 2005). Ainsi, le type I est virulent car il est mortel pour l'animal, tandis que les autres types, dont les type II et III, peuvent soit avoir le même effet mais à plus long terme, ou alors être associés à une infection chronique asymptomatique (Dardé, 2004). De même, les types Africa 1 et 3, qui possèdent un allèle du type I, ont un effet délétère sur la souris (Mercier *et al.*, 2010). Les génotypes atypiques retrouvés en Amérique du Sud sont aussi très virulents (Dardé, 2004). Globalement les souches circulantes en zones tropicales sont les plus virulentes (Galal *et al.*, 2018). La multiplication rapide du type I ou de ses recombinants, par rapport à la multiplication plus lente des types II ou III dans les cultures cellulaires peut être un argument en faveur du potentiel de virulence (Saeij *et al.*, 2005).

I-3-2-La toxoplasmose congénitale

I-3-2-1-Généralités et signes cliniques

La toxoplasmose congénitale (TC) fait généralement suite à une primo-infection chez une femme durant sa grossesse après ingestion de kystes principalement ou d'oocystes. Exceptionnellement, les femmes séropositives peuvent également être le terrain d'une

infection congénitale soit lors d'une réactivation des parasites si la femme est fortement immunodéprimée, soit lors d'une nouvelle infection par une autre souche de toxoplasme (Calamy *et al.*, 2015 ; Elbez-Rubinstein *et al.*, 2009 ; Robert-Gangneux et Dardé, 2012).

Les tachyzoïtes, grâce à la circulation sanguine, diffusent dans tout l'organisme de la mère et atteignent le placenta (Barragan et Sibley, 2003). C'est une fois cette barrière franchie que le fœtus peut être contaminé par les parasites. Le risque global d'une transmission *in utero* est de 30%. Il est moins important en début de grossesse - 6% à 13 semaines d'aménorrhée (SA) - et augmente durant la gestation - 72% à 36 SA - (Dunn *et al.*, 1999). Cependant, les signes cliniques sont inversement proportionnels à l'âge gestationnel. Effectivement, de graves signes cliniques chez le fœtus signent une infection congénitale survenue en début de grossesse. Au tout début, peuvent survenir des morts fœtales *in utero* ou des avortements spontanés ; puis entre 8 et 20 SA des formes sévères mais viables peuvent apparaître ; chez les femmes sous traitement, ces signes deviennent moins invalidants lorsque la transmission se fait à partir du deuxième trimestre de la grossesse (Dunn *et al.*, 1999). La figure n°5 synthétise ces observations où la sévérité de l'infection est inversement proportionnelle au taux de transmission, précise les signes cliniques encourus chez le fœtus ou le nouveau-né en fonction de la période gestationnelle de l'infection et illustre deux signes cliniques évocateurs d'une toxoplasmose congénitale.

D'un point de vue général, l'impact de la toxoplasmose sur le long terme n'est pas bien connu, bien que, malgré une stabilité de la TC en France, 17% des enfants souffrant de la maladie présentent des séquelles oculaires graves (CNR Toxoplasmose, 2017).

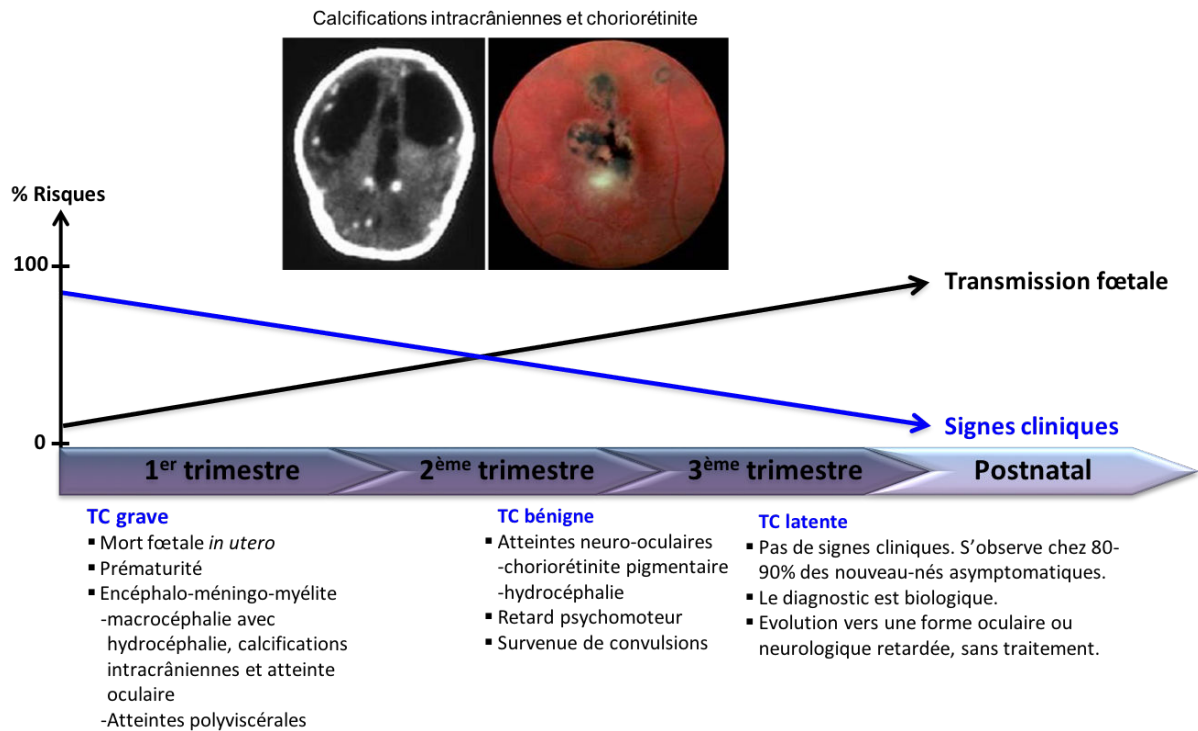


Figure n°5. Signes cliniques et transmission du parasite en fonction de l'âge gestationnel. Illustration personnelle d'après [Dunn et al., 1999](#), [Denis, 2002](#) et [Chabas, ANOFEL, 2010](#). Photos : ANOFEL.

L'impact de cette parasitose sur les événements morbides durant la grossesse chez l'humain est également mal connu. En effet, en France, la forme grave est rarement rencontrée en raison du programme de surveillance de la toxoplasmose chez les femmes enceintes, décrit plus loin. Cependant, elle est bien connue de la médecine vétérinaire car elle est souvent impliquée et retrouvée dans les avortements spontanés chez les animaux, notamment agricoles et domestiques ([Afssa, 2005](#) ; [Givens et Marley, 2008](#)). Toutefois, une étude iranienne, menée spécifiquement sur des avortements spontanés récurrents dans une structure spécialisée dans les infertilités humaines, montre la présence du parasite dans environ 4% des cas, ce pourcentage allant de 4 à 15% dans ce pays ([Abdoli et al., 2017](#)).

I-3-2-2-Les souches rencontrées dans la toxoplasmose congénitale

Comme cité plus haut, en France, le type II est le plus souvent rencontré. Au début des années 2000, il était suivi par le type I, les atypiques et le type III ([Howe et Sibley, 1995](#) ; [Ajzenberg et al., 2002](#) ; [Boothroyd et Grigg, 2002](#)). De nos jours, c'est le variant de type II qui le précède suivi des souches atypiques génétiquement différentes. Ces dernières ont été isolées de cas de TC survenus au 1^{er} trimestre de grossesse, 7SA et 13SA, conduisant à une mort fœtale avec

des séquelles cérébrales (CNR *Toxoplasmosse*, 2017). En Turquie, où le type II est également dominant, des cas de TC avec des souches hors zone géographique (Africa 1) ont été décrits (Döşkaya *et al.*, 2013). Bien que la notion de virulence associée au génotype parasitaire soit toujours en discussion, une récente analyse bibliographique sur 20 ans, où les données cliniques ont été associées au génotype parasitaire, montre que i/le type II est communément retrouvé en Europe, Asie et Afrique et donne peu de signes cliniques et des souches variées sont retrouvées en Amérique, ii/quelle que soit la souche, les nouveau-nés avec des problèmes cliniques importants sont nés de mères infectées durant la première moitié de la grossesse, iii/les types I et atypiques donnent des séquelles cliniques quel que soit le moment de l'infection et iv/le type I a tendance à être infectant durant la première période de gestation (Rico-Torres *et al.*, 2016). Une autre étude, aux États-Unis où les résultats ne sont pas impactés par un traitement médicamenteux, montre que les souches non-type II, principalement des souches recombinantes des trois principales lignées, sont retrouvées dans les régions chaudes et humides et sont associées à une fréquence plus élevée de prématurité et de cas cliniques plus sévères à la naissance que le type II (McLeod *et al.*, 2012).

I-3-2-3-L'infection du placenta par *T. gondii*

En plus de la charge parasitaire, le placenta joue un rôle dans la transmission de l'infection. C'est un organe chimérique où s'effectuent les échanges biologiques entre la mère et le fœtus. Il constitue également une barrière protectrice contre les agressions extérieures.

Même si le chemin pris par *T. gondii* pour envahir le placenta n'est pas encore totalement élucidé, des études ont montré que les tachyzoïtes toxoplasmiques colonisent les cellules trophoblastiques constituées des cytotrophoblastes - trophoblastes extra-villeux et cytotrophoblastes subsyncytiaux - et du syncytiotrophoblaste, dans l'espace inter-villeux. Ils envahissent préférentiellement les trophoblastes extra-villeux avant d'atteindre le syncytiotrophoblaste (Abbasi *et al.*, 2003 ; Robbins *et al.*, 2012). La figure n°6 permet de visualiser la localisation dans le placenta des différentes cellules mentionnées ci-dessus.

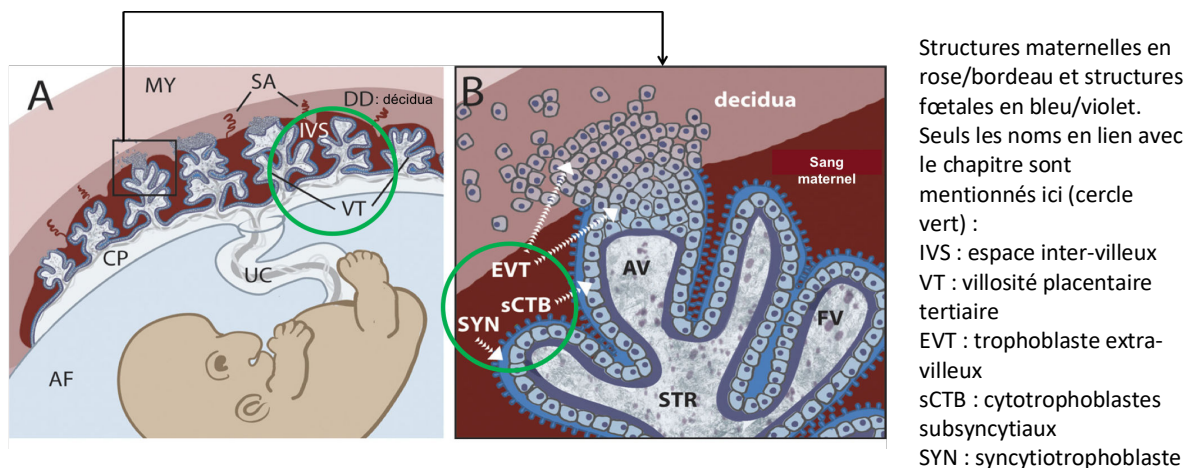


Figure n°6. Coupe longitudinale schématique du fœtus et du placenta (A) et d'une villosité placentaire (B).
Source : [Robbins et al., 2012](#).

Ce mode d'invasion est indépendant des trois clones principaux de la souche de toxoplasme ([Robbins et al., 2012](#)). Cependant le type I a tendance à se multiplier plus rapidement que les deux autres ([Barragan et Sibley, 2003](#)), augmentant ainsi la parasitémie, ce qui pourrait expliquer la gravité des signes cliniques observés avec ce type ou ses recombinaisons.

De plus, en fin de grossesse, le processus de développement du placenta fait que la couche de syncytiotrophoblastes devient plus fine, voire fusionne avec les cytotrophoblastes, comme le montre la figure n°7, ce qui rend plus accessible ce compartiment à l'invasion parasitaire ([Robbins et al., 2012](#)). Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation du taux d'infection observé en fin de grossesse ([Dunn et al., 1999](#)). Cependant, d'autres facteurs peuvent favoriser le passage placentaire par le parasite comme une ou des micro-brèche(s) du tissu ou un environnement inflammatoire induit par des co-infections ([Abbasi et al., 2003](#) ; [Robbins et al., 2012](#)).

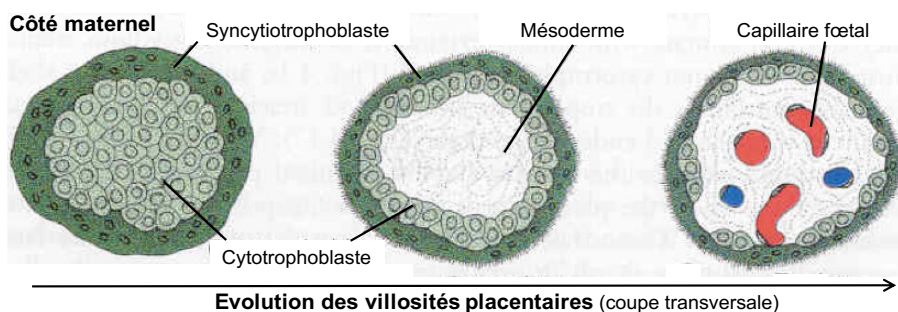


Figure n°7. Évolution de la formation des capillaires fœtaux.
D'après : <http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Chapitre1/placenta1.png>

I-3-2-4-Traitement de la toxoplasmose congénitale

Suivant la sensibilité des autorités sanitaires des pays à la toxoplasmose chez les femmes enceintes, la prévention ainsi que les traitements prophylactiques pour le fœtus et curatifs pour la mère et l'enfant, sont envisagés de façon différente.

La prévention consiste à suivre des règles hygiéno-diététiques (HAS, 2017), en particulier pour les femmes séronégatives. Afin de minimiser les risques de contamination par le toxoplasme, voire de les éviter, des recommandations sont données sur la consommation de viande, la cuisson des aliments, le lavage des mains suite à la manipulation de chats, de végétaux....

La surveillance échographique permet de déceler les signes cliniques évocateurs d'une infection congénitale et ainsi de proposer le cas échéant une interruption médicalisée de grossesse.

La spiramycine (Rovamycine[®]) est la molécule utilisée pour la prophylaxie fœtale durant le 1^{er} trimestre de grossesse (HAS, 2017) à 9 millions d'unités/jour pour réduire la transmission *in utero* dans les cas de forte suspicion d'infection maternelle. Ce macrolide, non tératogène, s'accumule dans le placenta créant une « barrière » qui empêche le passage du parasite entre la mère et l'enfant. Le traitement peut être maintenu tout au long de la grossesse dans l'optique de conserver une prophylaxie.

Lorsqu'une infection est diagnostiquée, l'association sulfamide (sulfadiazine ou sulfadoxine) et pyriméthamine complétée par la prise d'acide folinique (Folinoral 25[®]) est prescrite¹. Comme ce mélange chimique est tératogène, il est prescrit à partir du 2^{ème} trimestre de grossesse. Bien que son pouvoir de traitement de fond soit controversé (HAS, 2017), et en dépit de la nécessité d'études randomisées mais éthiquement critiquables, la réduction du risque d'infection fœtale et la diminution de l'importance des séquelles cliniques du futur enfant sont constatées suite à la précocité du traitement (Wallon et Peyron, 2016). Il faut toutefois prendre en considération l'ethnie de l'individu afin de s'assurer de l'absence de déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD), dans la mesure où la sulfadoxine peut provoquer une hémolyse dans ce cas.

¹ Deux associations sont possibles i/ Pyriméthamine (Malocide[®]) + Sulfadiazine (Adiazine[®]) + Acide folinique (Folinoral 25[®]) ou ii/ Pyriméthamine 25mg + Sulfadoxine 500mg (Fansidar[®]) + Acide folinique (Folinoral 25[®])
Le Fansidar[®] n'est plus commercialisé depuis octobre 2017.

A l'accouchement, si l'infection est avérée, le traitement ci-dessus est administré au nouveau-né avec un ajustement de la posologie pendant un an, sous surveillance hématologique (HAS, 2017). Le suivi du développement psychomoteur et un examen du fond d'œil sont effectués jusqu'à l'âge adulte.

Pour terminer ce chapitre sur le traitement, j'évoquerai l'utilisation de cette association de molécules dans le programme mondial de lutte antipaludique préconisé par l'OMS, depuis la fin des années 1990, qui pourrait avoir un impact sur l'infection par *T. gondii* en zone d'endémie palustre. En effet, l'OMS recommande pour les femmes enceintes vivant dans ces régions un Traitement Préventif Intermittent du paludisme à la Sulfadoxine-Pyriméthamine, TPIp-SP. Ainsi, les femmes enceintes peuvent être relativement protégées de la toxoplasmose par le TPIp-SP qui débute par une dose de 3 comprimés de SP¹ le plus tôt possible durant le 2^{ème} trimestre de grossesse puis lors de chaque consultation prénatale jusqu'à l'accouchement avec un intervalle d'un mois entre chaque dose. Depuis peu, l'OMS recommande au minimum 3 doses durant la grossesse, et la prise de l'acide folique est quotidienne dans ce programme (Briand *et al*, 2007 ; OMS, 2013).

Pour les jeunes enfants, nous pouvons penser que le traitement préventif intermittent du paludisme chez le nourrisson, TPIIn-SP, puisse jouer le même rôle de relative protection contre la toxoplasmose. Il s'agit d'une stratégie additionnelle de contrôle du paludisme, recommandée par l'OMS avec l'UNICEF, en Afrique subsaharienne dans les zones de transmission forte à modérée, où le TPIIn-SP est recommandé durant la première année de vie de l'enfant lors des vaccinations réalisées dans le cadre du programme élargi de vaccination (PEV), sous la dose 500mg/25mg (OMS, 2010 et 2011 ; de Sousa *et al.*, 2012).

I-3-2-5-La séroprévalence toxoplasmique

La disparité des politiques de santé publique, l'absence de programmes systématiques de dépistage et les diverses méthodes d'analyses utilisées (notions abordées dans la partie suivante) rendent difficile d'avancer des chiffres exacts sur la séroprévalence de la toxoplasmose congénitale (Orphanet).

¹ Une dose de TPIp-SP équivaut à la prise en une seule fois de 3 comprimés de SP contenant 500mg/25mg de SP pour un dosage final de 1500mg/75mg de SP.

Néanmoins, la séroprévalence à *T. gondii* augmente avec l'âge, est très variable d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre au sein d'un continent, voire d'une région à l'autre au sein d'un pays (figure n°8), et est dépendante de divers facteurs comme le climat, l'humidité, les us et coutumes alimentaires des individus, l'interaction avec la faune sentinelle et l'état immunitaire des personnes (Pappas *et al.*, 2009 ; Togerson et Mastroiacovo, 2013 ; Davoust *et al.*, 2015). Malgré tout, une analyse bibliographique pour connaître la répercussion de la toxoplasmose sur les femmes enceintes a été faite et une cartographie a été établie en 2009, figure n°9, illustrant les différentes séroprévalences rencontrées.

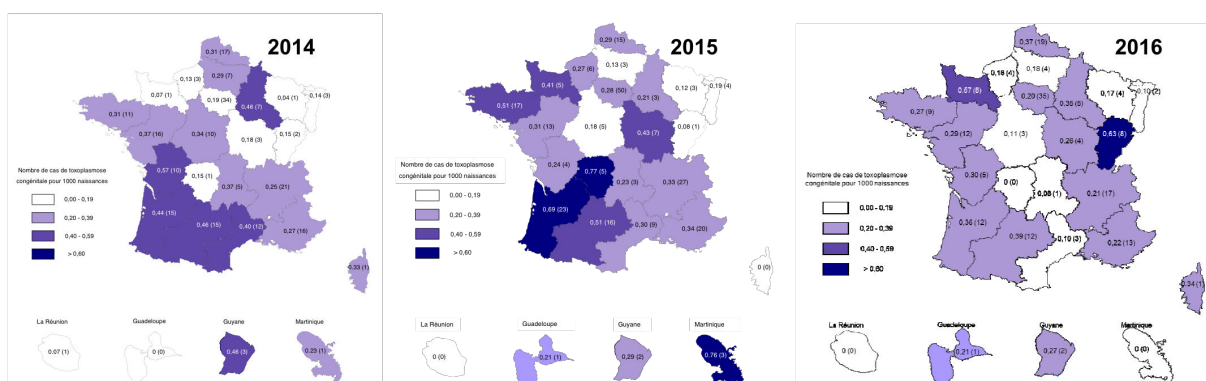


Figure n°8. Nombre de cas de TC diagnostiqués en France pour 1000 naissances.
Sources : [site du CNR Toxoplasmose](#).

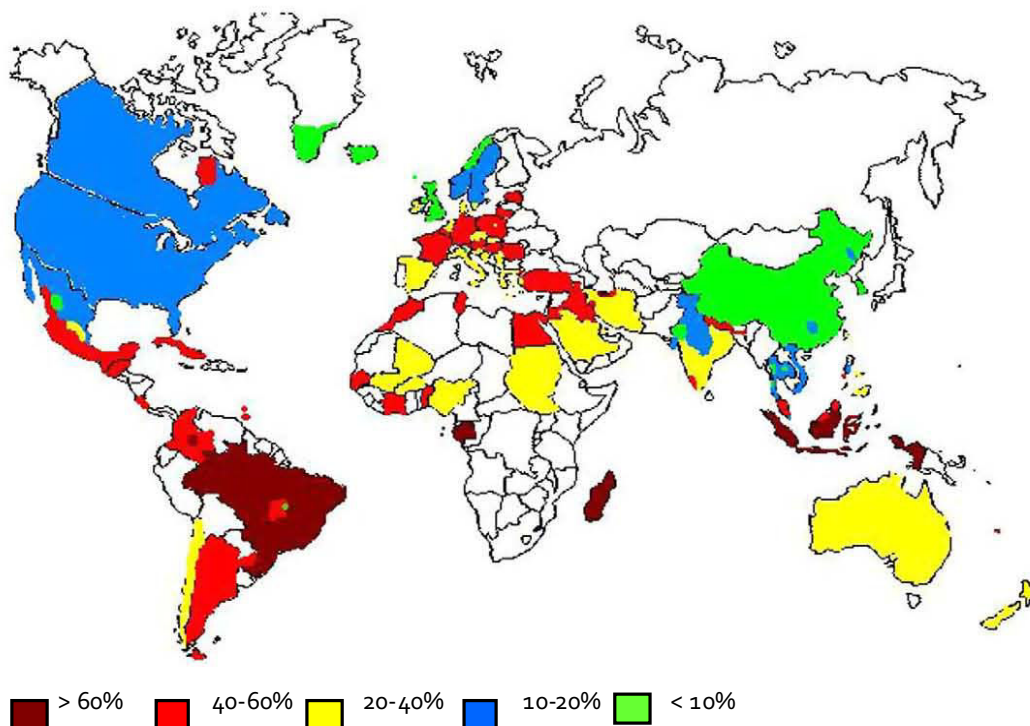


Figure n°9. Séroprévalence générale de la toxoplasmose chez les femmes enceintes.
D'après : Pappas *et al.*, 2009.

Suite à une large étude épidémiologique menée sur le fardeau des maladies liées à l'alimentation, demandée par l'OMS, Togerson et Mastroiacovo ont estimé l'incidence globale de la TC à 190 100 cas/an, soit 1,5 cas pour 1000 naissances, sachant que ce chiffre souffre des données manquantes de nombreux pays. Ils ont également transposé cette incidence en Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité (EVCI) couramment utilisé en santé publique, et connue également sous l'acronyme anglais *DALY* pour *Disability Adjusted Life Years*, associée à la TC. Le résultat obtenu pour cet indicateur - 1,20 millions d'EVCI - signale que la TC représente une charge de morbidité importante au niveau mondial (Togerson et Mastroiacovo, 2013). Quant à lui, le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) américain a considéré cette parasitose comme l'une des cinq infections parasitaires négligées, au même titre que la maladie de Chagas, dans le sens où peu d'attention est accordée à sa surveillance, à sa prévention et/ou à son traitement (site CDC), cette considération étant reprise et partagée par certains scientifiques (Pangui et al., 2013 ; Woodhall et al., 2014).

En France, bien que la séroprévalence soit très variable d'une région à l'autre, la tendance est à la baisse, avec une évolution de 54,3% en 1995 à 37,8% en 2010. Ceci est probablement dû aux changements de modes alimentaires dans la mesure où cette source reste la voie principale de contamination chez l'être humain (Afssa, 2005). En 2015, 246 cas de TC ont été recensés par le Centre National de Référence (CNR) Toxoplasmose dont les issues ont été listées dans la figure n°10. La prévalence globale de la TC est de 3,1 cas pour 10 000 naissances, les issues morbides restant stables depuis 2007 (CNR Toxoplasmose, 2017). Le dernier recensement de la TC récemment publié et qui sera intégré dans le rapport d'activités de 2018 indique une baisse de la TC avec 192 cas diagnostiqués et une prévalence globale de 2,4 cas pour 10 000 naissances.

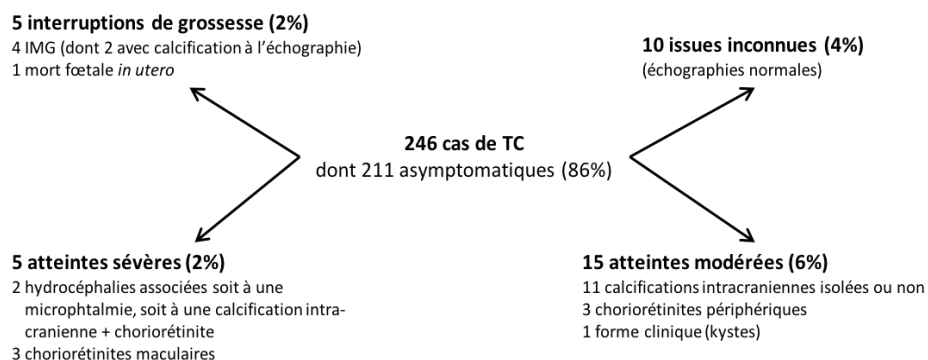


Figure n°10. Issues des toxoplasmoses congénitales diagnostiquées en France en 2015.
IMG : interruption médicale de grossesse. Illustration personnelle d'après CNR Toxoplasmose, 2017.

En Afrique de l’Ouest, malgré l’absence de données épidémiologiques (Pangui *et al.*, 2013), le constat est le même, à savoir que la séroprévalence de la TC est variable et son estimation exacte difficile. Les publications des dix dernières années font état d’une grande variabilité d’un pays à l’autre : 20% au Burkina Faso (Linguissi *et al.*, 2012), 32% au Sénégal (Ndiaye *et al.*, 2011 ; Bamba *et al.*, 2017), 40% au Ghana (Kwofie *et al.*, 2016) et 68% au Nigéria (Ajayi *et al.*, 2013). Elle a également tendance à baisser, comme au Ghana où elle est passée de 74% en 2006 (Ayi *et al.*, 2009) à 40% en 2016, et à Cotonou, capitale économique du Bénin, où la séroprévalence est passée de 54% en 1993 (Rodier *et al.*, 1995) à 49% en 2012 (Ogouyèmi-Hounto *et al.*, 2014). Toujours au Bénin, la variabilité inter-régionale est aussi observée, 30% en 2011 dans le département de l’Atacora au nord du pays (de Paschale *et al.*, 2014), 49% en 2012 dans le département du Littoral au sud du pays, où se situe Cotonou (Ogouyèmi-Hounto *et al.*, 2014), et 36% en 2016 dans le département de l’Atlantique, jouxtant celui du Littoral à l’ouest (Sissinto Savi de Tové *et al.*, 2018).

I-4-POINTS A RETENIR

- Les deux principales infections parasitaires congénitales sont la maladie de Chagas causée par *T. cruzi* et la toxoplasmose causée par *T. gondii*.
- La maladie de Chagas congénitale est principalement retrouvée en Amérique du Sud où sont présents les vecteurs qui en assurent la transmission. Cependant, les flux migratoires des populations humaines favorisent son implantation en dehors de sa principale zone d'endémie.
- La toxoplasmose est une infection parasitaire cosmopolite et la majorité des cas de TC répertoriés est essentiellement attribuable à *T. gondii* de type II. Cependant, les études de diversité génétique de *T. gondii* amènent à révéler d'autres génotypes dont la répartition suit l'évolution de l'espèce et dont certains types sont associés à un profil de virulence plus important et peuvent ainsi potentiellement entraîner de lourdes conséquences pour le fœtus.
- Une femme immunisée contre la toxoplasmose n'est pas à l'abri d'une infection par une souche de *T. gondii* différente de celle ayant entraîné l'immunisation.
- La méconnaissance de la maladie de Chagas en dehors de sa zone de transmission vectorielle ainsi que la méconnaissance de l'hétérogénéité des souches circulantes de *T. gondii* et de leur possible virulence compliquent la précocité du diagnostic lors d'une infection congénitale par l'une ou l'autre de ces parasitoses.

II-La gestion de la prise en charge - un délicat consensus

Il est difficile d'aborder ce chapitre sur la prise en charge des infections congénitales en listant uniquement les techniques de diagnostic et leurs limites sans évoquer les différentes mesures de santé publique. Comme précédemment, je survolerai le cas de la maladie de Chagas et détaillerai d'avantage celui de la toxoplasmose.

II-1-Les politiques de santé publique

II-1-1-La maladie de Chagas congénitale

Depuis les années 1990 avec l'aide de l'Organisation Panaméricaine de la Santé (OPS), plus connue sous la dénomination *Pan American Health Organization* (PAHO), les pays d'endémie de l'Amérique du Sud se sont regroupés en Initiatives afin de mettre en place des programmes régionaux de prévention et de lutte contre la maladie de Chagas par le contrôle du vecteur et par le dépistage des individus faisant un don de sang. Cette stratégie a fortement contribué à une diminution de la maladie pour ces deux voies de transmission (Cevallos et Hernández, 2014), mais à proportionnellement favoriser la part relative à la transmission *in utero* comme principal mode de transmission du parasite. Ainsi, c'est à partir des années 2000 que l'OPS a demandé i/que la notion de maladie de Chagas soit notifiée dans les antécédents médicaux des femmes enceintes et ii/que chaque pays élabore son propre protocole de détection rapide de la maladie de Chagas congénitale en fonction des capacités de ses structures de santé et de sa situation épidémiologique propre. Actuellement, la démarche de l'OPS est d'uniformiser les modalités de diagnostic et de traitement de la maladie de Chagas congénitale en les incluant dans son programme de santé publique mère/enfant visant à l'élimination de la transmission du VIH, de la syphilis et de l'hépatite B. En attendant, ses recommandations incluent i/un diagnostic par le dépistage sérologique universel pour chaque femme enceinte lors des examens prénataux, ii/la réalisation d'un examen parasitologique périnatal immédiat, chez les nouveau-nés issus de mères séropositives à *T. cruzi* et iii/la mise en place de traitement pour les cas vérifiés de nouveau-nés infectés (site de la PAHO).

C'est dans ces mêmes années, fin 1990, que les pays non-endémiques ont vu augmenter le flux migratoire des personnes en provenance d'Amérique du Sud (WHO, 2010 a).

Actuellement, la surveillance systématique des dons de sang est réalisée aux États-Unis comme en Europe ([site CDC](#) ; [WHO, 2010 a](#)) où celle des dons d'organes est également effectuée. Sinon, bien que l'OMS souhaite mettre en place un système intégré spécifique pour assurer le diagnostic précoce et le traitement des cas congénitaux, aigus ou de réactivation, et comme aucun traitement maternel ni prophylaxie foetale ne peuvent être administrés durant la grossesse en raison du caractère tératogène des médicaments, elle recommande dans le cadre de la prévention de la transmission *in utero* de traiter les femmes en âge de procréer présentant une infection chronique, et de réaliser chez les femmes enceintes deux tests sérologiques pour le diagnostic marqués CE, en attendant une harmonisation et une standardisation de la procédure ([WHO, 2010 a](#)).

Enfin concernant l'impact financier, après avoir procédé à des simulations, une étude a montré le gain économique que pourrait faire un pays non-endémique comme l'Espagne s'il appliquait le dépistage systématique chez les femmes originaires d'Amérique du Sud ainsi que chez leurs nouveau-nés. Effectivement, en se basant sur les données espagnoles et en utilisant l'indicateur QALY (*quality-adjusted life years*) ou années de vie pondérées par la qualité, indicateur comparable au DALY qui peut aussi déterminer la valeur pécuniaire d'une maladie sur l'espérance et la qualité de vie, elle a estimé que pour les femmes enceintes (*nouveaux-nés*) le coût imputable à la maladie de Chagas équivaldrait 96€/QALYs (22€/QALYs) en présence de dépistage systématique contre 1675€/QALYs (125€/QALYs) en son absence ([Sicuri et al., 2011](#)). Bien que certains paramètres n'aient pas été pris en compte, comme le coût du traitement, ce travail montre le bénéfice d'une prise en charge précoce et pourrait être pris en compte pour les futures stratégies de prise en charge de la maladie de Chagas dans les pays non-endémiques.

II-1-2-La toxoplasmose congénitale

La prévention de la toxoplasmose congénitale par le dépistage des femmes enceintes dépend des politiques de soins de santé, qui diffèrent d'un pays à l'autre, et de la prévalence du parasite ([Murat et al., 2013](#)). Cela impacte également les modalités d'application des techniques biologiques.

Par exemple au Canada, comme le risque d'exposition est considéré faible, le dépistage des femmes enceintes se fait uniquement si elles sont considérées exposées à un risque

d'infection, *i.e.* contact avec un chat, consommation de phoque, ou bien si leur état immunitaire est défaillant (Paquet et Yudin, 2013). Aux USA, il n'y a pas de dépistage et la prise en charge débute généralement suite à la découverte fortuite de signes cliniques fœtaux (Peyron *et al.*, 2017). Cette rationalisation de la prise en charge est questionnée que ce soit au niveau des répercussions cliniques (Peyron *et al.*, 2017), du coût sociétal (Stillwaggon *et al.*, 2011) ou de la prise en charge médicale précoce de la mère (Pomares et Montoya, 2016). En Afrique de l'Ouest, le suivi prénatal est pratiquement inexistant. Un défaut de connaissance de la toxoplasmose par le corps médical est aussi constaté, faisant suggérer par certains une nécessité de re-sensibilisation (Efunshile *et al.*, 2016). Le coût du dépistage précoce de 30 000 francs cfa (soit 45€) reste également un frein pour les femmes enceintes (Pangui *et al.*, 2013). Au niveau européen, une description du système de surveillance épidémiologique de la TC a été réalisée. Elle rapporte que sur les 28 pays qui ont participé à l'étude, 12 avaient un système de surveillance au sens large en suivant les recommandations de l'Union Européenne. Seuls trois pays ont un programme de surveillance national - l'Allemagne, le Danemark (arrêt du programme en juillet 2007) et la France - et l'Italie au niveau régional. Pour donner une idée du coût du système de surveillance national, ce rapport mentionne qu'au Danemark il s'élevait à 600 000€/an (Bénard *et al.*, 2008).

La France est le seul pays à exercer une rigueur dans le dépistage de la toxoplasmose chez les femmes enceintes. Ces dernières bénéficient d'un suivi sérologique systématique prénatal régi par l'article L154 du Code de la santé publique et par les décrets n°78-396 1978-03-17 et n°92-143 1992-02-14 relatifs aux examens obligatoires prénuptial¹, pré et postnatal. Cependant, comme les femmes ayant déjà une sérologie positive pour la toxoplasmose ne sont pas suivies durant leur grossesse, une réactivation du parasite passe donc inaperçue et n'est pas renseignée (Villard *et al.*, 2016 b). Ainsi, sur une année, cette prévention et le diagnostic associé de la toxoplasmose représentent près de 2 millions de sérologies pour un coût estimé à 32 millions d'euros. C'est pourquoi, en partenariat avec la Haute Autorité de Santé (HAS), le CNR Toxoplasmose mène un travail sur ce point afin d'apporter des éléments qui pourront aider à la décision de poursuivre ou de modifier ce programme de prévention (CNR Toxoplasmose, 2017).

¹ Depuis 2008 l'obligation du dépistage prénuptial a été supprimée : loi n°2007-1787 2007-12-20 relative à la simplification du droit.

La question du dépistage en masse, de l'effet du traitement précoce sur les signes cliniques et du rapport coût/efficacité demeureront tant qu'une information précise sur l'impact de la maladie au niveau mondial ne sera pas établie (Wallon et Peyron, 2018).

II-2-Les techniques de diagnostic et leurs limites

II-2-1-La maladie de Chagas congénitale

Schématiquement, deux types d'examens sont réalisés pour effectuer un diagnostic, il s'agit des examens directs pratiqués dès la naissance et des examens indirects, basés sur la recherche d'Ac spécifiques contre le parasite, pratiqués après 8 mois de vie.

Parmi les examens directs

La détection d'une infection congénitale chez un nouveau-né peut être faite en recherchant la présence du parasite vivant (Carlier *et al.*, 2011). Pour cela le frottis, la goutte épaisse ainsi que l'examen du sang frais sont particulièrement indiqués en phase aiguë de la maladie. La limite est la faible sensibilité de ces examens (Brutus *et al.*, 2009 ; Pays, 2011).

Les techniques de concentration, comme le microhématocrite, permettent un taux de détection plus important car elles compensent les faibles charges parasitaires (Brutus *et al.*, 2009). La limite est la présence intermittente du parasite dans le sang qui demande à ce que ces tests soient répétés plusieurs fois et sur le long terme, à J3 et à J30, afin d'obtenir une sensibilité intéressante (Brutus *et al.*, 2009 ; Pays, 2011).

Les limites communes sont que ces techniques demandent du personnel qualifié ainsi qu'un contrôle de qualité (Carlier *et al.*, 2011).

Viennent ensuite des techniques directes dites d'enrichissement ou d'amplification du parasite ou de son matériel génétique. Il s'agit des hémocultures, du xénodiagnostic et de l'amplification génomique.

La culture du parasite *via* les hémocultures est lente et demande à être répétée plusieurs fois en cas de faible parasitémie (Pays, 2011).

Le xénodiagnostic, assimilable à une inoculation du parasite à la punaise, demande une structure animalière pour l'élevage des vecteurs. Le résultat est obtenu après 30 à 60 jours,

et est positif lorsque des parasites sont observés dans les déjections des punaises. Des allergies au point de piqûre peuvent être observées (Pays, 2011).

La technique d'amplification de l'ADN par PCR est plus sensible mais plus chère et est réservée aux laboratoires spécialisés (Carlier *et al.*, 2011 ; Rivero *et al.*, 2017). Comme sa sensibilité diminue au cours de la maladie, elle est plus efficace durant le premier mois de vie du nourrisson et devient peu sensible dans les formes chroniques. Cependant, bien que de nouvelles approches dans ce domaine soient prometteuses pour le diagnostic précoce (Rivero *et al.*, 2017), la positivité de ce test demande une confirmation par une autre technique puisqu'elle ne signe pas la présence vivante du parasite (infection active), mais celle de son matériel génétique (Cevallos et Hernández, 2014).

La limite commune de ces trois techniques est leur manque de standardisation (Pays, 2011).

Parmi les examens indirects

Dans les premiers mois de vie, la sérologie conventionnelle n'est pas utile en raison du transfert des Ac maternels à travers le placenta, de plus la sérologie chez des nourrissons exempts d'infection mais issus de mères infectées est positive (Carlier *et al.*, 2012). Ainsi, les tests sérologiques sont effectués à compter du 8^{ème} mois de vie du nourrisson (Pays, 2011 ; Cevallos et Hernández, 2014) et comme le préconise l'OMS, deux tests sérologiques marqués CE comportant des antigènes (Ag) parasitaires différents doivent être utilisés. Généralement, sont préconisés un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) et une technique d'*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dont les principes sont succinctement développés plus loin. Cependant, ces tests doivent être évalués pour être standardisés (Carlier *et al.*, 2011 ; Pane *et al.*, 2018).

Un autre moyen indirect de mettre en évidence le parasite est de rechercher ses Ag. C'est le cas d'une technique peu invasive qui recherche la présence d'Ag parasitaires dans les urines grâce à des nanoparticules, appelée *Chunap test* pour *Chagas urine nanoparticle*. Elle est en cours d'investigation et a été avancée comme preuve de concept (Castro-Sesquen *et al.*, 2014). Cependant, la détection des Ag solubles dans les liquides biologiques n'a pas permis la détection de tous les cas infectés (Cevallos et Hernández, 2014). Une autre technologie utilisant des Ig de camélidés (lamas, chameaux), connue sous le nom de *Nanobodies*, se développe et semble prometteuse dans la recherche d'Ag parasitaires (Fernandes *et al.*, 2017).

II-2-2-La toxoplasmose congénitale

Les techniques décrites ci-après sont de deux types, directes et indirectes. Certaines sont réalisées dans les laboratoires de ville (*i.e.* les tests sérologiques) et d'autres dans des laboratoires où une expertise technique est requise (*i.e.* le western blot). Les techniques directes, utilisées pour des cas particuliers, permettent de mettre en évidence la présence du parasite ou de son ADN. Les méthodes indirectes, principalement les tests sérologiques qui détectent les Ac spécifiques du parasite, sont plus communément utilisées pour le diagnostic biologique de la toxoplasmose.

II-2-2-1-Les techniques de diagnostic direct

Examen microscopique

Afin de détecter directement le parasite dans un liquide biologique, comme le liquide amniotique, une coloration au May Grunwald Giemsa ou un marquage par un Ac monoclonal fluorescent sont réalisés sur un frottis ou une apposition.

Limite : la sensibilité est faible, car il est rare d'observer des parasites libres en raison du développement intracellulaire du toxoplasme. La HAS considère ce test comme ayant peu d'intérêt.

Isolement du parasite

Ce procédé se fait soit par inoculation à la souris, soit par culture cellulaire. Rarement utilisé pour le diagnostic, il l'est surtout pour des études génétiques des souches parasitaires, à des fins épidémiologiques en lien avec la virulence, notamment pour les souches atypiques ou pour compléter un résultat de PCR.

Inoculation à la souris : l'échantillon biologique est inoculé par voie intra-péritonéale ou sous-cutanée. S'ensuit le développement de la réponse immunitaire murine. Puis le sérum murin est analysé après une période de 2 à 3 semaines. Une confirmation de l'infection, en recherchant la présence de kystes cérébraux, est faite au bout de 4 à 6 semaines.

Limite : le délai de rendu des résultats est long, il faut du personnel qualifié et compétent et disposer d'une infrastructure spécialisée (animalerie).

Culture cellulaire : elle utilise principalement des lignées de cellules fibroblastiques embryonnaires humaines (MRC5).

Limites : cette technique est délicate, moins sensible que l'inoculation à la souris et sujette aux contaminations. Pour ces raisons, elle a été mise à l'écart par la HAS.

Recherche de l'ADN parasite par biologie moléculaire

L'utilisation de la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour rechercher le parasite dans les différents liquides biologiques. Bien que l'amplification du gène *B1* soit largement utilisée, gène présent 35 fois chez le parasite et absent des cellules de mammifères, le micro-satellite de 529 paires de bases, REP-529 répété 200 à 300 fois dans le génome du parasite, est une meilleure cible ([Murat et al., 2013](#)). Pour corrélérer la charge parasite dans le liquide amniotique et la gravité de la TC, la PCR quantitative est en cours d'évaluation comme diagnostic prédictif ([CNR Toxoplasmosse, 2017](#)).

Limites : il n'y a pas de standardisation de la technique ; résultat faussement négatif dans divers cas (faible concentration de parasite, présence d'inhibiteur dans les liquides biologiques, traitement antiparasitaire) ; la technique d'extraction de l'ADN impacte les résultats de la PCR ainsi que la texture des liquides biologiques utilisés ; le nombre de répétitions des cibles génétiques varie suivant les souches.

II-2-2-2-Les techniques de diagnostic indirect

En général, ce sont les IgM et IgG spécifiques du toxoplasme qui sont principalement recherchées et leur apparition au cours de l'infection se fait par l'étude de leur cinétique, comme l'illustre la figure n°11.

Cependant, une vigilance doit être apportée quant à l'interprétation des résultats, puisque la présence d'IgM n'est pas exclusive d'une infection récente. De plus, une précaution est à prendre concernant le choix des tests sérologiques utilisés. Effectivement, la cinétique antigénique doit être prise en considération pour la mise en évidence de l'isotype d'Ig. Les tests utilisant des Ag d'un lysat parasite, Ag entier, ou un Ag parasite de membrane, détectent les Ac produits précocement, tandis que ceux utilisant un mélange d'Ag cytosoliques ou métaboliques en plus de ceux de surface, détectent les Ac produits plus tardivement. De plus, le traitement anti-parasitaire joue un rôle sur le système immunitaire

et peut ralentir la cinétique d'évolution des Ac, donc impacter les résultats sérologiques (HAS, 2017).

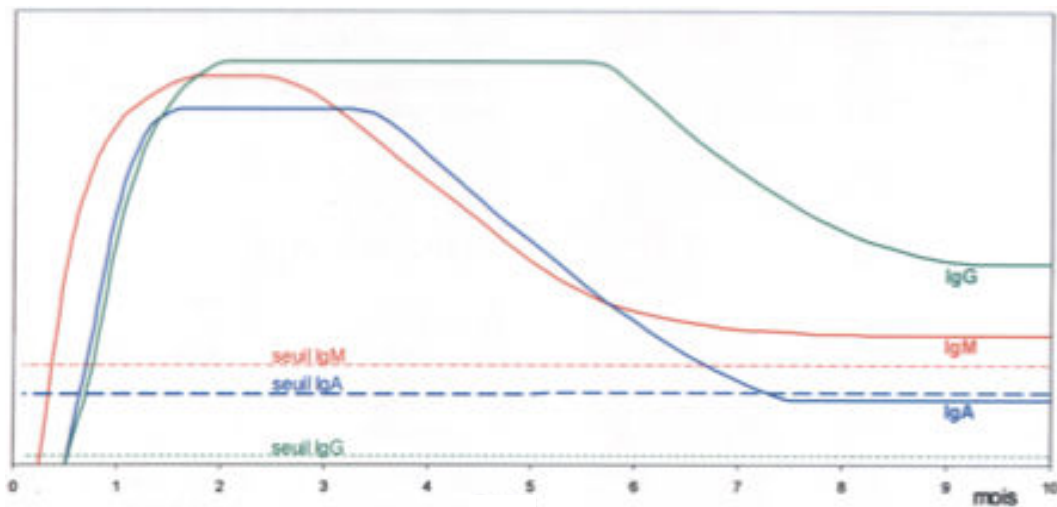


Figure n°11. Schéma théorique de la cinétique évolutive des Ig durant une toxoplasmose.

Source : Bessières *et al.*, 2006.

Sabin-Feldman dye-test : Gold standard

Cette technique permet la détection conjointe des IgG et des IgM. En utilisant un microscope à contraste de phase, la lyse des parasites est observée suite à l'incubation de dilutions sériques avec le parasite vivant en présence de complément. Son remplacement par une autre technique, comme l'immunochromatographie, plus rapide, est en cours d'évaluation par le CNR Toxoplasmose.

Limites : il est nécessaire d'inactiver le sérum et d'entretenir une culture de parasites vivants très virulents ; le complément doit provenir de sérum frais sans Ac anti-*Toxoplasma*.

Immunofluorescence indirecte (IFI)

A l'aide d'un microscope à fluorescence, cette technique permet la détection des IgM et des IgG spécifiques. Les tachyzoïtes entiers sont fixés au formol sur une lame et sont mis en contact avec des dilutions sériques.

Limites : lecture délicate ; risque de faux positifs en présence de facteurs antinucléaires ou de facteurs rhumatoïdes ; risque de faux négatifs si le taux d'Ig est faible ; technique longue.

Agglutination directe

Des dilutions sériques sont mises en contact avec une suspension de parasite entier afin de détecter conjointement les IgM et les IgG. Des hématies de mouton ou des billes de latex sont utilisées. Pour une détection des IgG uniquement, le test dit d'Agglutination Directe Haute Sensibilité nécessite l'ajout de trypsine et de 2-mercaptoéthanol.

Limite : maintien en culture de parasites, manque de sensibilité lorsque le titre d'Ig est faible.

Agglutination différentielle

Cette technique permet de comparer, à 6-12 mois d'intervalle, des titres d'IgG obtenus par agglutination sur des parasites entiers fixés avec des solutions différentes, formol ou méthanol. Le traitement au formol garde intact les Ag produits tout au long de l'infection. Le traitement au méthanol permet de mettre en évidence les Ac précocement produits. Limites : les différents Ag ne sont pas commercialisés, donc un maintien en culture de parasites est nécessaire ; la préparation des solutions est délicate.

Technique d'Immuno-Sorbent Agglutination Assay (ISAgA)

C'est une technique d'immuno-capture des IgM sériques diluées sur une phase solide sensibilisée par un Ac recombinant anti-IgM humaines. Après lavage, le toxoplasme formolé est ajouté. Un voile se forme au fond de la cupule si une reconnaissance Ag-parasitaire/IgM spécifique se fait. La détection des IgA et des IgE peut également se faire selon le même principe. Cette technique est utilisée pour détecter une infection récente.

Limite : bien que le test soit commercialisé, il demande une expertise technique.

Agglutination indirecte

Elle utilise des Ag extraits de tachyzoïtes fixés à des billes de latex.

Limites : le résultat du test dépend de la qualité des Ag parasitaires préparés ; résultats faussement négatifs si le taux d'Ac est élevé (phénomène de zone) ; il n'y a pas de distinction possible des isotypes des Ig dans ce mode de détection.

Test ELISA

C'est la technique automatisable la plus utilisée dans le diagnostic. Généralement, les Ag parasites sont adsorbés sur un support solide. Les sérums dilués sont ajoutés et les complexes immuns se forment. Après lavages, un Ac secondaire anti-isotype, *i.e.* anti-IgG, couplé à une enzyme est ajouté et se fixe sur le complexe immun. La révélation se fait par l'ajout d'un substrat avec son chromogène. La mesure de la densité optique est faite après ajout d'une solution stoppant la réaction enzymatique.

Cette technique est également utilisée pour mesurer l'avidité des IgG. Une étape de lavage avec de l'urée, agent dissociant des liaisons Ag-Ac, est ajoutée après la formation des complexes immuns. L'avidité est faible en début d'infection et augmente au fil du temps. Cette variation technique est utilisée moins pour dater l'infection que pour exclure une infection récente, lorsque les tests sérologiques montrent la présence d'IgM qui peuvent persister longtemps après une primo-infection.

Limites : des réactions croisées donnant de faux positifs sont signalées dans les cas de maladies auto-immunes ou dans un contexte infectieux autre durant l'analyse ; une disparité des résultats suivant les Ag parasites utilisés est observée lors de la comparaison de plusieurs automates ([Villard et al., 2016 b](#)) ; pour l'ELISA urée, bien que commercialisée, son interprétation peut être délicate ([Smets et al., 2016](#)).

Immunoblot ou Western blot

Cette technique est utilisée pour i/lever le doute sur la présence des IgG lorsque les résultats des tests sérologiques de première intention sont douteux et/ou discordants et ii/ la comparaison de profils immunologiques entre deux compartiments biologiques ou entre deux individus (mère/enfant), comme illustré sur la figure n°12. Elle remplace la technique Enzyme-Linked Immunofiltration Assay (ELIFA). Les Ag parasites cibles sont déposés sur une membrane, et se positionnent selon leur poids moléculaire. Les sérums sont ensuite déposés sur la membrane. La révélation permet de visualiser différentes bandes d'intérêt.

Limite : une expertise dans l'interprétation des résultats est requise.

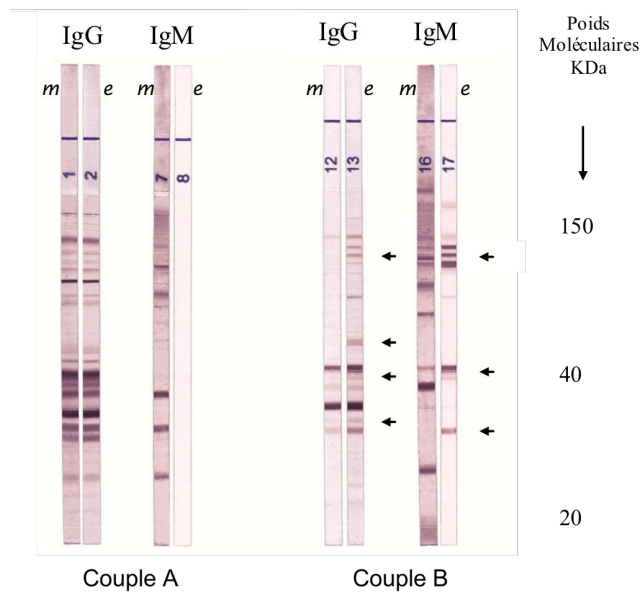


Figure n°12. Comparaison du profil sérologique du couple mère/enfant.

Couple A : la mère (m) a été contaminée durant la grossesse et son enfant (e) est indemne, ils ont le même profil sérologique IgG (IgG transmises). Couple B : la mère a été contaminée durant la grossesse et son enfant aussi, comme en témoigne la présence de bandes supplémentaires (flèches noires).

Source : <http://www.ldbiodiagnostics.com>.

II-2-2-3-Les nouvelles approches

Des équipes travaillent actuellement sur le développement d'un test qui permettrait la détection des 3 isotypes IgG, IgM et IgA anti-*Toxoplasma* simultanément sur une petite quantité de sérum ou de sang total en utilisant une lame recouverte d'or, la « Multiplex plasmonic gold platform » (Li *et al.*, 2016 ; Pomares *et al.*, 2017). Bien qu'intéressante, cette technique ne pourra pas être utilisée chez le nouveau-né puisqu'elle est basée sur la recherche d'Ac sériques.

Début 2016, un test rapide immuno-chromatographique (ICT) pour la toxoplasmose, de type Point Of Care Test (POC Test), a été commercialisé. Avec un faible volume d'échantillon, il permet une détection simultanée des IgM et IgG spécifiques anti-*Toxoplasma* sériques. Testé sur une cohorte française, principalement des sérums d'individus infectés par le génotype II, il l'a également été sur une cohorte américaine infectée par des génotypes plus éclectiques et donne de bons résultats. Même s'il doit être confirmé par un test quantitatif, ce test serait intéressant pour faire un dépistage de masse et à moindre coût. Cependant les limites décrites sont des résultats faussement positifs dont l'explication est à approfondir ou faussement négatifs lors d'un traitement antiparasitaire (Begeman *et al.*, 2017 ; Chapey *et al.*, 2017).

D'autres approches ciblent les cellules immunitaires. Des travaux utilisant la cytométrie en flux ont été menés sur les molécules de surface exprimées par les lymphocytes (Ly) T suite à une stimulation antigénique toxoplasmique d'une semaine. La molécule de surface CD25, surexprimée dans ces conditions, a été retenue comme potentielle candidate signant une infection toxoplasmique. Ceci aurait permis de poser un diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale. Cependant, cette approche appliquée sur du sang total de jeunes enfants a donné de faux positifs et demandait d'être davantage explorée (Kahi *et al.*, 1998 ; Kahi *et al.*, 1999).

Actuellement, l'approche la plus intéressante est celle du dosage de l'interféron γ (IFN γ) produit par les LyT, appelée *Interferon Gamma Release Assay* ou IGRA. L'échantillon sanguin est mis en contact avec l'Ag parasite pendant 24h, induisant la production d'IFN γ par les LyT. Puis, un test ELISA est pratiqué sur le surnageant de culture permettant de quantifier la molécule et ainsi d'établir un lien entre une forte concentration d'IFN γ et l'infection toxoplasmique (Chapey *et al.*, 2010 ; Chapey *et al.*, 2015 ; Mahmoudi *et al.*, 2017). Bien que ce test permette un diagnostic précoce, les limites rapportées par les chercheurs sont la non-réponse aux agents mitogènes, utilisés à titre de témoin positif de réactivité cellulaire, et le délai d'acheminement et de traitement de l'échantillon, qui, s'il dépasse 10 heures, entraîne une baisse de la sensibilité (Chapey *et al.*, 2015). Par ailleurs, une standardisation de la nature du stimulateur antigénique parasite serait souhaitable (Mahmoudi *et al.*, 2017).

II-3-La complexité du diagnostic biologique

II-3-1-La maladie de Chagas congénitale

D'après ce qui a été vu précédemment, la maladie de Chagas congénitale est évitable en réalisant un dépistage chez toutes les femmes en âge de procréer originaires de pays endémiques et y résidant ou non (transmission intergénérationnelle), ou ayant fait un séjour en zone d'endémie. Elle peut également être dépistée après l'accouchement chez le nouveau-né afin de lui administrer si nécessaire un traitement de façon précoce. A défaut d'un canevas homogène et standardisé, une conduite à tenir pour chaque cas a été proposée pour la France (figures n°13 et n°14), où l'on voit qu'en plus des techniques citées ci-dessus i/l'histoire de la mère est importante et ii/une association de tests est nécessaire.

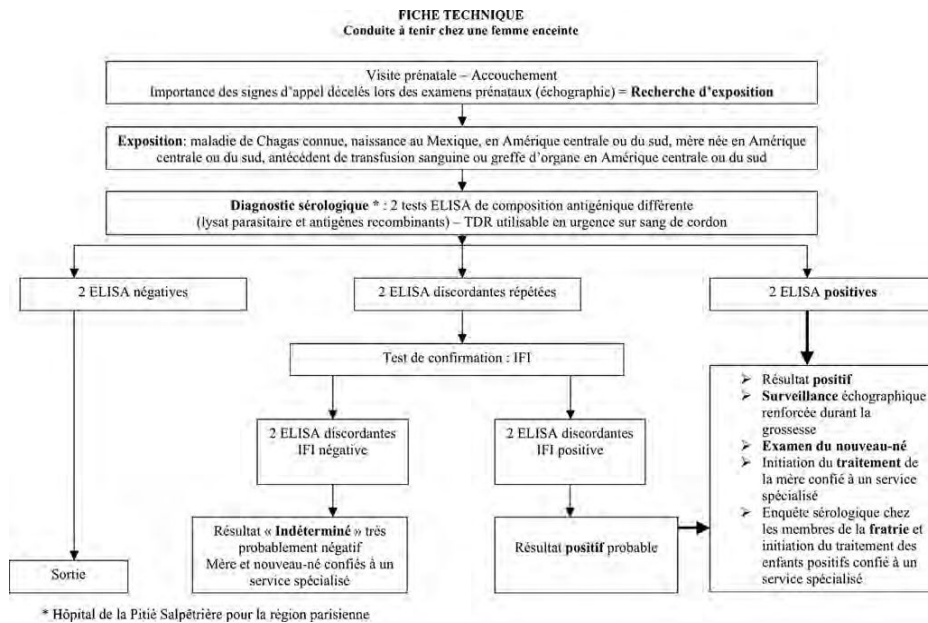


Figure n°13. Algorithme de dépistage de la maladie de Chagas chez la femme enceinte.
Source : Brutus *et al.*, 2009.

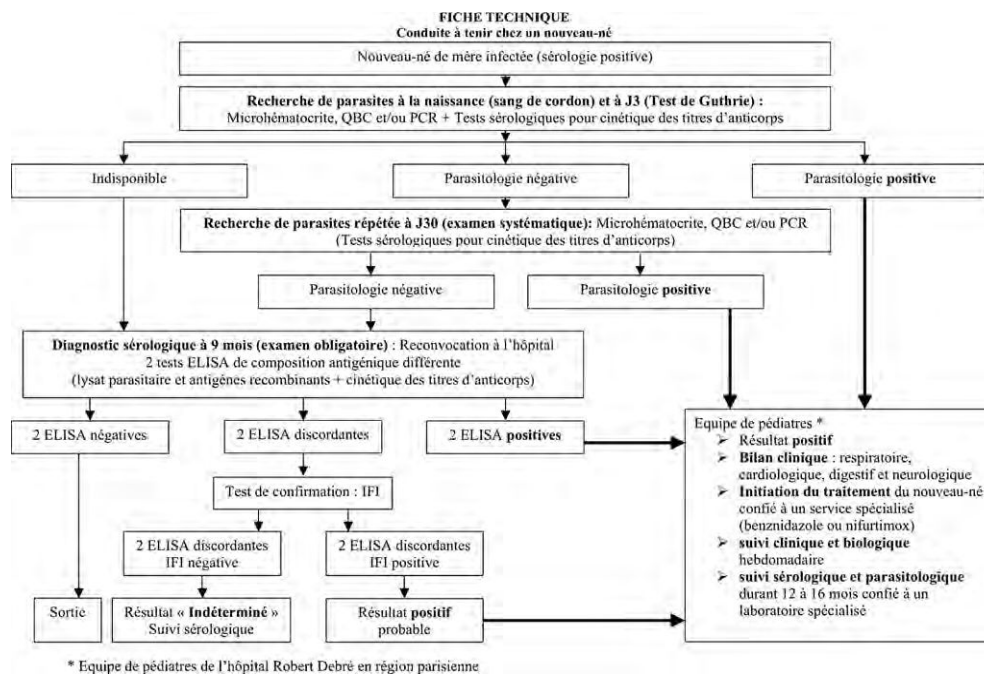


Figure n°14. Algorithme de diagnostic de la maladie de Chagas congénitale chez le nouveau-né.
Source : Brutus *et al.*, 2009.

II-3-2-La toxoplasmose congénitale

Toutes les techniques listées précédemment apportent chacune des informations qui, associées les unes aux autres, permettent aux biologistes de poser un diagnostic, notamment devant des cas douteux. Leurs limites doivent être également prises en compte pour

permettre une meilleure interprétation des cas difficiles. Enfin, les biologistes doivent connaître les cinétiques et les spécificités des différentes Ig ainsi que garder à l'esprit les variabilités dans la réponse immune qui sont liées à l'hôte, au parasite (souche, inoculum, stade infectant) et à la nature des Ag utilisés pour la détection des Ig.

Ainsi, soumis ou non à une législation sur le suivi des femmes enceintes, les scientifiques combinent différentes techniques afin de poser un diagnostic biologique néonatal clair et proposent des logigrammes ou algorithmes décisionnels en ce sens. Aussi, l'histoire de la mère a également son rôle à jouer dans l'aide au diagnostic et à la prise en charge précoce pour le traitement ([Pomares et Montoya, 2016](#)).

Une équipe brésilienne propose une stratégie d'outils, associant des techniques sérologiques avec la recherche d'avidité des IgG par cytométrie en flux, qui permet de poser un diagnostic de TC 30 à 45 jours après la naissance ([de Castro Zacche-Tonini et al., 2017](#)).

En coordination avec la HAS, le groupe de travail du CNR Toxoplasmose a établi des logigrammes décisionnels aidant à la conduite à tenir pour la femme enceinte, suivant les différents états sérologiques dans lesquels elle peut être classée, ainsi que pour le nouveau-né ([Villard et al., 2010 et 2016a](#)). La figure n°15, synthétisée à partir de données bibliographiques, schématise les différents cas pouvant se présenter durant la grossesse, *in utero* et en post-natal, donnant ainsi une vision globale du processus ([Murat et al., 2013 ; Villard et al., 2010 et 2016a](#)). La figure n°16 permet de visualiser le panel d'examens à réaliser et la complexité du rendu du diagnostic chez le nouveau-né.

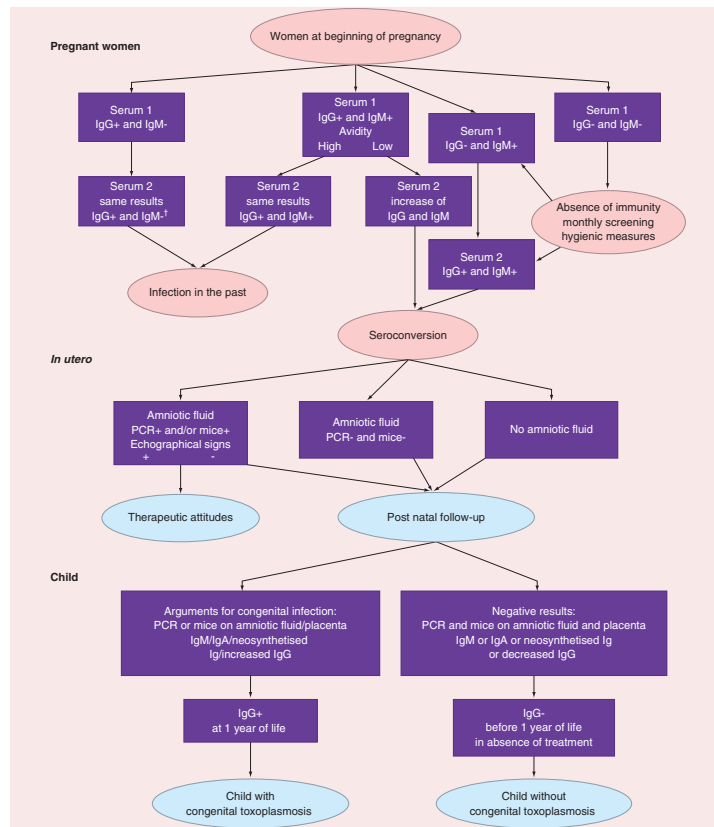


Figure n°15. Examens biologiques pratiqués sur la femme enceinte et l'enfant suspecté de toxoplasme congénitale.

D'après Murat et al., 2013.

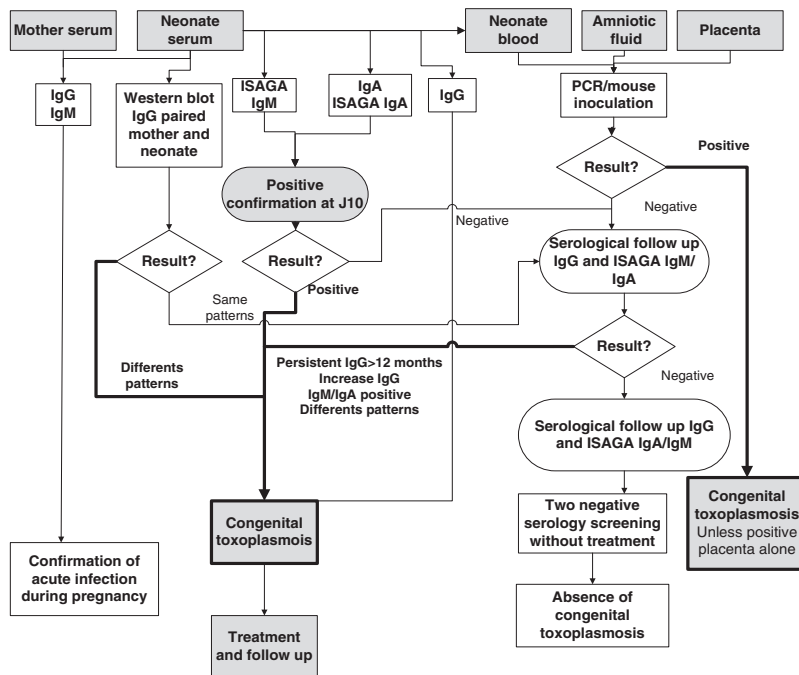


Figure n°16. Algorithme décisionnel pour le nouveau-né issu de mère infectée par *T. gondii* ou fortement suspectée d'infection durant la grossesse.

Source : Villard et al., 2016.

Tous ces logigrammes n'ont de valeur que s'il est possible de les appliquer. Or, cela n'est pas le cas dans beaucoup de pays. Il n'y a pas d'historique maternel, pas ou peu de suivi prénatal et à la naissance la présence des Ac de la mère masque la réalité immunitaire de l'enfant, comme le montre la figure n°17. Alors que la question est de savoir si à la naissance l'enfant a, oui ou non, été en contact avec le parasite, seuls ses propres Ac néosynthétisés et/ou l'étude de ses cellules productrices d'Ac, les LyB néonataux, pourraient aider à répondre à cette question en contournant les éléments biologiques maternels.

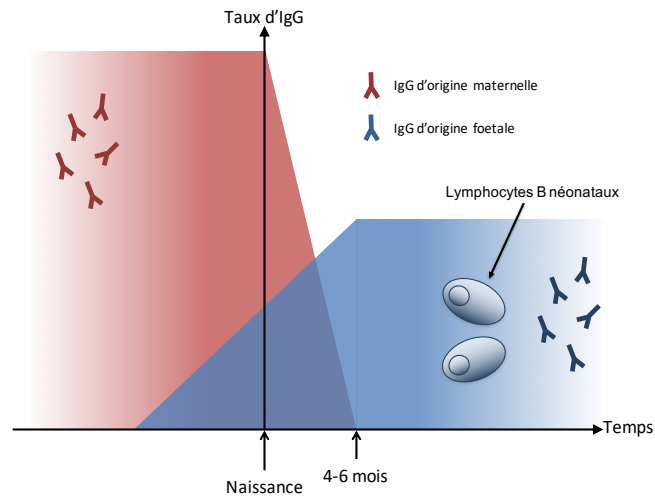


Figure n°17. Schématisation de la population des IgG chez le fœtus et le nouveau-né.
Production personnelle d'après Dechavanne, 2012.

II-4-POINTS A RETENIR

- Les politiques de santé publique diffèrent d'un pays à l'autre. Les prises en charge de la maladie de Chagas et de la toxoplasmose congénitales en sont impactées.
- Le diagnostic biologique est soumis à une multiplicité de techniques, toutes dotées d'avantages et de limites.
- Pour établir un diagnostic biologique fiable, il est nécessaire d'associer plusieurs techniques complémentaires suivant des stratégies différentes en lien avec les divers épisodes entourant la grossesse et la naissance.
- La commodité des tests sérologiques ne peut être appliquée au nouveau-né, car à la naissance la présence des Ig maternelles interfère avec celle des Ig néosynthétisées par l'enfant et masque la réponse immunitaire propre à l'enfant.
- Il s'ensuit la nécessité de développer de nouvelles approches pour simplifier le dispositif de diagnostic, notamment chez le nouveau-né.

III-Les anticorps néonataux, un outil de diagnostic ?¹

Ce dernier chapitre du « Contexte scientifique » est scindé en trois parties. Il commence par une évocation de la structure de l'Ig avec une attention plus soutenue sur la région constante de sa chaîne lourde. Ensuite, après avoir posé quelques notions sur le système immunitaire humoral adaptatif et décrit la maturation des LyB chez l'adulte, il aborde le développement du système immunitaire fœtal qui, bien que qualifié d'immature par rapport à celui de l'adulte pour de nombreuses raisons physiologiques, engendre le duo LyB/Ig néosynthétisées. Enfin, il se termine par la notion qu'il est envisageable d'exploiter certaines particularités structurales des Ig, pour caractériser et différencier ces dernières, avec des perspectives de diagnostic précoce lors d'infection parasitaire congénitale.

III-1-Les immunoglobulines ou anticorps

Les Ig ou Ac sont des molécules composées de deux parties, l'une qui se lie avec les Ag, plus particulièrement des motifs antigéniques qu'elle reconnaît, et l'autre qui intervient dans d'autres fonctions biologiques comme la fixation à des récepteurs membranaires. Les Ig sont synthétisées par les LyB sous formes membranaire ou soluble.

III-1-1-Structure protéique des immunoglobulines

L'Ig est composée de 4 chaînes polypeptidiques identiques deux à deux (figure n°18), 2 chaînes légères L (L), kappa (κ) ou lambda (λ), et 2 chaînes lourdes H (Heavy), reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est organisée en domaines. La chaîne L possède un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL) tandis que la chaîne H possède un domaine variable (VH) et 3 à 4 domaines constants (CH). La nature des domaines constants de la chaîne lourde détermine la classe de l'Ig. Il existe 5 classes d'Ig qui sont, par ordre alphabétique, les IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, certaines d'entre elles étant subdivisées en sous-classes : IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

On distingue deux éléments fonctionnels dans l'Ig. Un élément qui reconnaît l'Ag appelé fragment Fab, *fragment antigen binding*, constitué de toute la chaîne L et d'une fraction de la chaîne H, et un élément responsable de la majeure partie de l'activité biologique et des fonctions effectrices des Ac appelé fragment Fc, *Fragment crystallizable*, et constitué de

¹ Les articles de LeBien et Tedder (2008) et de Schroeder et Cavacini (2010) ont contribué à la rédaction générale de ce chapitre.

l'autre fraction de la chaîne H. Les sites de liaison à l'Ag se trouvent dans les régions variables des deux chaînes au niveau de trois zones hypervariables ou régions déterminant la complémentarité appelées CDR, *Complementarity Determining Region* (CDR1, CDR2 et CDR3). Entre les deux parties, Fab et Fc, se trouve la région charnière H (*Hinge*) qui rend flexible la zone de reconnaissance à l'Ag. Enfin, c'est au niveau de l'extrémité COOH terminal de la chaîne H que se trouve la zone d'ancrage à la membrane du LyB dans le cas d'une Ig membranaire et qui est inexistante dans le cas de la sécrétion de la molécule. L'assemblage des chaînes donne une forme en « Y » à la molécule d'Ig. Les IgA et les IgM sécrétées s'associent entre elles pour former respectivement un dimère et un pentamère.

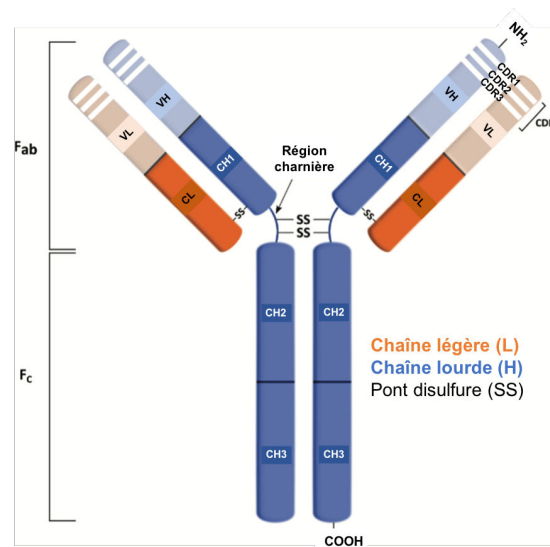


Figure n°18. Représentation schématique d'une Ig soluble.
D'après l'illustration de Loureiro *et al.*, 2015.

III-1-2-Structure moléculaire des immunoglobulines

Les gènes des chaînes légères κ , λ et des chaînes lourdes se situent sur les chromosomes 2 (2p11.2), 22 (22q11.2) et 14 (14q32.33) respectivement. Les gènes codant les parties variables sont répartis en familles de gènes dits de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Les chaînes légères possèdent les familles V et J tandis que la chaîne lourde possède les trois familles. Concernant les parties constantes des chaînes L, un seul segment code la partie constante de la chaîne L κ et 7 segments sont présents sur la L λ , 3 d'entre eux seulement étant fonctionnels (figure n°19).

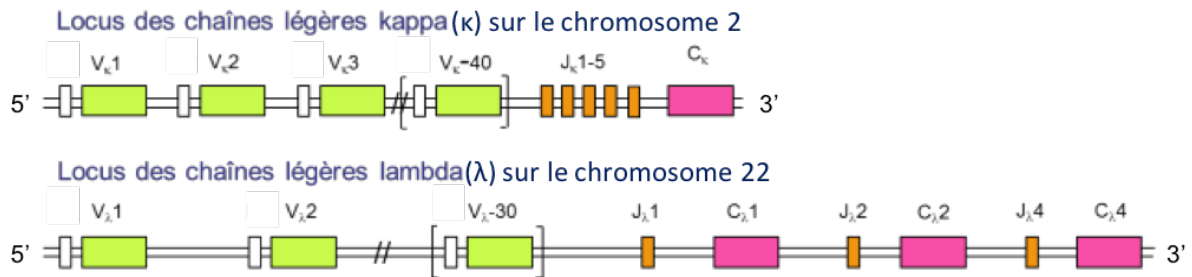


Figure n°19. Schéma simplifié de l'organisation des gènes des chaînes légères.
D'après *Batteux et al., 2013*.

Pour la chaîne H, parmi les 11 segments constituant la partie constante, 9 segments, μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$, ϵ et $\alpha 2$, suivant le positionnement 5'→3', codent pour les différentes classes des Ig (IgM, IgD, IgG3, IgG1, IgA1, IgG2, IgG4, IgE et IgA2 respectivement). La figure n°20 montre l'organisation moléculaire de la chaîne lourde et de la région constante du gène IGHG3 codant la chaîne peptidique correspondante.

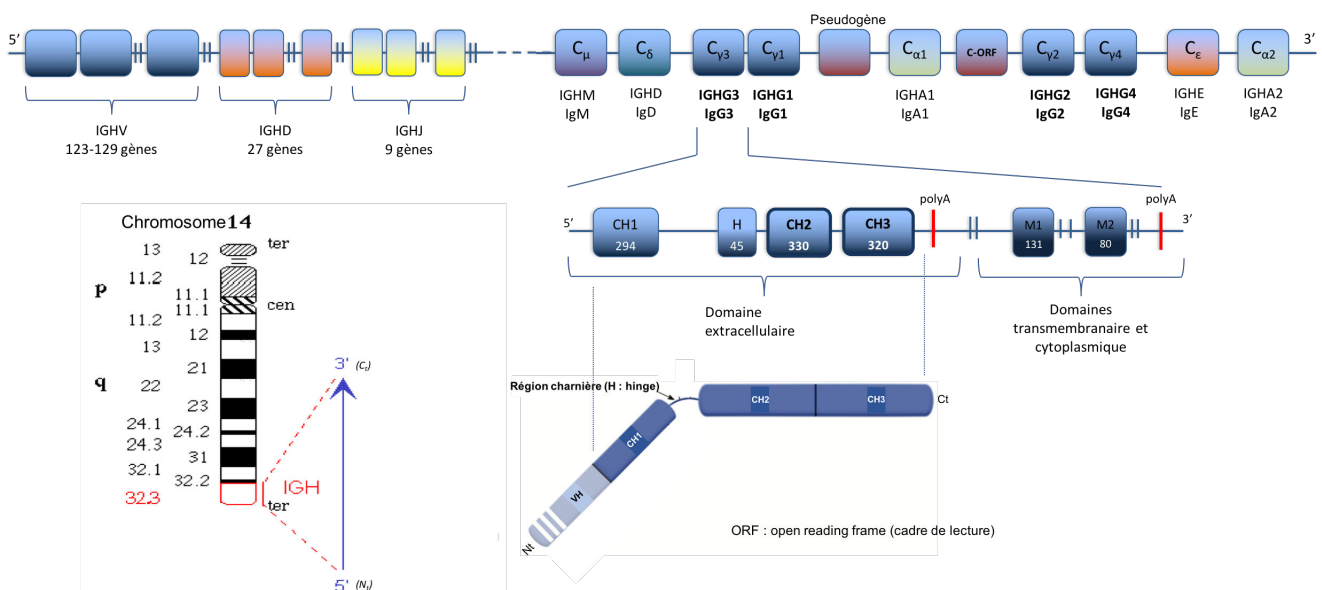


Figure n°20. Schéma simplifié de l'organisation de la chaîne H sur le chromosome 14.

En bas à gauche : locus IGH sur le chromosome 14. En haut : organisation de la chaîne lourde. A droite : région constante du gène IGHG3 (chiffres blancs : le nombre d'acides nucléiques codant chaque gène) qui code la chaîne peptidique correspondante.

Composition et montage personnels d'après le [site IMGT](http://www.imgt.org) et *Loureiro et al., 2015*.

Les gènes, V(D)J et C, se combinent les uns aux autres par des mécanismes de réarrangements, d'abord au niveau des gènes constituant la partie variable (V(D)J) puis entre le segment réarrangé et un segment de la partie constante, au cours du développement du LyB. Les réarrangements de la partie variable portent le nom de recombinaisons somatiques. Elles se font grâce à des séquences signal de recombinaison appelées RSS (*Recombination Signal*

Sequence). Elles sont situées en 3' pour les segments V, de part et d'autre pour les segments D et en 5' pour les segments J (figure n°21 en bas à droite). Elles contiennent toutes un heptamère et un nonamère conservés séparés par un espaceur de 12 ou 23 paires de bases (pb). Ces séquences signal sont reconnues par un complexe enzymatique spécifique, appelé recombinaison V(D)J, qui va former des boucles suivant la règle « 12/23 » et générer des séquences réarrangées (figure n°21 en haut à droite). Ainsi, il y a deux recombinaisons somatiques pour la chaîne H. La première commence avec le rapprochement d'un des gènes de la région D avec un des gènes de la région J puis suit le rapprochement du segment réarrangé D-J avec un des gènes de la région V. Cela engendre une diversité des régions variables, environ 10^6 combinaisons possibles, qui contribue à la reconnaissance des différents motifs antigéniques. Les réarrangements V-D-J qui se combinent avec les gènes IGHM sont illustrés dans la figure n°21 à gauche dans deux LyB distincts.

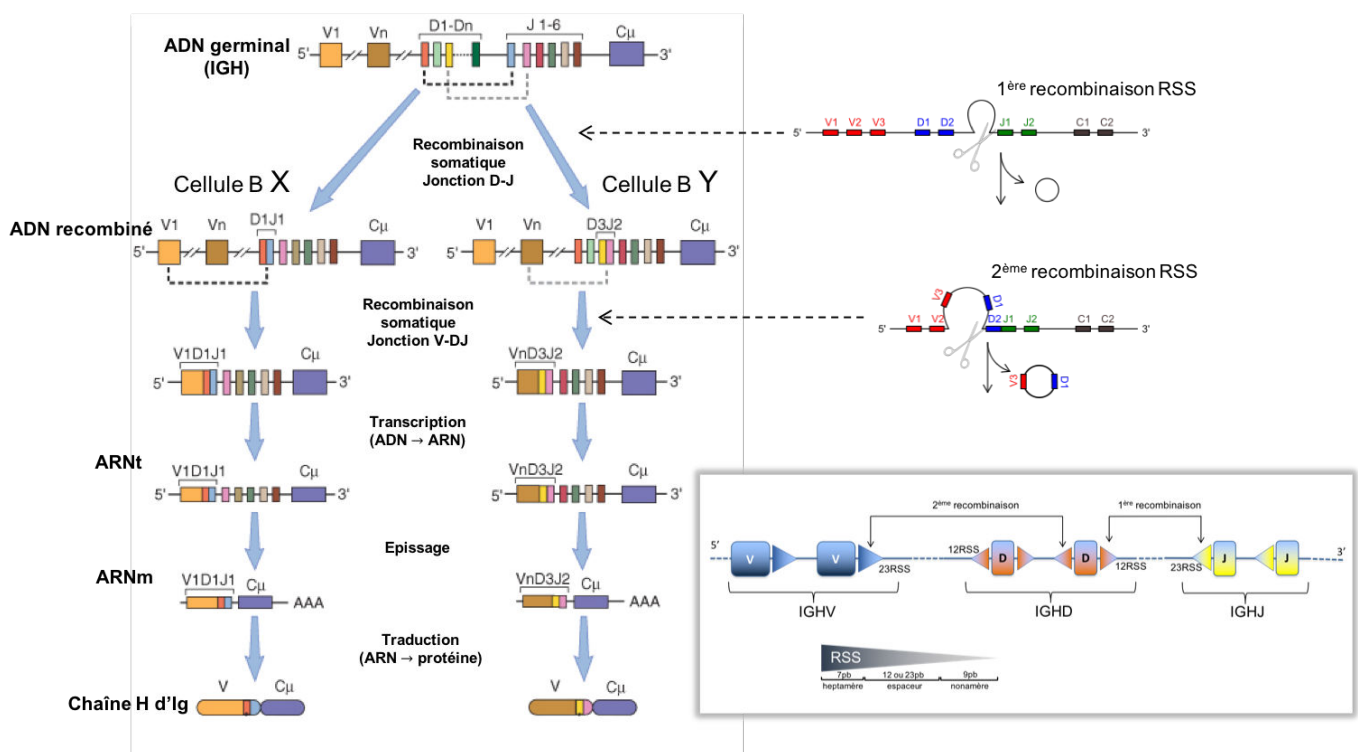


Figure n°21. Représentations schématisées des RSS et des recombinaisons VDJ de la chaîne lourde IGH.

A gauche : d'après Abbas et Lichtman, Elsevier Masson, 2013. A droite : Composition et montage personnels d'après Lefranc et Lefranc, 2002 ; [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:V\(D\)J_recombination-diagram.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:V(D)J_recombination-diagram.svg) (consulté en septembre 2018) et les illustrations de Roth, 2003 et de Ru et al., 2015.

A cette diversité combinatoire s'ajoute une diversité de jonction entre les segments V, D et J qui est modulée par le mécanisme de réparation de l'ADN et par diverses enzymes (exonucléases, TdT pour *terminal désoxyribonucléotidyl transférase*) qui entraînent

différentes insertions ou délétions nucléotidiques. Cette zone définit le CDR3, est de longueur variable et est la plus spécifique de l'Ag (figure n°18).

Enfin, durant la sollicitation des LyB par les Ag, phénomène décrit plus loin dans le chapitre, la synthèse des chaînes μ se fait en première intention et ainsi les premières Ig produites sont des IgM. Pour que le LyB puisse synthétiser une autre classe d'Ig en gardant la même spécificité antigénique, il a recours à la commutation isotypique ou de classe qui consiste à un nouveau réarrangement entre la partie variable déjà réarrangée et un des 7 segments C, en dehors de C_μ et C_δ . Cette recombinaison se réalise grâce à des séquences signal conservées spécifiques appelées régions de commutation ou régions « switch » (S) qui se trouvent en amont de chaque segment C sauf C_δ qui en est dépourvu. La figure n°22 où cette commutation de classe est représentée montre l'intervention de l'enzyme AID (*activation-induced deaminase*) induite par la coopération cellulaire entre le LyB et le LyT.

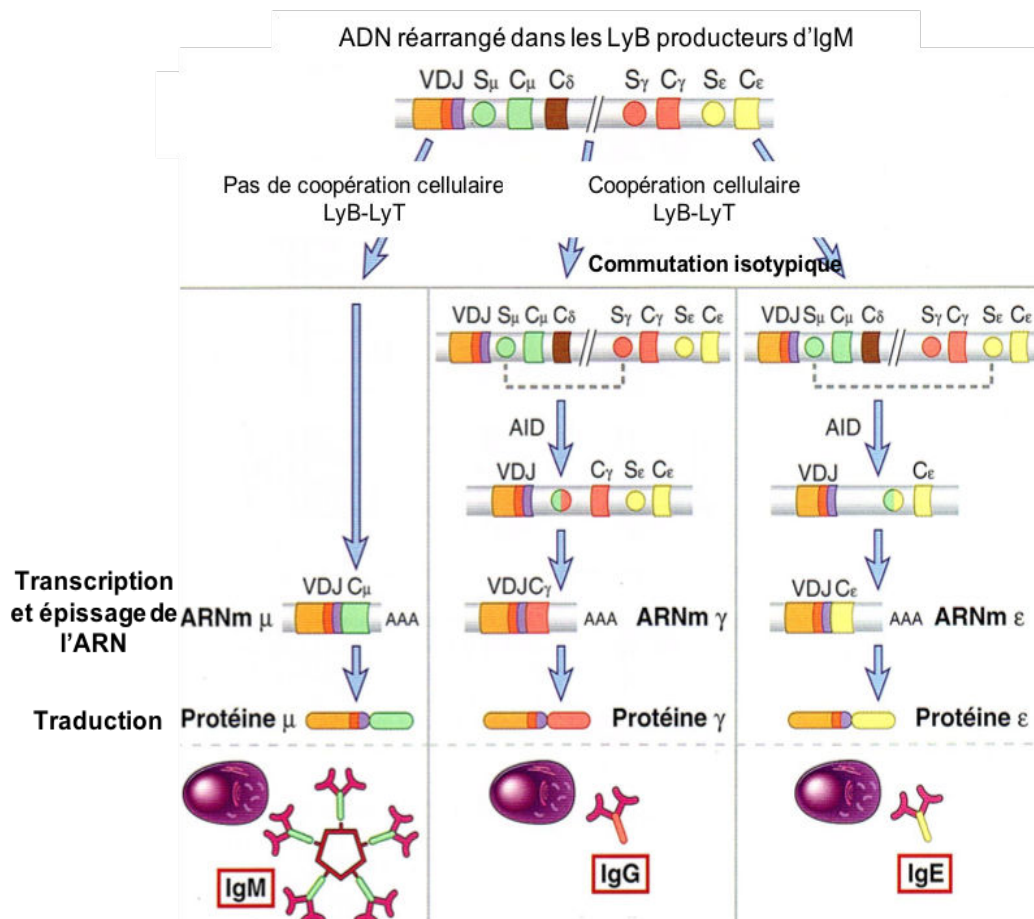


Figure n°22. Représentation schématique de la commutation de classe.
D'après Abbas et Lichtman, Elsevier Masson, 2013.

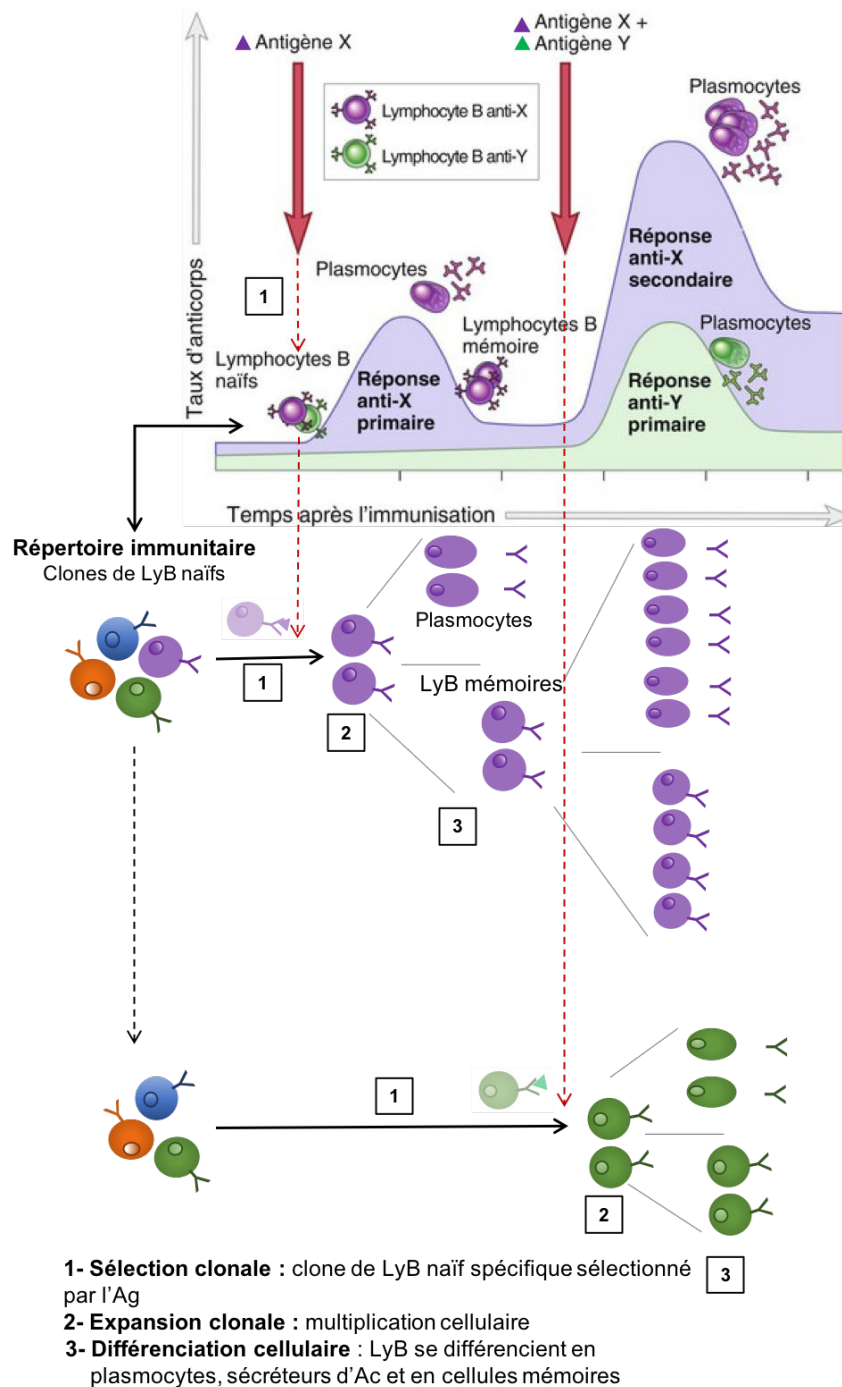
Le processus décrit ci-dessus concerne uniquement la synthèse de la chaîne lourde. Le même type de mécanisme a lieu pour la chaîne légère, et l'ensemble de ces synthèses qui permettent de générer une Ig unique se déroule au cours du développement de la cellule B (développé ci-après). Ainsi la synthèse moléculaire et le développement cellulaire qui sont intimement liés sont soumis à des étapes de contrôle permettant de garder ou non les cellules B et l'Ig. Un mécanisme d'autocontrôle appelé processus d'exclusion allélique permet à la cellule B d'interrompre la synthèse des chaînes sur le 2^{ème} chromosome permettant ainsi à chaque cellule de bénéficier d'une spécificité unique. Sinon, le processus de mort cellulaire programmée, ou apoptose, s'opère sur la cellule B dont les réarrangements n'ont pas été productifs ou lorsque la cellule est trop réactive notamment contre les molécules du Soi.

III-2-Le système immunitaire adaptatif humoral

III-2-1-Rappel de quelques notions

Composé d'un bel ensemble riche et impressionnant de cellules, de tissus et de molécules qui coopèrent les uns avec les autres, le système immunitaire nous protège des agressions extérieures, notamment des maladies infectieuses. Ses mécanismes de défense se caractérisent par l'immunité naturelle et l'immunité adaptative.

L'immunité naturelle est une réponse rapide, en quelques heures, qui assure la défense initiale en empêchant une infection ou en éliminant le corps étranger, tandis que l'immunité adaptative met quelques jours à se développer, répond plus spécifiquement et efficacement à l'agression et est assurée par les Ly et leurs produits qui bloquent et éliminent l'intrus. L'immunité adaptative est composée de l'immunité cellulaire, représentée par les LyT, auxiliaires et cytotoxiques, qui luttent contre les microbes intracellulaires, et de l'immunité humorale, représentée par les LyB qui luttent contre les microbes extracellulaires. Elle répond de manière plus forte et plus efficace lors d'une exposition répétée à un Ag étranger grâce à trois particularités qui sont la sélection, l'expansion et la mémoire cellulaire clonale, un clone étant une cellule et sa descendance.



- 1- **Sélection clonale** : clone de LyB naïf spécifique sélectionné par l'Ag
- 2- **Expansion clonale** : multiplication cellulaire
- 3- **Différenciation cellulaire** : LyB se différencient en plasmocytes, sécréteurs d'Ac et en cellules mémoires

Figure n°23. Réponse primaire et secondaire de l'immunité adaptative humorale. Composition et montage personnels d'après Abbas et Lichtman, Elsevier Masson, 2013 et <http://monde.cdmd.qc.ca/ressource/?id=55913&demande=desc> ; <https://www.svt-lycee-elorn.ovh/immunologie.php> (consultés en août 2018).

Ainsi comme le montre schématiquement la figure n°23, dans le cas de l'immunité adaptative humorale, la réponse immunitaire primaire est assurée par les LyB dits naïfs, qui expriment l'Ig sous forme membranaire jouant le rôle de récepteur à l'Ag, lors de la première rencontre avec l'Ag. Ce contact conduit à la sélection d'un clone de LyB porteur à sa surface des Ig spécifiques à cet Ag parmi le répertoire de LyB. L'expansion de ce clone, c'est à dire la

multiplication cellulaire distincte du clone sélectionné par rapport aux autres clones, est suivie d'une différenciation cellulaire créant un pool de LyB sécréteurs d'Ig spécifiques, les plasmocytes, et un pool de LyB mémoires, cellules à longue durée de vie porteuses de l'Ig membranaire spécifique. C'est grâce à cette mémoire cellulaire que lors de rencontres ultérieures avec le même Ag, les réponses immunitaires secondaires sont plus rapides, importantes et efficaces. Pour que cela puisse se réaliser, les LyB suivent un développement particulier décrit ci-après.

III-2-2-Le développement et la différenciation des lymphocytes B

III-2-2-1-Chez l'adulte

Le processus de différenciation cellulaire se déroule en deux étapes, la première commence dans la moelle osseuse à partir des précurseurs hématopoïétiques et en l'absence d'Ag et la deuxième prend la suite dans les organes lymphoïdes périphériques secondaires en présence de l'Ag.

Dans la moelle osseuse

Les cellules souches se différencient en cellules pro-B (progéniteur-B). Elles-mêmes se divisent et se différencient en cellules pré-B (précurseur-B). Ces dernières deviennent des LyB immatures exprimant une IgM de surface membranaire spécifique d'un Ag. La différenciation se poursuit et la co-expression membranaire de l'IgM avec une IgD portant la même spécificité antigénique amène les LyB immatures à devenir des LyB matures ou naïfs. Ces derniers migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour subir les dernières étapes de maturation. Toutes ces étapes sont sous l'égide de la coopération cellulaire qui, par contact cellulaire, ou par production de molécules, active, stimule ou contrôle les précurseurs des LyB.

C'est également dans la moelle osseuse que débute la formation de l'Ig dans les précurseurs des LyB. Les chaînes lourdes sont constituées en premier au niveau des cellules pro-B et pré-B. Les réarrangements génétiques de la partie variable de la chaîne lourde se produisent, puis la partie réarrangée est associée à la même partie constante pour former l'IgM membranaire. La chaîne légère est ensuite fabriquée et c'est son association avec la chaîne lourde produite qui fait passer la cellule pré-B en LyB immature. Ainsi, plusieurs clones de LyB immature

spécifique d'un Ag distinct, porteur d'un récepteur IgM membranaire unique sont fabriqués et différents les uns des autres.

Dans les organes lymphoïdes secondaires

Les LyB naïfs immunocompétents migrent de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires, la rate, les ganglions lymphatiques principalement et les tissus cutanéomuqueux, via les vaisseaux lymphatiques et sanguins. La poursuite de la maturation des LyB requiert la présence d'un Ag (figure n°24), dans le cas contraire, les cellules B meurent par apoptose. Même si la finalité de la maturation des LyB est la même, c'est à dire la différenciation en plasmocytes et en LyB mémoires, le chemin pour y arriver est conditionné par la nature de l'Ag. Dans la plupart des cas, il s'agit d'Ag peptidiques thymo-dépendants qui nécessitent la coopération cellulaire avec les LyT auxiliaires ; sinon il s'agit d'Ag thymo-indépendants qui sont reconnus directement par les LyB sans la coopération avec les LyT et qui sont des Ag polymériques comme les polysaccharides, les glycolipides et les acides nucléiques. La différence entre les Ig issues de ces deux voies réside dans une diversité plus restreinte et une maturation d'affinité antigénique plus faible dans le second cas, comme le montre la figure n°24.

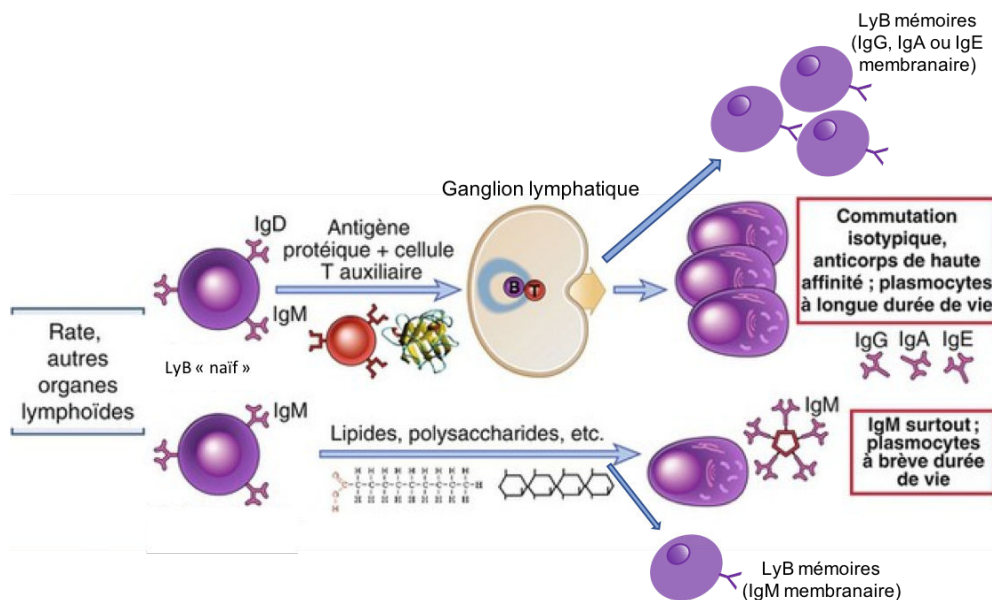


Figure n°24. Devenir des LyB naïfs dans les organes secondaires et suivant la nature de l'Ag. Illustration complétée d'après [Abbas et Lichtman, Elsevier Masson, 2013](#).

C'est durant la différenciation en cellules B mémoires que certaines d'entre elles vont subir une commutation de classe des Ig, détaillée plus loin mais schématisée sur les figures n°22 et 24. Cette commutation de classe ou isotypique correspond à un réarrangement de la partie

constante de la chaîne lourde, changeant ainsi la nature de l'Ig qui sera exprimée à la surface cellulaire mais pas la spécificité à l'Ag. D'autres changements nucléotidiques, les mutations somatiques décrites aussi plus loin, ont également lieu au niveau de la partie variable de l'Ig permettant d'augmenter l'affinité de l'Ig avec cet Ag lors d'une reconnaissance future.

Comme dans la moelle osseuse, toutes ces étapes nécessitent une coopération cellulaire qui n'est pas détaillée. Cependant, il faut noter l'utilité de certains éléments comme le système du complément qui interagit avec un ensemble appelé complexe du récepteur des LyB, BCR (*B cell receptor*), formé par l'Ig membranaire et des protéines de signalisation, et qui contribue aux mécanismes d'activation du LyB dans les organes secondaires, ainsi que la liaison entre le LyB et le LyT formée par le CD40 et le CD40L respectivement et qui est impliquée dans le processus de commutation isotypique.

III-2-2-Durant la vie intra-utérine

Comme le montre la figure n°25, les organes immunitaires ou hématopoïétiques se mettent en place progressivement durant le développement fœtal. Le sac vitellin qui contient les cellules souches est fonctionnel à partir de la 4^{ème} semaine ([site cri-net](#) ; [Holt et Jones, 2000](#) ; [Durandy, 2001](#)). Le relais est pris par les principaux organes lymphoïdes du fœtus, le foie fœtal, à partir de la 6^{ème} semaine, puis par la moelle osseuse à partir de la 28^{ème} semaine, soit durant le 3^{ème} trimestre ([Durandy, 2001](#)).

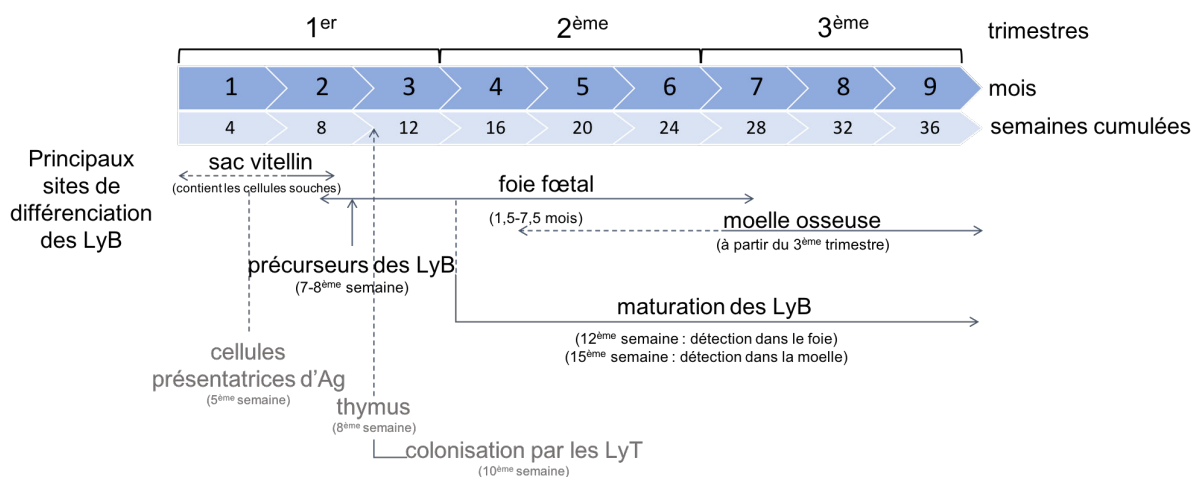


Figure n°25. Schéma des principaux sites de développement des LyB durant la vie intra-utérine. Composition personnelle d'après [Durandy, 2001](#) ; [Lefranc et Lefranc, 2002](#) ; [Denis, Médecine Science Sélection, 2002](#) et [Remington, Elsevier, 2016](#).

Les précurseurs des LyB sont détectables dans le foie fœtal entre la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine ([Holt et Jones, 2000](#)) et dans la moelle osseuse à la 13^{ème} semaine ([Remington, Elsevier, 2016](#)).

La maturation des LyB débute aux alentours de la 12^{ème} semaine dans le foie fœtal ([site cri-net](#) ; [Durandy, 2001](#)) puis se poursuit dans la moelle osseuse. Les LyB naïfs, porteurs des IgM et IgD membranaires, sont détectables entre la 10^{ème} et la 12^{ème} semaine dans la circulation fœtale ([Holt et Jones, 2000](#) ; [Durandy, 2001](#)), ils sont retrouvés dans les ganglions lymphatiques entre la 16^{ème} et la 17^{ème} semaine et dans la rate entre la 16^{ème} et la 21^{ème} semaine ([Holt et Jones, 2000](#)). A la 22^{ème} semaine, la proportion de cellules B dans les tissus fœtaux (le sang, le foie et la moelle) est la même que chez l'adulte. En parallèle, malgré qu'il soit incomplet à la naissance, le répertoire immun se constitue ([Remington, Elsevier, 2016](#)).

Les moyens de défense cellulaire jouant un rôle dans la coopération cellulaire sont retrouvés chez le fœtus entre la 8^{ème} et la 12^{ème} semaine. Le système du complément commence à être mis en évidence entre la 6^{ème} et la 14^{ème} semaine. Les cellules présentatrices d'Ag, localisées dans le sac vitellin puis dans le foie après différenciation, sont présentes dans les organes lymphoïdes secondaires à la 8^{ème} semaine. Elles sont fonctionnelles dès la 12^{ème} semaine où les LyT matures sont également détectables dans les organes lymphoïdes et le sang fœtal ([Durandy, 2001](#)). Ainsi, la réponse immune spécifique semble possible dès la fin du 1^{er} trimestre de développement, soit la 12^{ème} semaine, et assurément opérationnelle à partir de la 16^{ème} semaine ([Durandy, 2001](#)). Cependant, il est difficile d'évaluer le taux d'Ig spécifiques en l'absence de stimulation antigénique, néanmoins, si une infection a lieu, les IgM sont détectables dès la 12^{ème} semaine et les IgG et IgA entre la 15^{ème} et la 20^{ème} semaine ([Desmonts et al., 1985](#) ; [Durandy, 2001](#)).

III-3- Particularités de l'immunité néonatale

Comme nous venons de le voir, le fœtus est potentiellement capable d'élaborer sa défense personnelle, via une production d'Ig, qui est compatible avec une efficacité qui lui est propre, comme illustré ci-après. Nous aborderons ensuite une autre caractéristique du fœtus qui est son bénéfice d'être protégé par les IgG solubles de sa mère, transférées à travers le placenta par un mécanisme actif. Ainsi, sont simultanément présentes dans la circulation sanguine du nouveau-né des Ig d'origine maternelle et fœtale, ce qui peut rendre possible de tirer profit des caractéristiques propres à chacune d'elles.

III-3-1-Une défense précoce

Le degré de maturation du système immunitaire du fœtus est faible, en raison de l'environnement relativement confiné dans lequel il se développe. Le déficit de production de médiateurs chimiques et d'interaction CD40-CD40L, impacte la commutation isotypique. Cette dernière est favorisée au cours des premières années de vie suite à diverses stimulations antigéniques et de coopération cellulaire (Durandy, 2001). Ce relatif degré de maturation est lié à l'exposition limitée aux Ag durant la vie intra-utérine, rendant le nombre de cellules mémoires effectrices peu nombreuses (Dowling et Levy, 2014). Ainsi, les avancées scientifiques sur les réponses immunitaires fœtales de la souris permettent l'utilisation du terme de « plasticité de la fonction immunitaire fœtale ». Effectivement, il a été observé une modulation de la qualité de la réponse immunitaire suivant les conditions expérimentales donnant lieu soit à une immuno-déficience, soit à une immuno-modulation ou encore à une réponse mature, certains de ces aspects étant également observables chez le fœtus humain (Adkins et al., 2004).

Ainsi, bien que les mécanismes restent mal connus, une réponse du nouveau-né est observée dans des situations d'infections ou de vaccinations durant la grossesse. Il a été montré que durant certaines infections maternelles, parasitaires ou virales, avec ou sans transmission *in utero*, le système immunitaire fœtal semble être affecté donnant soit une faible réponse spécifique ou alors une susceptibilité aux infections postnatales vis-à-vis de pathogènes homologues (Dauby et al., 2012). En Afrique, dans certaines zones d'endémie palustre et/ou helminthique, la mise en évidence d'une réponse spécifique par les nouveau-nés, issus de mères infectées ou non, a été faite (Fievet et al., 1996 ; King et al., 1998 et 2002). Une autre étude sur la maladie de Chagas congénitale illustre également une réponse spécifique du nouveau-né (Hermann et al., 2002). Également, durant la vaccination de femmes enceintes contre le virus de la grippe, une équipe a montré une réponse spécifique du nouveau-né qui s'est construite en amont de la naissance (Rastogi et al., 2007).

Ainsi l'ontogénèse peut varier entre des populations géographiquement différentes, en raison des facteurs environnementaux, du statut immunitaire de la mère et de l'exposition *in utero* (King et al., 1998 ; Dowling et Levy, 2014).

III-3-2-Le passage placentaire des immunoglobulines G ou la protection maternelle

Durant la grossesse, une protection immunitaire du fœtus se fait grâce au passage placentaire des IgG du répertoire maternel à partir de la 17^{ème} semaine (Simister, 2003 ; Elefant, 2012). Les IgG se fixent sur un récepteur particulier spécifique appelé FcRn, *neonatal Fc receptor*, passent à travers le syncytiotrophoblaste grâce à un transport actif par pinocytose et se retrouvent dans la circulation fœtale (Roopenian et Akilesh, 2007 ; Elefant, 2012). Ce transporteur est saturable, ainsi lors d'une stimulation immunologique maternelle importante, les IgG maternelles ont un transfert moins efficace (Elefant, 2012 ; Dechavanne *et al.*, 2015). Sinon à la naissance, en règle générale, le taux d'IgG du nouveau-né est corrélé à celui de sa mère (Simister, 2003 ; Elefant, 2012 ; Dechavanne *et al.*, 2015). Récemment, une étude soulève la question du rôle joué par d'autres récepteurs membranaires dans le transport des IgG au travers des autres compartiments cellulaires placentaires (cytotrophoblaste - fibroblaste - endothélium cellulaire fœtal) avant d'atteindre la circulation fœtale (Martinez *et al.*, 2018).

Le passage des IgG maternelles progresse de façon croissante en cours de grossesse, conférant ainsi une protection du fœtus de plus en plus efficace au fur et à mesure de son développement, puisque cette compensation n'est pas observée chez les grands prématurés (Durandy, 2001), avec une variabilité de proportion dans les 4 sous-classes des IgG (Elefant, 2012). Cela a été montré dans différentes études, l'une d'elles portant sur des femmes enceintes avec un risque de maladie hémolytique pour le fœtus et une autre sur les transports membranaires placentaires. Dans les deux cas, a été faite l'observation d'un plus important passage de l'organe chimérique par les IgG1 suivies des IgG4 puis des IgG3 et enfin des IgG2 (Garty *et al.*, 1994 ; Malek, 2003), ces résultats pouvant varier suivant la population étudiée (Elefant, 2012). D'autres études menées sur les différentes sous-classes des Ig de couples mère/enfant(s), dans le cadre de la toxoplasmose congénitale, ont montré chez l'enfant une réponse spécifique augmentée de certaines d'entre elles vis à vis de certains épitopes parasitaires. Elles mentionnent également des taux plus importants des sous-classes IgG2, IgG3 et IgG4 spécifiques chez les enfants infectés *versus* non infectés, tous issus de mères infectées, et des taux d'IgG3 et d'IgG4 spécifiques plus importants chez ceux manifestant des signes cliniques graves. Elles suggèrent ainsi la possibilité d'utiliser ces variations de taux de sous-classes d'Ig comme indicateur d'une infection parasitaire durant la grossesse (Buffolano *et al.*, 2005 ; Cañedo-Solares *et al.*, 2008).

III-3-3-Utilisation du polymorphisme de la chaîne lourde IGH

Au vu de ce qui a été décrit plus haut, suite à une infection congénitale, le sang circulant du nouveau-né contient les IgG solubles maternelles et celles néosynthétisées. La distinction entre les deux provenances (mère, fœtus) peut être faite grâce au polymorphisme peptidique porté par les domaines constants de leur chaînes lourdes.

Grâce à des réactions d'inhibition d'hémagglutination où il a été montré que certains sérums humains agglutinaient des érythrocytes sensibilisés avec un Ac anti-rhésus incomplet¹, ces polymorphismes ont en premier lieu été décrits et définis sérologiquement, et sont appelés allotypes des Ig. Cette réponse immune anti-allotype unique a permis de définir des variants allotypiques. Ces allotypes qui caractérisent les polymorphismes de la chaîne lourde à l'intérieur d'un isotype sont considérés comme des marqueurs et portent le nom de Gamma marqueurs (Gm) comme le montre le tableau n°2. Ces derniers sont hérités sous forme de combinaisons fixes : les haplotypes Gm. Le même phénomène, avec une diversité moindre, est également décrit pour la chaîne légère kappa (Km) et la chaîne lourde alpha (Am) mais n'est pas abordé ici (Jefferis et Lefranc, 2009 ; Lefranc et Lefranc, 2012).

Chaîne	Allotype	Nombre d'allotype(s)
γ 1	G1m1, G1m2, G1m3, G1m17 <i>G1m27 et G1m28*</i>	4 (6)
γ 2	G2m23, G2m..**	1
γ 3	G3m5, G3m6, G3m10, G3m11, G3m13, G3m14, G3m15, G3m16, G3m21, G3m24, G3m26 <i>G3m27 et G3m28*</i>	11 (13)

Tableau n°2. Liste des allotypes Gm répertoriés.

* : Ces allotypes sont retrouvés sur la chaîne γ 1 ou γ 3 suivant les groupes de populations humaines.

** : les allèles G2m sont caractérisés par la présence ou l'absence de l'allotype G2m23.

D'après Lefranc et Lefranc, 2012.

Comme le montre le tableau n°2, la chaîne γ 3 est la plus polymorphe avec 11 (13) allotypes G3m possibles. Six haplotypes G3m sont communément rencontrés dans les populations humaines (tableau n°3) et chaque individu hérite d'un haplotype Gm de chacun de ses parents. Ces haplotypes sont différemment distribués en fonction des populations (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011 ; Lefranc et Lefranc, 2012), de ce fait ils sont utilisés dans des études populationnelles (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011).

¹ Un Ac incomplet est un Ac qui est lié à une surface, érythrocyte ou bactérie, mais qui ne produit pas d'agglutination.

Haplotypes G3m	Appellation contractée
G3m5,10,11,13,14,26,27	G3m5*
G3m5,6,10,11,14,26,27	G3m6*
G3m5,6,11,24,26	G3m24*
G3m10,11,13,15,27	G3m15*
G3m10,11,13,15,16,27	G3m16*
G3m21,26,27,28	G3m21*

Tableau n°3. Liste des haplotypes G3m.
D'après [Lefranc et Lefranc, 2012](#).

Une attention leur est accordée dans le cadre médical où la compatibilité haplotypique Gm est nécessaire lors de l'utilisation d'Ac monoclonaux ([Jefferis et Lefranc, 2009](#)). Leur intérêt est également mis en avant dans des contextes infectieux où ce polymorphisme pourrait avoir un lien avec l'efficacité de la réponse immunitaire. Une étude menée sur des enfants habitant dans une zone de transmission saisonnière du paludisme a éclairé un lien entre haplotypes Gm (et Km), âge des enfants et présentation clinique du paludisme ([Migot-Nabias et al., 2008 et 2011](#)). Une autre étude, effectuée dans le cadre du paludisme gestationnel et prenant en compte l'infection au VIH, a montré une susceptibilité différente des femmes vis-à-vis du paludisme selon leurs caractéristiques individuelles G3m6 et Km ([Iriemenam et al., 2013](#)).

Au-delà des allotypes Gm, qui sont des marqueurs sérologiques de la diversité de la chaîne lourde des IgG, d'autres polymorphismes dits silencieux sur le plan sérologique peuvent co-exister ([Lefranc et Lefranc, 2012](#)). Ainsi, l'analyse de l'enchaînement en acides aminés des chaînes Gamma, porteuses des allotypes, a permis de définir des allèles peptidiques dans chaque sous-classe, la notion d'allèle étant entendue comme couvrant la portion d'acides aminés qui s'étendent du début du domaine CH1 jusqu'à la fin du CH3 de la chaîne lourde IGH. Chaque allèle peptidique est codé par un allèle nucléotidique, et le site IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® (www.imgt.org), répertorie et actualise ces informations, ce qui résulte dans une incrémentation de la numérotation des allèles au fur et à mesure de leur identification. A l'heure de la rédaction du manuscrit, le site IMGT® dénombre 5 allèles pour le gène IGHG1 (IGHG1*01 à IGHG1*05), 6 allèles pour le gène IGHG2 (IGHG2*01 à IGHG2*06), 19 allèles pour le gène IGHG3 (IGHG3*01 à IGHG3*19) et 4 allèles pour le gène IGHG4 (IGHG4*01 à IGHG4*04). Je dois préciser ici qu'il y a un allèle supplémentaire pour le gène IGHG1 par rapport au nombre d'allèles recensés lorsque les travaux présentés ci-après ont été réalisés.

III-4-POINTS A RETENIR

- Le système immunitaire adaptatif se met en place très tôt durant la vie intra-utérine.
- Bien que la réponse immunitaire fœtale soit différente de celle de l'adulte, le fœtus possède des LyB capables de synthétiser des Ig fonctionnelles.
- Les Ig ont une spécificité antigénique grâce à leur site de reconnaissance à l'Ag et une spécificité individuelle grâce aux polymorphismes portés par leur chaîne lourde.
- Les caractéristiques individuelles de la chaîne lourde des IgG peuvent être utilisées pour distinguer la réponse du nouveau-né de celle de la mère et être considérées pour la mise en place d'un outil de diagnostic biologique.

PARTIE 2 - PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Le contexte scientifique qui vient d'être exposé, montre que dans les pays où les infections parasitaires sont souvent non diagnostiquées chez les femmes enceintes, par méconnaissance des parasites ou parce que les soins prénataux sont rares, le diagnostic néonatal d'infection congénitale est crucial pour éviter une maladie aiguë et augmenter l'efficacité des traitements administrés précocement.

Or, les techniques de diagnostic actuellement disponibles ne permettent pas isolément de mettre en évidence une infection parasitaire congénitale de façon sûre. Il est donc nécessaire de réaliser une batterie de tests, la plupart sérologiques, afin de déterminer à la naissance si oui ou non le fœtus a été exposé à un parasite durant la grossesse. Cette marche de manœuvre est d'autant plus délicate que la fenêtre temporelle critique où ces tests auraient leur pertinence se trouve entre 0 et 6 mois de vie, période durant laquelle les Ig maternelles transmises pendant la grossesse et celles néo-synthétisées par les LyB du nouveau-né sont conjointement présentes, impactant ainsi les résultats sérologiques. Cependant, si l'on veut être précoce dans le diagnostic et le traitement, c'est dans cette fenêtre temporelle qu'il faut effectuer cette détection.

Ainsi, notre objectif de caractériser les LyB fœtaux et ses IgG spécifiques néo-synthétisées chez le nouveau-né, bons indicateurs de ce qui s'est passé durant la vie intra-utérine, en explorant de nouvelles approches par différentes technologies prend toute sa place dans cet espace-temps et aiderait au diagnostic précoce d'infection congénitale. C'est sur cette toile de fond que s'inscrit mon travail de thèse. Au sein de ce programme de recherche, il fait la jonction entre deux pistes de réflexions et se décline en trois parties :

-La poursuite de travaux sur la distinction entre les IgG sériques maternelles et fœtales, par une étape de confirmation d'une investigation protéomique déjà en cours lorsque j'ai débuté ma thèse.

-L'initiation de travaux permettant la détection des LyB néonataux par l'adaptation d'une technique cellulaire.

-A ces fins, ont été nécessaires les mises en place i/d'une étude ancillaire pour mieux appréhender le contexte infectieux dans lequel nous souhaitons explorer la réponse du nouveau-né, grâce aux données provenant d'un projet déjà réalisé au sein de notre unité et ii/d'études de terrain pour la collecte d'échantillons biologiques .

Une première piste de réflexion, en cours au sein de notre groupe de travail depuis 2010, sur la distinction et le dosage des IgG maternelles et fœtales dans le sérum du nouveau-né utilise des approches protéomiques. La spectrométrie de masse (*MS* pour *mass spectrometry*) *bottom-up* (*BU*) a été employée pour identifier et différencier les peptides spécifiques d'allèles IGHG grâce à l'étude du polymorphisme peptidique individuel des fragments Fc de la chaîne lourde des IgG. **La partie « Polymorphisme du fragment Fc : validation moléculaire d'une approche utilisant la spectrométrie de masse »**, retrace cette approche et **décrit l'un des objectifs de mon travail qui a été d'utiliser et d'adapter des techniques de biologie moléculaire pour valider les résultats obtenus par la MS-BU, puis de confronter ces résultats à ceux initialement obtenus par la technique sérologique** qui a permis de sélectionner les échantillons d'intérêt pour ce travail.

Cette méthode, brevetée depuis 2013 en France et dont l'étape de purification exclusive des IgG sériques spécifiquement dirigées contre un pathogène d'intérêt est en cours d'optimisation, nous a conduit vers **une nouvelle piste de réflexion** qui vise à concilier la spécificité individuelle et la spécificité antigénique de l'immunoglobuline. Notre hypothèse, qui combinerait ces deux caractéristiques, est que la maturité acquise du système immunitaire fœtal permettrait de mettre en évidence la présence des LyB néonataux stimulés *in utero* grâce à leurs Ig spécifiques produites lors d'infections parasitaires congénitales. Effectivement, ces infections créent un cadre dans lequel le système immunitaire fœtal est stimulé, permettant au fœtus de produire ses propres Ig.

La vérification expérimentale de cette hypothèse repose sur une approche cellulaire i/en adaptant une technique d'immunologie, l'ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSPOT*) et ii/en l'appliquant dans un premier temps, pour des raisons d'accessibilité aux échantillons biologiques, au cas de la toxoplasmose. Basée sur le principe de l'ELISA, cette technique

permet d'étudier les caractéristiques fonctionnelles des LyB en les mettant en évidence grâce à la production de leurs Ig. Ainsi, la partie « **Adaptation de la technique ELISPOT pour mettre en évidence les lymphocytes B néonataux** » décrit le deuxième objectif de mon travail de thèse que sont les mises au point effectuées sur des LyB d'adultes déjà immunisés contre la toxoplasmose. A la fin de cette partie, j'évoque différents aspects pour poursuivre l'adaptation de cette technique, notamment, l'accès aux LyB d'individus en séroconversion et de nouveau-nés ayant contracté une toxoplasmose congénitale, pour pouvoir tester notre hypothèse. De plus, dans l'état actuel de nos travaux, il m'a semblé nécessaire de vérifier l'ubiquité du test actuellement mis au point, auprès d'individus infectés par des souches de toxoplasme provenant de zones géographiques différentes. Ainsi, comme notre unité bénéficie de structures et d'un ancrage historique de ses recherches en Afrique de l'Ouest, mon intérêt s'est porté naturellement vers cette région.

Pour ce faire, il a été nécessaire de recourir à des études de terrain antérieures et d'en mettre en place de nouvelles. Trois projets, qui ont chacun leur utilité pour poursuivre l'exploration du système immunitaire foetal, sont décrits dans la partie « **L'accès au matériel biologique d'intérêt** ». D'une part, comme nous voulions avoir des données supplémentaires quant à la séroprévalence toxoplasmique des femmes enceintes et vérifier le possible impact de l'infection sur les événements morbides durant la grossesse au Bénin, une étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose en utilisant les échantillons de la cohorte STOPPAM (Strategies TO Prevent Pregnancy Associated Malaria), constituée en 2007-2010, a été réalisée en 2017-2018. D'autre part, pour avoir accès à des cas de primo-infection toxoplasmique de la mère au cours de la grossesse, nous permettant d'isoler des cellules d'individus en séroconversion (mère) et de nouveau-né (sang de cordon), tout en composant avec la notion de diversité géographique des souches de toxoplasme, nous avons organisé deux études, incluant des recrutements de femmes enceintes, qui se nourrissent l'une l'autre. La première, que j'ai réalisée pendant trois mois à Cotonou entre février et avril 2018, est décrite dans le chapitre « Projet CoLa¹ : étude de terrain au Bénin sur la toxoplasmose en fin de grossesse». La pré-inclusion d'une centaine de femmes enceintes, durant leur 3^{ème} trimestre de grossesse, a conduit à l'inclusion définitive d'une dizaine de femmes à

¹ CoLa : Caractérisation de la production d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasites par les Lymphocytes B néonataux dans le cadre d'infections congénitales

l'accouchement avec la constitution d'une bio-banque d'échantillons de couples mère/enfant(s) potentiellement en contact avec une(des) souche(s) de *T. gondii* différente(s) de celles rencontrées en Ile de France, région dans laquelle se déroule la deuxième étude. La conception et le déroulement de cette dernière sont décrits dans le chapitre « Essai clinique TOXODIAG : étude de terrain en Ile de France sur la toxoplasmose au cours de la grossesse ». Les recrutements se font dans trois maternités, ont débuté en mai 2018 et se poursuivront sur une période de 18 mois.

PARTIE 3 - POLYMORPHISME DU FRAGMENT F_c :
VALIDATION MOLECULAIRE D'UNE APPROCHE
UTILISANT LA SPECTROMETRIE DE MASSE

I-L'approche protéomique à valider

Afin de pouvoir discriminer les Ig maternelles des Ig néo-synthétisées dans le sérum du nouveau-né, une approche par spectrométrie de masse a été initiée et les polymorphismesIGHG, en particulier les allèles peptidiques IGHG3, ont étudiés. Par cette technique, notre groupe de travail a montré la faisabilité de distinction et de quantification des IgG3 d'individus homozygotes et hétérozygotes pour différents allèles IGHG3 (Dechavanne *et al.*, 2012). L'approche MS-BU a été mise en place pour analyser les sérums d'une dizaine d'individus sélectionnés sur la base de leur diversité interindividuelle en allotypes G3m déterminée par la technique d'inhibition d'hémagglutination (Migot-Nabias *et al.*, 2008).

Très brièvement, la spectrométrie de masse est une technique qui permet de mesurer un rapport masse/charge de molécules (ou groupe de molécules) ionisées et d'en déduire la masse. A chaque masse déduite, une proposition de molécules est soumise à l'expérimentateur. L'efficacité de la MS est augmentée suite au couplage avec une technique séparative comme la chromatographie en phase liquide ou gazeuse. La MS-BU permet d'analyser un mélange de fragments peptidiques protéolytiques ionisés d'une protéine, n'excédant pas une vingtaine d'acides aminés. Ces fragments peptidiques sont usuellement obtenus suite à l'action de la trypsine, protéase qui génère des coupures en C-terminal de la lysine (K) et de l'arginine (R), acides aminés assez fréquents. Les valeurs du rapport masse/charge rendues par l'appareil permettent d'identifier ces petites séquences peptidiques. Grâce à un logiciel d'analyse (*i.e.* Mascot) la séquence de la protéine de départ est reconstituée avec une fiabilité affichée en pourcentage.

Ainsi pour notre étude, comme le schématise la figure n°26, après purification du sérum par chromatographie d'affinité utilisant la protéine G, les IgG sériques sont digérées par la trypsine. Les fragments peptidiques générés sont apprêtés (ionisation puis séparation par chromatographie en phase liquide) pour être analysés par le spectromètre de masse qui leur attribue un rapport masse/charge. Enfin, un filtre d'analyse et une comparaison des données théoriques et observées sont réalisés simultanément. Le premier travail permet de restreindre l'analyse aux fragments peptidiques d'intérêt (séquences peptidiques des régions CH2 et CH3 de la chaîne lourde des IgG), suivant des critères prédéfinis par nous-mêmes, et le deuxième travail permet la confrontation des séquences peptidiques trouvées avec celles des

bases de données permettant d'identifier l'allèle correspondant. Dans notre cas, une base de données spécifique a été compilée à partir de celle de SwissProt (<https://www.uniprot.org>) enrichie de la diversité allélique IGHG contenue dans la base IMGT®.

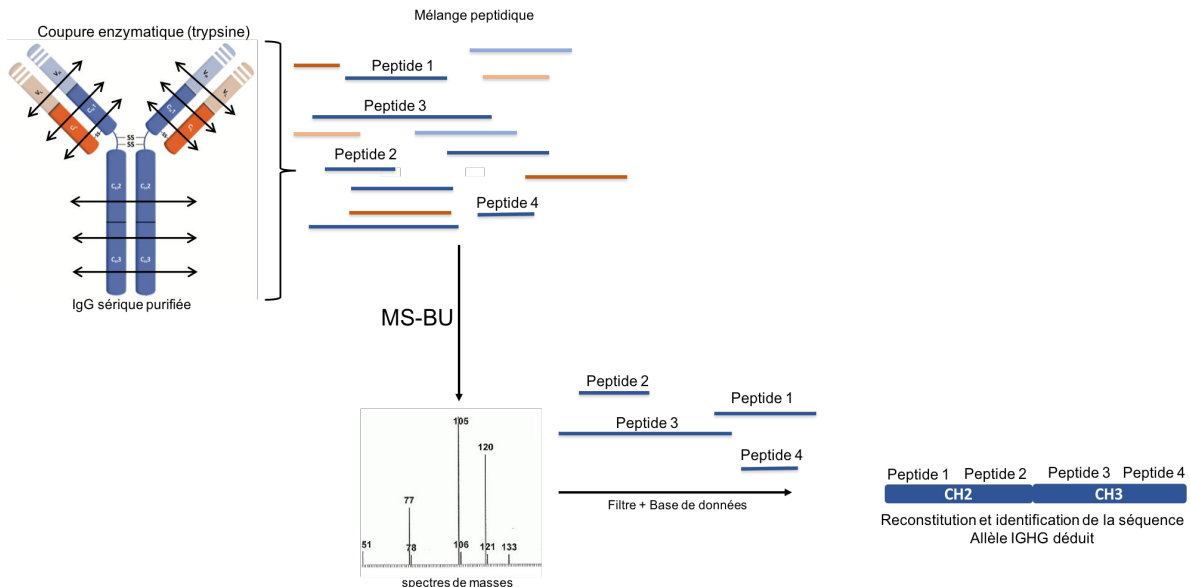


Figure n°26. Schéma simplifié de la MS-BU sur une IgG.
Production personnelle, aidée de l'illustration de Loureiro *et al.*, 2015.

	CH2										CH3																																																																						
IGHG3																																																																																	
*01 *02 *04 *05 *10	G	P	S	...	D	G	V	E	...	T	K	P	R	...	E	E	Q	N	S	T	F	R	...	V	L	...	T	I	S	K	T	K	...	S	R	D	E	L	T	K	...	D	I	A	V	E	W	E	S	S	G	...	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	S	...	Y	S	K	L	T	...	W	Q	Q	G	N	I	F	...	R	F	T	...
*03	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*06 *07	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*08	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*09	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*11 *12	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*13	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*14	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*15	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*16	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*17	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*18 *19	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
IGHG1																																																																																	
*01 *02	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*03	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*04	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
IGHG2																																																																																	
*01 *03 *04 *05	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*02	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*06	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
IGHG4																																																																																	
*01	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*02	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															
*03 *04	V	P	R	...	Y	F	L	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...	T	D	L	...	A	V	S	N	V	...	R	...	F	V	...	Q	I	...	R	F	...																															

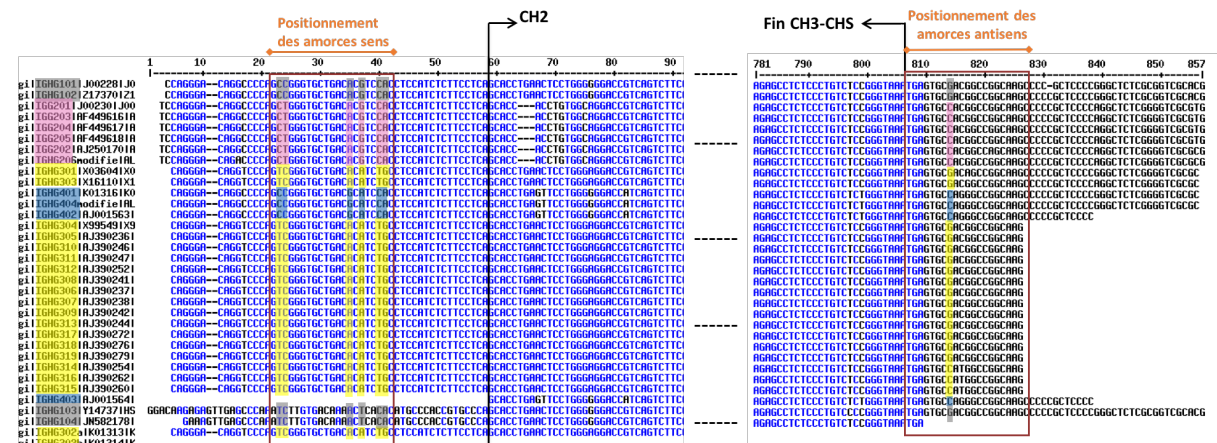
Figure n°27. Représentation simplifiée des polymorphismes en acides aminés portés par les allèles des 4 IGHG.
Source personnelle de Dechavanne.

Enfin, pour mieux comprendre et visualiser où se situent les acides aminés discriminants entre les allèles peptidiques au niveau des domaines CH2 et CH3 des 4 sous-classes d'Ig, un tableau (figure n°27) a été réalisé au moment de l'étude avec des pastilles de couleurs qui mettent en évidence ces différences.

II-L'approche moléculaire entreprise

Il était nécessaire de valider les résultats obtenus par la MS-BU avec une autre technique. Ainsi, comme les séquences peptidiques sont traduites grâce aux séquences nucléotidiques, le séquençage des domaines CH2 et CH3-CHS¹, où se trouvent la majorité des polymorphismes, permettait de répondre à la question. Sachant qu'il y a une très forte homologie de séquence (95%) entre les 4 gènes, la difficulté reposait sur l'amplification spécifique de chaque gène IGHG.

Les séquences correspondant aux domaines CH1, CH2 et CH3-CHS des allèles des 4 IGHG ont été extraites du site [imgt.org \(http://www.imgt.org/genedb/\)](http://www.imgt.org/genedb/), soit 4 allèles pour IGHG1, 6 allèles pour IGHG2, 19 allèles pour IGHG3 et 4 allèles pour IGHG4. Les séquences utilisées pour l'analyse correspondaient aux domaines CH2, CH3-CHS avec les zones introniques en amont du CH2 et en aval du CHS. Ces séquences ont ensuite été alignées pour déterminer les endroits où elles étaient les moins identiques afin de dessiner des amorces d'amplification spécifiques de chaque gène comme le montre la figure n°28.



Alignement des séquences réalisé sur l'interface MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)

Figure n°28. Alignement des allèles IGHG et positionnement des amorces d'amplification.

Les séquences en amont du domaine CH2 et en aval du domaine CH3-CHS sont illustrées, entre les deux les séquences sont figurées par des pointillés. A gauche : Les allèles IGHG suivis de leur numéro d'accèsion. Sur l'interface MultAlin, le code couleur pour une (forte) homologie de séquence est bleu et noir.

Après amplification spécifique, les produits d'amplification ont été séqués. Une lecture visuelle et manuelle a été faite pour renommer les acides nucléiques non ou mal identifiés afin de disposer de chromatogrammes « propres » pour une analyse plus précise des séquences. Grâce à une abaque de lecture spécialement établie pour cette étude, j'ai pu

¹ CHS (*Constant Heavy Secretary*) code la partie sécrétoire de l'Ig. Inclus dans notre étude, ce domaine est accolé en 3' du CH3.

attribuer les allèles nucléotidiques pour chaque individu. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été traduites en séquences peptidiques, pour comparer les allèles avec ceux identifiés par MS-BU. Toutefois, comme certaines de ces séquences peptidiques théoriques étaient différentes de celles répertoriées dans les bases de données (SwissProt et IMGT®), la base de données compilée a été enrichie de ces nouvelles séquences, et les échantillons biologiques ont été ré-analysés en MS-BU afin de vérifier la présence ou non de ces séquences dans le matériel biologique. Les résultats ont été présentés en 2016 lors de la 7^{ème} édition des Jeunes Chercheurs en Sciences de la Vie (7th Edition of Young Researchers in Life Science, YRLS), poster inséré en annexe n°1, et au Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP).

III-Article


Dix échantillons (sérum et ADN) provenant d'individus non concernés par une pathologie d'intérêt pour notre étude mais choisis sur la base de leur polymorphisme allotypique Gm défini sur le plan sérologique, nous ont permis :

- d'apporter une validation moléculaire de la MS-BU comme technique permettant de faire la distinction entre les allèles IGHG issus d'Ig totales (et donc non spécifiques d'un pathogène) présentes dans un même sérum ;
- de faire un comparatif entre les approches sérologique, protéomique et moléculaire.

L'excellente corrélation des résultats, obtenus entre les déterminations moléculaire et protéomique, démontre la pertinence de l'utilisation de la spectrométries de masse pour identifier différents allèles peptidiques des Ig dans un même échantillon.

L'investigation moléculaire des domaines CH2-CH3/CHS (intron compris) de la chaîne lourde IGHG a permis d'identifier 10 nouveaux allèles nucléotidiques (6 pour le gène IGHG2 et 4 pour le gène IGHG4), déclarés dans GenBank®. Ces allèles ont été traduits en peptides et pour certains d'entre eux leurs variations nucléotidiques ont entraîné un changement en acide aminé non référencé jusqu'alors. Le fait d'avoir introduit ces séquences dans nos bases de données protéiques afin de réinterroger le logiciel d'analyse (Mascot), nous a permis de valider biologiquement la présence de ces allèles dans les plasmas étudiés. Ainsi, ces nouveaux allèles peptidiques, qui sont au nombre de 3 (1 pour IGHG2 et 2 pour IGHG4), ont été déclarés dans ProteomXchange.

Human Immunoglobulin Heavy Gamma Chain Polymorphisms: Molecular Confirmation Of Proteomic Assessment*[§]

Magalie Dambrun^{†§¶¶}, Célia Dechavanne^{†§¶¶^b}, Alexandra Emmanuel^{†§¶¶}, Florentin Aussenac[§], Marjorie Leduc^{||}, Chiara Giangrande[¶], Joëlle Vinh[¶], Jean-Michel Dugoujon^{**}, Marie-Paule Lefranc^{††§§}, François Guillonnet^{||||}, and  Florence Migot-Nabias^{†§||||^a}

Immunoglobulin G (IgG) proteins are known for the huge diversity of the variable domains of their heavy and light chains, aimed at protecting each individual against foreign antigens. The IgG also harbor specific polymorphism concentrated in the CH2 and CH3-CHS constant regions located on the Fc fragment of their heavy chains. But this individual particularity relies only on a few amino acids among which some could make accurate sequence determination a challenge for mass spectrometry-based techniques.

The purpose of the study was to bring a molecular validation of proteomic results by the sequencing of encoding DNA fragments. It was performed using ten individual samples (DNA and sera) selected on the basis of their Gm (gamma marker) allotype polymorphism in order to cover the main immunoglobulin heavy gamma (IGHG) gene diversity. Gm allotypes, reflecting part of this diversity, were determined by a serological method. On its side, the IGH locus comprises four functional IGHG genes totaling 34 alleles and encoding the four IgG subclasses.

The genomic study focused on the nucleotide polymorphism of the CH2 and CH3-CHS exons and of the intron. Despite strong sequence identity, four pairs of specific gene amplification primers could be designed. Additional primers were identified to perform the subsequent sequencing. The nucleotide sequences obtained were first assigned to a specific IGHG gene, and then IGHG alleles were deduced using a home-made decision tree reading of the nucleotide sequences. IGHG amino acid (AA) alleles were determined by mass spectrometry. Identical results were found at 95% between alleles identified by proteomics and those deduced from genomics. These results validate the proteomic approach which could be used for diagnostic purposes, namely for a mother-and-child differential IGHG detection in a context of suspicion of congenital infection. *Molecular & Cellular Proteomics* 16: 10.1074/mcp.M116.064733, 824–839, 2017.

The human immune response mediated by the antibodies relies essentially on IgG, subdivided into four subclasses IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, ordered by decreasing concentrations in the circulating blood (1). The specificity of this immune response is ensured by the immense diversity of the repertoire of antigenic recognition carried by the paratopes, i.e. the variable domains of the heavy and light chains (2). The immunoglobulin (IG)¹ heavy gamma chains exhibit polymorphisms, mainly localized on the CH2 and CH3-CHS regions of the Fc fragment. This diversity relies on the number of heavy gamma (IGHG) nucleotide substitutions and amino acid (AA) changes listed in IMGT[®], the international ImMunoGeneTics information system[®] (<http://www.imgt.org>) (3). The polymorphism of the IG gamma chains is both isotypic (there are four functional IGHG genes) and allelic. To date 34 IMGT alleles (5 IGHG1, 6 IGHG2, 19 IGHG3, and 4 IGHG4) are identified, which correspond to 25 alleles with amino acid changes in the

From the [†]Institut de Recherche pour le Développement, UMR 216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Paris, France; [§]COMUE Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France; [¶]ESPCI Paris, PSL Research University, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), CNRS USR 3149, Paris, France; ^{||}Plate-forme protéomique de l'Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ^{**}Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, UMR 5288, CNRS et Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France; ^{††}IMGT[®], the international ImMunoGeneTics information system[®], Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire, LIGM, Institut de Génétique Humaine, IGH, UMR 9002, CNRS et Université de Montpellier, Montpellier, France; ^{§§}Institut Universitaire de France, Paris, France; ^{¶¶}Magalie Dambrun, Célia Dechavanne and Alexandra Emmanuel contributed equally to this work; ^{||||}François Guillonnet and Florence Migot-Nabias contributed equally to this work

Received October 15, 2016, and in revised form, February 1, 2017
 Published, MCP Papers in Press, March 6, 2017, DOI 10.1074/mcp.M116.064733

Author contributions: MD, CD, JV, FG and FMN designed research; MD, AE, FA, ML, FG and FMN performed research; ML, JMD, MPL and FG contributed reagents or analytical tools; MD, CD, AE, CG, FG and FMN analyzed data; MD, FG and FMN wrote the paper.

¹ The abbreviations used are: IG, immunoglobulin; AA, amino acid; CH, constant exon or domain of IG heavy chain; Fc, fragment crystallizable; Gm, gamma marker; IGHG, immunoglobulin heavy constant gamma gene or chain; SAAV, single amino acid variant.

coding regions or IMGT AA alleles (3 IGHG1, 4 IGHG2, 15 IGHG3, and 3 IGHG4 IMGT AA alleles, respectively) (4, 5). Several of the gamma chain polymorphisms are genetic variants detected serologically (or allotypes) and the combination of these gamma markers (Gm) carried by the gamma1, gamma2, and gamma3 chains constitute the G1m alleles, G2m alleles, and G3m alleles (4). The peptide diversity is subtle and is based on only a few amino acids sequence changes, some of which being very close when using mass measurement.

It may be important to take into account the IGHG polymorphism in several, nonexhaustive, cases. First, the use of monoclonal antibodies and related products is growing rapidly as therapeutic agents in disease areas such as cancer, rheumatoid arthritis, and Alzheimer's disease (6–8). Second, observations have been made on the dependence on some Fc conserved but also polymorphic AA localized at the CH2-CH3 domain interface, of the IgG Fc binding affinity to the FCGRT (neonatal Fc receptor, FcRn) (9). Indeed, apart from its role in transferring maternal IgG from mother to fetus via the placenta, the FCGRT contributes to enhance the IgG half-life in serum (10), and this aspect may be critical in the context of IgG-based therapeutics (11). Last but not least, the knowledge and the use of the *in vivo* IGHG polymorphism may lead to an important improvement of the biological diagnosis in neonates of certain congenital pathologies. Indeed, difficulties are encountered in the serologic detection of IgG neosynthesized by the fetus in cases where congenital infections are suspected, because of the systemic transfer of maternal IgG that occurs *in utero* across the placenta, resulting in about 90% of the maternal serum level of IgG in the full-term newborns at delivery (12). It is namely the case of parasitic infections such as congenital toxoplasmosis and congenital Chagas disease (13) for which combinations of parasitological, molecular or immunological tests are required to confirm the infection status (14, 15). As proof of concept, a proteomic approach exploiting the individual IGHG3 AA polymorphism has been patented in our laboratory, that aimed at distinguishing maternal from fetal total IgG in a newborn's blood sample by means of the detection by bottom-up mass spectrometry of proteotypic peptides allowing an assignment to IGHG3 alleles attributable to the IgG3 of either maternal or fetal origin (16, 17).

However, the strong sequence homogeneity between the different IGHG AA alleles imposes a strict verification of the results obtained by mass spectrometry (MS). For this reason, the aim of the present study was to bring a molecular confirmation of IGHG AA alleles determined by bottom-up mass spectrometry. A panel of ten plasma samples was selected from a previous study on immunogenetics of malaria performed in Benin, on the basis of the inter-individual diversity in their Gm alleles (4), deduced by the phenotypic characterization of their Gm allotypes using a serological technique (18). In parallel, the corresponding genomic DNA was extracted and

the gene portions comprising the polymorphic CH2 and CH3-CHS exons of the IGHG1, IGHG2, IGHG3, and IGHG4 genes were amplified and then sequenced in order to determine individual IGHG alleles. This study allowed assessing the degree of concordance between serological, proteomic and genomic determinations performed for each sample. Correlations have already been established between Gm alleles and IGHG AA alleles (4) as well as between G3m alleles deduced from serology and IGHG3 nucleotide alleles determined by genomic sequencing (19). The present study is the first to validate IGHG alleles identified by MS using DNA sequencing on samples selected on the basis of their Gm allele diversity, itself deduced from the serological determination of Gm allotypes. Outside the originality of the double confrontation of results presented here, this work aims at reinforcing the necessity to determine unambiguously IGHG AA sequences in view of the various therapeutic and/or diagnostic applications under development cited above.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Samples Collection—Plasma and corresponding DNA samples were obtained from a study on human genetic determinants of malaria that was performed in 2006–2007 in the south of Benin by the UMR 216 (18). This study was conducted among 155 children belonging mainly to the Fon ethnic group and was authorized by the institutional "Ethics Committee of the Faculté des Sciences de la Santé" (FSS) from the Université d'Abomey-Calavi (UAC) in Benin. For the purpose of the present study, samples from 10 children were selected on the basis of their Gm allotype polymorphism, determined by a serological method.

Children PA01, PA07, PA09, PA16, PA31, PA42, PA45, PA48 were asymptomatic carriers of the parasites responsible for malaria and were recruited in a primary school of Ouidah with the approval of the coordinating doctor of the sanitary zone and the inspector of education. For these schoolchildren, a collective written informed consent was obtained from the responsible person in charge of the Parents Association, after having dispensed oral information on the study to the school director, the teachers and the members of the Parents Association. The remaining two children had different clinical presentations of malaria, *i.e.* mild malaria attack (AS50) and severe malaria (NP49) and were recruited in the pediatric service of the National University Hospital of Cotonou. For these children, a written informed consent was obtained from their parents or guardians.

Blood was collected into 5 ml EDTA Vacutainer® tubes and after centrifugation, plasma samples and isolated peripheral buffy coat were frozen at -20°C . Genomic DNA was extracted from peripheral buffy-coats using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) (20).

Serological Determination of G1m and G3m Allotypes—Gm allotypes for G1m (1, 2, 3, 17) and G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 28) determinants (4) were analyzed in plasma samples by a qualitative standard hemagglutination inhibition method (21). Whereas G3m28 is a marker of the gamma 3 chains in European and Asian populations, Gm28 is often present on the gamma 1 chains in African populations (22). In brief, human blood group O Rh (D) erythrocytes were coated with anti-Rh (D) antibodies of known Gm allotypes. Plasma sample and reagent monospecific anti-allotype antibodies were added. Plasma containing IgG with a particular Gm allotype inhibited hemagglutination by the corresponding reagent anti-allotype antibody, whereas plasma sample that was negative for this allotype did not.

Mass Spectrometry (MS) Analysis of IGHG Tryptic Peptides—

Sample Preparation—For each sample, total IgG was purified by injecting 200 μ l of plasma into a Protein G column (Protein G Sepharose HP SpinTrap, GE Healthcare, France) which presents high affinity for the Fc fragment of all IgG subclasses. Following manufacturer's instructions, IgG binding was performed at neutral pH, elution was performed by lowering the pH, and the eluted material was collected in neutralization buffer to preserve the integrity of acid-labile IgG. Dithiothreitol (DTT, 20 mM final) was added to 47 μ l of purified samples for 30 min at 56 °C in order to disrupt disulfide bonds. Proteolysis was performed by incubation with trypsin (Promega, France, 10 ng/ μ l final) for 3 h at 37 °C, and stopped with trifluoroacetic acid (TFA, Pierce, France, 0.5% final).

Bottom-up LC-MS/MS Analysis—Peptides were concentrated and separated by nano High-Performance Liquid Chromatography (nHPLC) hyphenated with an orbitrap mass spectrometer. For each sample, 4 μ l were then analyzed in LC-MS/MS. Analyses were realized using an RSLC Ultimate 3000 Rapid Separation liquid chromatographic system coupled to a hybrid Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Briefly, peptides were loaded and washed on a C18 reverse phase precolumn (3 μ m particle size, 100 Å pore size, 75 μ m i.d., 2 cm length). The loading buffer contained 98% H₂O, 2% acetonitrile (ACN) and 0.1% TFA. Peptides were then separated on a C18 reverse phase resin (2 μ m particle size, 100 Å pore size, 75 μ m i.d., 15 cm length) with a 35 min "effective" gradient from 99% A (0.1% formic acid and 100% H₂O) to 40% B (80% ACN, 0.085% formic acid and 20% H₂O).

The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data dependent scheme with full MS scans acquired in the orbitrap analyzer, followed by up to 15 MS/MS higher-energy collisional dissociation (HCD) spectra on the most abundant ions detected in the MS scan. Mass spectrometer settings were: full MS (AGC: 3.10e6, resolution: 70,000, m/z range 400–2000, maximum ion injection time: 100 ms); MS/MS (Normalized Collision Energy: 30, resolution: 17,500, intensity threshold: 2.10e4, isolation window: 4.0 m/z , dynamic exclusion time setting: 12 s, AGC Target: 1.10e5 and maximum injection time: 100 ms). The fragmentation was permitted for precursor with a charge state of 2 to 4 excluding isotopes. The software used to generate Mascot generic format (MGF) files was Proteome Discoverer 1.3.

Database Queries of Extracted Experimental Data—Three FASTA-formatted protein databases were used in combination in order to assign a majority of fragmentation spectra: **1-** the *Homo sapiens* entries from the UniProt/SwissProt database release 2016–02 (20,273 sequences), **2-** the 2014 IMGT® IGHG allele database (2, 3, 5) (IMGT Repertoire. Sections: Protein displays, Alignments of alleles, <http://www.imgt.org>) (60 sequences; 20,789 amino acids) and **3-** the individual databases of IGHG CH2 and CH3-CHS sequences obtained following the molecular investigation described above for the 10 patients incorporated in this study and supplied in [supplemental Table S1](#) (60 sequences; 13,004 amino acids). Peaklists extracted from MS/MS spectra were compared with the above databases using Mascot search engine 2.5.1 (Matrix Science). The following settings were applied: mass tolerances were 4 ppm for precursors and 10 mmu for fragments, a significance threshold score corresponding to $p < 0.05$ was applied to filter identifications but a minimum individual peptide Mascot score value of 25 excluded poorly annotated spectra. Based on these criteria, a nontargeted (bottom up) analysis of the samples was performed. In order to avoid possible ambiguities, the following restrictive conditions were applied for mascot queries: trypsin proteolysis specificity without missed cleavage, methionine oxidation as unique modification allowed (as partial) and mass-to-charge (m/z) states with $z > 2$ or more. Under these conditions false positive rates were usually under 1%. Mascot searches resulted in protein

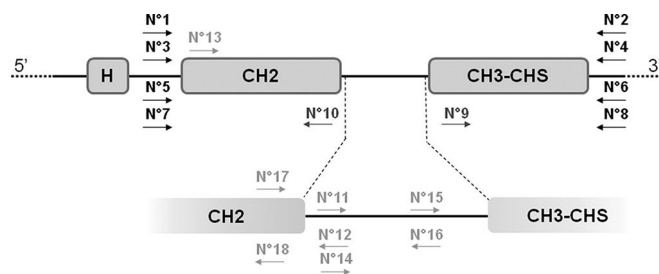


Fig. 1. Position of primers on a partial representation of the *Homo sapiens* IGHG genes. The CH1 exon is not shown. H represents the single hinge exon of IGHG1, IGHG2 and IGHG4, and the most 3' hinge exon of IGHG3 H4 (Gene tables > IGHC, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>). A focus on the intron separating CH2 and CH3-CHS exons is also shown. The primers are represented by arrows which indicate their position and 5' > 3' sequence orientation. Sequence numbering positions are for the allele*01 of each IGHG gene (IMGT/LIGM-DB Accession numbers (24): J00228 for IGHG1, J00230 for IGHG2, X03604 for IGHG3, and K01316 for IGHG4) according to IMGT/BlastSearch (<http://www.imgt.org>). Black arrows represent primers used for PCR and sequencing: N°1/IGHG1_1017–1036 (FWD 5'-gccgggtgctgacacgtcca-3'), N°2/IGHG1_1820–1801 (REV 5'-cttgccggcgcgtgcactca-3'), N°3/IGHG2_1018–1037 (FWD 5'-gctgggtgctgacacgtcca-3'), N°4/IGHG2_1819–1800 (REV 5'-cttgcyggcgtggcactca-3'), N°5/IGHG3_1596–1615 (FWD 5'-gtcgggtgctgacacacatctg-3'), N°6/IGHG3_2400–2381 (REV 5'-cttgccggcyrtsgcactca-3'), N°7/IGHG4_1029–1048 (FWD 5'-gcatccactcctctcttc-3'), N°8/IGHG4_1820–1801 (REV 5'-cttgccggccctggcactca-3'). Dark gray arrows represented IGHG consensual sequencing primers, they are common for the 4 IGHG genes: N°9/IGHGseqF (FWD 5'-aggtcagcctgactgctg-3') localized 1544–1563 for IGHG1, 1543–1562 for IGHG2, 2124–2143 for IGHG3, and 1544–1563 for IGHG4, and N°10/IGHGseqR (REV 5'-tggagaccttgactgtac-3') localized 1336–1317 for IGHG1, 1334–1315 for IGHG2, 1915–1896 for IGHG3, and 1335–1316 for IGHG4. Light gray arrows represented IGHG specific sequencing primers: N°11/IGHG1_1390–1405 (FWD 5'-accctgggggtgcgag-3'), N°12/IGHG1_1405–1390 (REV 5'-ctcgacccccacgggt-3'), N°13/IGHG2_1058–1073 (FWD 5'-ccacctgtggcaggac-3'), N°14/IGHG2_1388–1403 (FWD 5'-accgcggggatag-3'), N°15/IGHG3_1999–2014 (FWD 5'-aggccagcttgaccca-3'), N°16/IGHG3_2010–1995 (REV 5'-tcaagctggcctctgt-3'), N°17/IGHG4_1348–1366 (FWD 5'-cgctctcctcgcagagaaac-3'), N°18/IGHG4_1356–1340 (REV 5'-tggaggacgggagcct-3'). FWD = forward; REV = reverse; r = a or g; y = c or t; s = g or c.

groups sharing several peptides but showing specific (unique) peptides demonstrating their presence. Peptide information regarding AA diversity of IGHG1 to IGHG4 genes and their alleles were carefully collected.

Molecular Investigation of the IGHG Diversity—

DNA Amplification—The nucleotide sequences of the 34 IGHG alleles which cover the diversity of the four functional IGHG genes were extracted from IMGT/GENE-DB (5) and Alignment of alleles, IMGT Repertoire® (3) (<http://www.imgt.org>) and aligned using the Multalin website (<http://multalin.toulouse.inra.fr>). Two polymorphic areas framing the CH2 and the CH3-CHS exons, respectively, allowed designing 4 pairs of primers (IDT, Leuven Belgium) for the amplification of each IGHG gene separately, as represented in Fig. 1 and [supplemental Table S2](#).

Genomic DNA amplification was performed using the AccuPrime™ TaqDNA Polymerase High Fidelity kit (Invitrogen, France) according to the following conditions: water (10.9 μ l) + 10× Buffer II (2 μ l) + 100% DMSO (0.4 μ l) + 5 U/ μ l enzyme (0.1 μ l) + 5 μ M forward primer (0.8 μ l) +

TABLE I
G3m and IGHG3 AA alleles deduced from the G3m allotype determination

Plasma samples	G3m alleles ^a	G3m simplified form ^b	Attributable IGHG3 AA alleles
AS50	5,10,11,13,14/5,10,11,13,14	G3m5*/G3m5*	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12/IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12
NP49	10,11,13,15/10,11,13,15	G3m15*/G3m15*	IGHG3*17/IGHG3*17
PA01	5,10,11,13,14/10,11,13,15	G3m5*/G3m15*	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12/IGHG3*17
PA07	5,10,11,13,14/5,6,10,11,14	G3m5*/G3m6*	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12/IGHG3*13
PA09	5,10,11,13,14/5,6,11,24	G3m5*/G3m24*	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12/IGHG3*03
PA16	5,6,10,11,14/5,6,10,11,14	G3m6*/G3m6*	IGHG3*13/IGHG3*13
PA31	10,11,13,15/5,6,11,24	G3m15*/G3m24*	IGHG3*17/IGHG3*03
PA42	5,6,10,11,14/10,11,13,15	G3m6*/G3m15*	IGHG3*13/IGHG3*17
PA45	5,10,11,13,14/5,10,11,13,14	G3m5*/G3m5*	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12/IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12
PA48	5,6,11,24/5,6,11,24	G3m24*/G3m24*	IGHG3*03/IGHG3*03

^a G3m alleles are characterized by specific combinations of G3m allotypes and are written by increasing numbers of markers (separated by commas) (2, 4). As Gm allotypes are encoded on chromosome 14 (14q 32.3), two G3m alleles are expressed and mentioned using a slash mark.

^b the simplified G3m form contains the number of one representative allotype followed by *.

5 μ M reverse primer (0.8 μ l) + 5 ng/ μ l DNA sample (5 μ l). For IGHG1 and IGHG2 the amplification conditions were 94 °C during 30 s (preliminary denaturation); 94 °C during 30 s (denaturation), 69 °C during 30 s (annealing), 72 °C during 1 min (elongation) 35 times; 72 °C during 7 min (final elongation) and then maintaining at 10 °C. Similar conditions were applied for IGHG3 and IGHG4 gene amplification except for annealing and elongation temperatures, which were set at 60 °C and 68 °C, respectively. PCR products of 804 bp (IGHG1), 802 bp (IGHG2), 805 bp (IGHG3), and 762 bp (IGHG4) were obtained. Their quality was checked by gel migration on 1% agarose solubilized in TBE 0.5 \times at 100 V during 40 min in presence of a 100 bp molecular weight marker (Invitrogen, France). Then, the PCR products were purified using Wizard SV Gel and PCR Clean Up system kit (Promega, France). The DNA concentration was measured on a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, France).

DNA Sequencing—Sequencing of the PCR products was performed using each of the four pairs of amplification primers with the addition of one consensual pair of primers located inside the CH2 and CH3-CHS region (Fig. 1). A control sequencing of the same PCR products was performed using sequencing primers specific for each of the four IGHG genes and located either inside the CH2 exon, or in the intron between the CH2 and CH3-CHS exons. As recommended by the “Genome and Sequencing Platform” (Institut Cochin-Centre de Recherche, Paris, France), sample templates were prepared as follows: 800 ng of purified PCR product and 30 ng (4 pmoles) primers (forward or reverse) in a 15 μ l final volume. Sequencing was performed at the Platform on a 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) and raw sequences made available on the Platform website.

Sequence Analysis—Raw sequences were read and corrected with the “4peaks” free software (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>). Contigs were then created using the “Sequencher® 5.0” software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), allowing a visualization of sequence chromatograms to be compared with the IGHG1*01, IGHG2*01, IGHG3*01, and IGHG4*01 IMGT® reference alleles (<http://www.imgt.org>) (5). Although the intron localized between the CH2 and CH3-CHS exons was amplified and sequenced, the sequence analysis was focused on the CH2 and CH3-CHS exons. A first analysis step consisted to check, in addition to the observation of a single band on agarose gel, that the amplification products were IGHG gene specific. For this purpose, verification was made of the presence of several specific codons located along the CH2 and CH3-CHS exons of each IGHG gene, as summarized in [supplemental Table S3](#). Once this done, each IGHG allele could be attributed by moving successively from a polymorphic nucleotide to another along the coding sequence covering the CH2 and CH3-CHS exons. This work was facilitated by the implementation of a decision tree reading

of the IGHG nucleotide sequences, represented in [supplemental Table S4](#).

Proteomic Analysis—The IGHG nucleotide sequences resulting from the sequencing of amplified DNA fragments of all experimental samples were artificially spliced between the CH2 and CH3-CHS exons and translated using the converter software (<http://didac.free.fr/seq/dna2pro.htm>). This allowed to create for each sample an experimental “sample database” to be imported in Mascot software for a new peptide query aiming at detecting single amino acid variants (SAAV) unknown to date (26, 27) and therefore not listed in the concatenated IMGT® IGHG allele and SwissProt database used in the first MS analysis. The peptide interrogation was performed according to the same conditions as previously used. For each sample of purified IgG, the analysis proceeded in two steps, a first query of IGHG peptides on each sample-specific database preceding a second query where the sample-specific databases were added to the IMGT® and SwissProt databases.

RESULTS

Gm Alleles Deduced from Serological Determination of Gm Allotypes—Experimental samples originated from 7 boys and 3 girls aged from 4 to 10 years (mean age \pm S.D. = 6.9 \pm 1.6 years) all belonging to the Fon ethnic group which prevails in South-Benin except one child (PA09) who belonged to the Yoruba ethnic group originating from Nigeria. These samples were selected out of a series of 155 samples for the presence in their plasma of IgG characterized by the four main G3m alleles (G3m5*, G3m6*, G3m15*, and G3m24*) that may be encountered among sub-Saharan African populations (28). Table I presents the results of the serological determination of G3m allotypes, from which G3m alleles were deduced. It appears that IgG from each plasma sample were representative of one particular G3m allele combination, at the homozygous or heterozygous state, Gm allotypes being co-dominantly expressed (4, 19). Otherwise, all samples presented the G1m17,1 allele, known to be encoded by IGHG1*01, IGHG1*02, or IGHG1*05 (Gene table *Homo sapiens* IGHC, IMGT Repertoire) (<http://www.imgt.org>) (4). NP49 and PA31 samples were Gm28-positive with a plausible attribution of this allotype to the gamma 1 chain (IGHG1*05p, IGHG1*06p) (4) (Allotypes, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>).

IGHG AA Alleles Deduced from Mass Spectrometry Analysis Using Usual Peptide Databases—As we routinely use the SwissProt *Homo sapiens* FASTA protein database we quickly realized it was not pertinent regarding the IGHG diversity. Thus we added the IMGT® database of all IGHG AA alleles. Using two FASTA sequence databases with overlapping sequences can be confusing. Indeed if unique peptides were attributable to specific IGHG genes and alleles to each IG heavy chain, as listed in Table II, many peptides were shared between all alleles of a given IGHG gene. Because Mascot sorts resulting identifications according to the hits with the best matching set of peptides, only peptides comprised in the same sets of the Mascot analysis were considered and by default not those included in the subsets. This allowed exclusion of possible ambiguities corresponding to alleles with lesser occurrence probability. Following these rules, two heterozygous IGHG allele pairings could be easily deduced. It was for example the case of IGHG3*03/IGHG3*13 for AS50 and PA16 where the unambiguous attribution of IGHG3*03 (based on the presence of the discriminatory R.WQEGNVF-SCSVMHEALHNR.F peptide) led to the deduction of IGHG3*13 as second IGHG3 allele (based on the presence of both K.GFYPSDIAVEWESSGQPENNYK.T and R.WQEGNIFSCS-VMHEALHNR.F issued from IGHG3*06*07*13 and IGHG3*13, respectively). In other cases, allele pairings could be partly deduced, such as IGHG2*06/IGHG2*01*03*04*05*06 for A550, PA07, PA09, PA16, and PA42. By lack of a sufficient coverage of discriminatory peptides, MS analysis did not allow defining the alleles for IGHG1 of all samples and IGHG4 of a majority of them, however for PA01, PA42, and PA45 the K.TTPPVLSDGSFFLYSR.L peptide allowed to exclude IGHG4*03.

IGHG Alleles Deduced from Sequencing of the CH2 and CH3-CHS Region—Critical nucleotide positions listed in the supplemental Table S4 allowed discriminating alleles assigned to each IGHG gene. The 10 samples were homozygous for IGHG1*02 (Alignment of alleles IGHG1, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>), as demonstrated by the reading of the IGHG1 CH2 to CH3-CHS nucleotide sequences. Following the same strategy, the IGHG2*06 allele (Alignment of alleles IGHG2, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>) could be deduced unambiguously, for 9 out of 20 IGHG2 alleles (Table III). In 10 other cases, the IGHG2*01*03*04*05 could be assigned to four types of alleles departing from the IGHG2*01 IMGT® reference allele by some silent nucleotide substitutions (all comprising at least CH2 t273>c, based on the IMGT® unique numbering (25)), which have not yet been described. In the last case, that concerned the PA01 sample, a nonsynonymous CH2 g274>c substitution (associated with two silent ones, CH2 t273>c and CH3 a243>g) generated a CH2 V92>L AA change defining, for the sequence CH2 and CH3-CHS, a putative new AA allele of IGHG2. Regarding IGHG3 (Alignment of alleles IGHG3, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>), AA alleles could be directly deduced from

the sequencing, and were in order of decreasing frequency IGHG3*01*04*05*10, IGHG3*03, IGHG3*13, and IGHG3*17 (Table IV). Lastly, for IGHG4 (Alignment of alleles IGHG4, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>), the IGHG4*01 or IGHG4*04 AA alleles could be unambiguously assigned from the sequencing in 8 out of 20 cases (Table V). In nine other cases, two types of silent substitutions (including at least CH2 g3.4>a) led to the identification of putative alleles which have not yet been described, without impeding a common deduction of the IGHG4*01*04. For the PA07 sample, two nonsynonymous substitutions (CH2 g271>a and a322>c) generated the AA changes CH2 V91>I and N108>H, respectively, defining for the sequence CH2 and CH3-CHS a putative new AA allele of IGHG4. An additional CH3 a32>g substitution corresponding to a CH3 Q11>R AA change occurred for one allele from both AS50 and PA16 samples, defining for the sequence CH2 and CH3-CHS an additional putative novel IGHG4 AA allele.

Confrontation of Serological, Proteomic, and Genomic Approaches of IGHG Allele Deduction or Determination—

IGHG1—Whatever the method employed, all samples were monomorphic for IGHG1 alleles. The genomic determination was the most accurate, leading to IGHG1*02, whereas serology identified G1m17,1 allotypes (that may correspond to either IGHG1*01 or IGHG1*02) and proteomics could not yield distinguishable peptides from specific IGHG1 alleles because of lack of distinguishing peptide coverage. In contrary to serological results which indicated a Gm28 carriage for NP49 and PA31, the combined CH3 g344, 115R and CH3 a347, 116Y positions corresponding to this marker were not found in any sample either on IGHG1 or IGHG3 alleles. However, it is not excluded that only one of the two alleles present per individual was sequenced and that the allele carrying Gm28 was missed in the amplification.

IGHG2—No serological determination was performed for IGHG2 but prevalent Gm haplotypes are characteristic of given populations, and because of the African origin of the individuals under study, an absence of G2m23 allotype is the most plausible configuration, consistent with the IGHG2*01*03*04*05*06 (4, 28). Proteomics helped to restrict the possibilities with the assignment of IGHG2*06 combined to IGHG2*01*03*04*05*06 for AS50, PA07, PA09, PA16, and PA42. Interestingly, genomics contributed to further specify these results by attributing IGHG2*06 at the homozygous state to AS50, NP49, and PA42 and at the heterozygous one to PA07, PA09, and PA16. Moreover, it is worth to notice that a new IGHG2 AA allele was suggested for PA01 on the basis of a nonsynonymous substitution.

IGHG3—For the much more polymorphic IGHG3 alleles, results from the different methods were challenging. They are summarized in the Table VI. Considering that a whole number of 20 IGHG3 alleles were deduced, the greatest number of discordances ($n = 8$) was recorded between serological and genomic approaches, and 6 of them appeared also between

TABLE II

IGHG AA alleles deduced from mass spectrometry analysis of proteotypic peptides after trypsin digestion of the IG heavy chain. "Observed proteotypic peptides" correspond to a trypsin digestion (cleavage site indicated by a point) of the constant region of the IG gamma chains encoded by a given *Homo sapiens* IGHG gene; "m/z" is the mass-to-charge ratio corresponding to the peptide, in oxidized form or not, observed with the maximal score; "z" represents the peptide charge state; "Ox" indicates whether the peptide was found at least once in oxidized form (if so, number of occurrences/number of observations) or not (N); "Corresponding IGHG alleles" are mentioned according to amino acid sequences and positions from IMGT repertoire (<http://www.imgt.org>) and (25); "Attributable IGHG allele combinations" are identified by a slash mark separating the two attributable alleles or groups of alleles

Purified IgG samples	IGHG gene	Observed proteotypic peptides	m/z	z	Ox	Scoremax	Position	Corresponding IGHG alleles	Attributable IGHG allele combinations
AS50	IGHG1	K.GPSVFLAPSSK.S	593.83	2	N	66	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
		K.THTCPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	683.36	4	N	62	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVVDVSHEDPEVK.F	1041.51	2	N	81	CH2 17-39	all IGHG1	all IGHG1
	IGHG2	REEQNSTYR.V	595.26	2	N	30	CH2 83-85	all IGHG1	all IGHG1
		K.TTPPVLDSGGSFFLYSK.L ^a	937.46	2	N	42	CH3 79-89	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	935.94	4	N	67	CH2 17-80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*06 /
		REEQFNSTFR.V ^b	579.26	2	N	31	CH2 83-85	all IGHG2	IGHG2*01*03*04*05*06
		R.VSVLTVHQDWLNGK.E	897.50	2	N	79	CH2 85.1-101	all IGHG2	all IGHG2
		K.GFYPSDISVWESNGQPENNYK.T	1280.57	2	N	54	CH3 26-80	IGHG2*06	IGHG2*06
		R.WQEGNWFSCVMHEALHNR.F	1122.51	2	5/13	110	CH3 95-116	IGHG3*03	IGHG3*03 /
		R.WQEGNWFSCVMHEALHNR.F	1129.51	2	2/7	111	CH3 95-116	IGHG3*13	IGHG3*13
		K.YGPPPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	943.81	3	N	66	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4 /
R.TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	1244.59	3	N	54	CH2 17-80	all IGHG4	all IGHG4		
NP49	IGHG1	R.WQEGNWFSCVMHEALHNYTQK.S	915.75	3	N	55	CH3 95-120	all IGHG4	all IGHG4
		K.GPSVFLAPSSK.S	593.83	2	N	67	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
		K.THTCPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	910.81	3	N	68	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
	IGHG2	R.TPEVTCVVDVSHEDPEVK.F	1041.51	2	N	81	CH2 17-39	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	935.94	4	N	59	CH2 17-80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*01*03*04*05*06 /
		REEQFNSTFR.V ^b	579.27	2	N	32	CH2 83-85	all IGHG2	all IGHG2
		R.VSVLTVHQDWLNGK.E	897.50	2	N	83	CH2 85.1-101	all IGHG2	all IGHG2
		K.TTPPMLDSGGSFFLYSK.L ^c	961.45	2	1/4	48	CH3 79-89	all IGHG2	all IGHG2
		K.GFYPSDIAMWESSGQPENNYK.T	1275.05	2	1/2	40	CH3 26-80	IGHG3*17*18*19	IGHG3*03 /
		R.WQEGNWFSCVMHEALHNR.F	748.67	3	N	37	CH3 95-116	IGHG3*03	IGHG3*17*18*19
		R.WQEGNWFSCVMHEALHNYTQK.S	920.09	3	3/8	66	CH3 95-120	IGHG3*17*18*19	all IGHG4 /
		K.YGPPPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	943.81	3	N	78	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4
PA01	IGHG1	R.TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	1244.59	3	N	71	CH2 17-80	all IGHG4	all IGHG4
		REPQVYTLPPSQEEMTK.N	938.95	2	N	36	CH3 1.1-17	all IGHG4	all IGHG4
		K.GPSVFLAPSSK.S	593.83	2	N	61	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
	IGHG2	K.THTCPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	910.81	3	N	64	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVVDVSHEDPEVK.F	1041.51	2	N	83	CH2 17-39	all IGHG1	all IGHG1
		K.TTPPVLDSGGSFFLYSK.L ^a	937.46	2	N	60	CH3 79-89	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	935.94	4	N	71	CH2 17-80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*01*03*04*05*06 /
		R.WQEGNWFSCVMHEALHNR.F	753.02	3	1/6	76	CH3 95-116	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG2*01*03*04*05*06
		K.YGPPPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	943.81	3	N	68	H 3-CH2 13	all IGHG4	IGHG2*01*03*04*05*06
		R.TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	1244.59	3	N	30	CH2 17-80	all IGHG4	IGHG3*01*02*04 to *12
		REPQVYTLPPSQEEMTK.N	938.95	2	N	48	CH3 1.1-17	all IGHG4	IGHG4*01*02*04 /
		K.TTPPVLDSGGSFFLYSK.L	634.65	3	1/6	34	CH3 79-89	all IGHG4 except IGHG4*03	all IGHG4
PA07	IGHG1	R.WQEGNWFSCVMHEALHNYTQK.S	915.75	3	N	52	CH3 95-120	all IGHG4	all IGHG4
		K.GPSVFLAPSSK.S	593.82	2	N	67	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
		K.THTCPCPAPPELLGGPSVFLPPKPK.D	910.81	3	N	75	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
	IGHG2	R.TPEVTCVVDVSHEDPEVK.F	1041.50	2	N	88	CH2 17-39	all IGHG1	all IGHG1

Interest in Proteomic Determination of the IGHG Diversity

TABLE II—continued

Purified IgG samples	IGHG gene	Observed proteotypic peptides	m/z	z	Ox	Scoremax	Position	Corresponding IGHG alleles	Attributable IGHG allele combinations
PA09	IGHG2	R.EEQYNSTYR.V	595.26	2	N	31	CH2 83–85	all IGHG1	
		K.TTPPVLDSGFFLYSK.L ^a	937.46	2	N	60	CH3 79–89	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDSHEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	935.95	4	N	86	CH2 17–80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*06 / IGHG2*01*03*04*05*06
		R.EEQFNSTFR.V ^b	579.26	2	N	31	CH2 83–85	all IGHG2	
	IGHG3	K.GFYPSDISVEWESNGQPENNYK.T	1280.57	2	N	54	CH3 26–80	IGHG2*06	
		R.WQGNIFSCVMHEALHNR.F	753.02	3	N	105	CH3 95–116	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*13 / IGHG3*01*02*04 to *12
		R.WQGNIFSCVMHEALHNR.F	1129.51	2	2/9	112	CH3 95–116	IGHG3*13	
		K.YGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKD	943.81	3	N	87	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4 / all IGHG4
	IGHG4	R.TPEVTCVWVDSQEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	1244.59	3	N	85	CH2 17–80	all IGHG4	
		R.EEQFNSTYR.V	587.26	2	N	31	CH2 83–85	all IGHG4	
		R.EPQVYTLPPSQEEMTK.N	938.95	2	N	46	CH3 1.1–17	all IGHG4	
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNYTK.S	915.75	3	2/10	72	CH3 95–120	all IGHG4	
PA16	IGHG1	K.GPSVFPLAPSSK.S	593.83	2	N	67	CH1 1.1–13	all IGHG1	all IGHG1 / all IGHG1
		K.THTPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	910.81	3	N	63	H 7-CH2 13	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDSHEDPEVK.F	1041.50	2	N	82	CH2 17–39	all IGHG1	
		R.EEQYNSTYR.V	595.26	2	N	25	CH2 83–85	all IGHG1	
	IGHG2	K.TTPPVLDSGFFLYSK.L ^a	937.46	2	N	60	CH3 79–89	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDSHEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	935.94	4	N	61	CH2 17–80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*06 / IGHG2*01*03*04*05*06
		K.GFYPSDISVEWESNGQPENNYK.T	854.05	3	N	41	CH3 26–80	IGHG2*06	IGHG3*03 / IGHG3*01*02*04 to *12
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNR.F	1122.51	2	2/8	110	CH3 95–116	IGHG3*03	
	IGHG3	R.WQGNIFSCVMHEALHNR.F	1129.02	2	1/8	76	CH3 95–116	IGHG3*01*02*04 to *12	
		K.YGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKD	943.81	3	N	65	H 3-CH2 13	all IGHG4	
		R.TPEVTCVWVDSQEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	1244.59	3	N	40	CH2 17–80	all IGHG4	
		R.EPQVYTLPPSQEEMTK.N	938.95	2	N	48	CH3 1.1–17	all IGHG4	
IGHG4	R.WQEGNVFSCVMHEALHNYTK.S	915.75	3	1/4	61	CH3 95–120	all IGHG4		
	K.GPSVFPLAPSSK.S	593.83	2	N	58	CH1 1.1–13	all IGHG1	all IGHG1 / all IGHG1	
	K.THTPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	910.81	3	N	62	H 7-CH2 13	all IGHG1		
	R.TPEVTCVWVDSHEDPEVK.F	1041.51	2	N	92	CH2 17–39	all IGHG1		
PA31	IGHG1	K.TTPPVLDSGFFLYSK.L ^a	937.46	2	N	51	CH3 79–89	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDSHEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	935.94	4	N	64	CH2 17–80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*06 / IGHG2*01*03*04*05*06
		K.GFYPSDISVEWESNGQPENNYK.T	1280.57	2	N	53	CH3 26–80	IGHG2*06	IGHG3*03 / IGHG3*13
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNR.F	1122.51	2	6/15	108	CH3 95–116	IGHG3*03	
	IGHG2	R.WQGNIFSCVMHEALHNR.F	753.35	3	N	88	CH3 95–116	IGHG3*13	
		K.YGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKD	943.81	3	N	78	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4 / all IGHG4
		R.TPEVTCVWVDSQEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	1244.59	3	N	28	CH2 17–80	all IGHG4	
		R.EPQVYTLPPSQEEMTK.N	938.95	2	N	42	CH3 1.1–17	all IGHG4	
	IGHG3	R.WQEGNVFSCVMHEALHNYTK.S	915.75	3	N	56	CH3 95–120	all IGHG4	
		K.GPSVFPLAPSSK.S	593.83	2	N	60	CH1 1.1–13	all IGHG1	all IGHG1 / all IGHG1
		K.THTPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKD	910.81	3	N	59	H 7-CH2 13	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDSHEDPEVK.F	1041.51	2	N	81	CH2 17–39	all IGHG1	
IGHG4	R.EEQYNSTYR.V	595.26	2	N	30	CH2 83–85	all IGHG1		
	R.TPEVTCVWVDSHEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	935.94	4	N	65	CH2 17–80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*01*03*04*05*06 / IGHG2*01*03*04*05*06	
	K.GFYPSDIAMEWESSGQPENNYK.T	1283.05	2	1/1	39	CH3 26–80	IGHG3*17*18*19	IGHG3*03 / IGHG3*17*18*19	
	R.WQEGNVFSCVMHEALHNR.F	1122.51	2	6/12	111	CH3 95–116	IGHG3*03		
IGHG4	R.WQGNIFSCVMHEALHNYTK.S	920.09	3	2/7	62	CH3 95–120	IGHG3*17*18*19		
	K.YGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKD	943.81	3	N	74	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4 / all IGHG4	
	R.TPEVTCVWVDSQEDPEVQFNWVYDGVVEVHNAK.T	1244.59	3	N	84	CH2 17–80	all IGHG4		

TABLE II—continued

Purified IgG samples	IGHG gene	Observed proteotypic peptides	m/z	z	Ox	Scoremax	Position	Corresponding IGHG alleles	Attributable IGHG allele combinations
PA42	IGHG1	R.EEQFNSTYR.V	587.26	2	N	30	CH2 83-85	all IGHG4	
		R.EPQVYTLPPSQQEEMTK.N	938.95	2	N	51	CH3 1.1-17	all IGHG4	
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQK.S	915.75	3	N	61	CH3 95-120	all IGHG4	
		K.GPSVFLAPSSK.S	593.83	2	N	64	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
		K.THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKP.K.D	910.81	3	N	60	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVK.F	1041.50	2	N	84	CH2 17-39	all IGHG1	
		R.EEQYNSTYR.V	595.26	2	N	30	CH2 83-85	all IGHG1	
		K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L	937.46	2	N	64	CH3 79-89	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	935.94	4	N	74	CH2 17-80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*06 /
		K.GFYPSDISVWESWNGQPENNYK.T	1280.57	2	N	53	CH3 26-80	IGHG2*06	IGHG2*01*03*04*05*06
		K.TPLGDTTHTCPR.C	649.81	2	N	75	H1 3-16	all IGHG3	IGHG3*01*02*04 to *12 /
		K.SCDTTPPCPR.C	536.73	2	N	45	H2 H3 H4 3-14	all IGHG3	all IGHG3
PA45	IGHG1	R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFK.W	1179.02	2	N	81	CH2 17-41	all IGHG3	
		R.WQQGNFSCVMHEALHNRF	753.02	3	3/13	124	CH3 95-116	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG4*01*02*04 /
		K.YGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPPKP.K.D	943.81	3	N	73	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	933.69	4	N	76	CH2 17-80	all IGHG4	
		R.EPQVYTLPPSQQEEMTK.N	938.95	2	N	53	CH3 1.1-17	all IGHG4	
		K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L	951.47	2	N	46	CH3 79-89	all IGHG4 except IGHG4*03	
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQK.S	915.75	3	3/9	70	CH3 95-120	all IGHG4	
		K.GPSVFLAPSSK.S	593.83	2	N	64	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
		K.THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKP.K.D	910.81	3	N	64	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVK.F	1041.51	2	N	89	CH2 17-39	all IGHG1	
		R.EEQYNSTYR.V	595.26	2	N	40	CH2 83-85	all IGHG1	
		R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E ^d	904.50	2	N	68	CH2 85.1-101	all IGHG1	
PA48	IGHG2	K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L	937.46	2	N	60	CH3 79-89	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	935.94	4	N	62	CH2 17-80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*01*03*04*05*06 /
		K.TPLGDTTHTCPR.C	649.81	2	N	81	H1 3-16	all IGHG3	IGHG2*01*03*04*05*06 /
		K.SCDTTPPCPR.C	536.73	2	N	45	H2 H3 H4 3-14	all IGHG3	IGHG3*01*02*04 to *12 /
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFK.W	1179.07	2	N	75	CH2 17-41	all IGHG3	all IGHG3
		R.WQQGNFSCVMHEALHNRF	1129.03	2	2/8	82	CH3 95-116	IGHG3*01*02*04 to *12	
		K.YGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPPKP.K.D	943.81	3	N	51	H 3-CH2 13	all IGHG4	IGHG4*01*02*04 /
		R.EPQVYTLPPSQQEEMTK.N	938.95	2	N	50	CH3 1.1-17	all IGHG4	all IGHG4
		K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L	951.47	2	N	60	CH3 79-89	all IGHG4 except IGHG4*03	
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQK.S	915.75	3	N	52	CH3 95-120	all IGHG4	
		K.GPSVFLAPSSK.S	593.83	2	N	67	CH1 1.1-13	all IGHG1	all IGHG1 /
		K.THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKP.K.D	910.81	3	N	63	H 7-CH2 13	all IGHG1	all IGHG1
PA48	IGHG2	R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVK.F	1041.50	2	N	88	CH2 17-39	all IGHG1	
		K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L ^a	937.46	2	N	45	CH3 79-89	all IGHG1	
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	1247.59	3	N	72	CH2 17-80	all IGHG2 except IGHG2*02	IGHG2*01*03*04*05*06 /
		R.EEQFNSTFR.V ^b	579.27	2	N	25	CH2 83-85	all IGHG2	all IGHG2
		R.VVSVLTVHQDWLNGK.E	897.50	2	N	75	CH2 85.1-101	all IGHG2	
		K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L ^c	953.45	2	1/4	50	CH3 79-89	all IGHG2	
		K.TPLGDTTHTCPR.C	649.81	2	N	94	H1 3-16	all IGHG3	IGHG3*03 /
		K.SCDTTPPCPR.C	536.73	2	N	45	H2 H3 H4 3-14	all IGHG3	all IGHG3
		R.TPEVTCVWVDVSHEDPEVQFK.W	1179.07	2	N	81	CH2 17-41	all IGHG3	
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNRF	1122.50	2	4/11	110	CH3 95-116	IGHG3*03	

TABLE II—continued

Purified IgG samples	IGHG gene	Observed proteotypic peptides	m/z	z	Ox	Scoremax	Position	Corresponding IGHG alleles	Attributable IGHG allele combinations
	IGHG4	K.YGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPKPK.D	943.81	3	N	64	H 3-CH2 13	all IGHG4	all IGHG4 /
		R.TPEVTCVWVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK.T	933.69	4	N	66	CH2 17-80	all IGHG4	all IGHG4
		R.EPQVYTLPPSQEEMTK.N	938.95	2	N	53	CH3 1.1-17	all IGHG4	
		R.WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQK.S	1373.12	2	N	59	CH3 95-120	all IGHG4	

^a peptide CH3 79-89 attributed to all IGHG1 alleles and not to IGHG4*03 also proposed in subsets (not considered in the deduction strategy).

^b peptide CH2 83-85 attributed to all IGHG2 alleles and not to IGHG3*11 and IGHG3*12 also proposed in subsets (not considered in the deduction strategy).

^c peptide CH3 79-89 attributed to IGHG2*01*03*04*05*06 group of alleles and not to IGHG3*06, IGHG3*07, IGHG3*13 or IGHG3*15 alleles proposed in subsets (not considered in the deduction strategy).

^d peptide CH2 85.1-101 attributed to all IGHG1 alleles and not to IGHG4 (all alleles except IGHG4*02) or IGHG3 (all alleles except IGHG3*09) proposed in subsets (not considered in the deduction strategy).

serology and proteomics. Strikingly, only one discrepancy could be noted between proteomics and genomics regarding the IGHG3*01*04*05*10 nucleotide allele which was not identified neither by serology (deduction of homozygous IGHG3*17) nor proteomics (deduction of heterozygous IGHG3*03/IGHG3*17*18*19, as shown by MS/MS fragmentation spectra of the supplemental Fig. S1).

IGHG4—Regarding IGHG4 alleles, only proteomics and genomics could be compared: as for IGHG2 above, results were concordant, with a greater accuracy afforded by the genomic sequencing, which allowed identification of IGHG4*01, IGHG4*04, or IGHG4*01*04. Again, here two new IGHG4 AA alleles (one for AS50 and PA16 and another for PA07) resulting from three nonsynonymous substitutions were uncovered by both techniques.

IGHG AA Alleles Deduced from Mass Spectrometry Analysis Using Sample-specific Databases—Molecular analysis allowed the identification of novel IGHG2 (6) (Table III and supplemental Table S5) and IGHG4 (4) (Table V and supplemental Table S6) nucleotide sequences, and among them, 1 IGHG2 and 2 IGHG4 sequences were associated with a total of four AA changes. As the previous Mascot searches could only match known sequences, we compiled a sample-specific database with the aim to perform the Mascot query again for checking the presence of putatively four new trypsin-cut peptides in the purified IgG samples. The same conditions as already described earlier were used, except that query results considered sets, same sets but also subsets of peptides. The use of the SwissProt *Homo sapiens* FASTA database from ExPasy was kept to match all nonrelevant proteins that were co-purified, thus preventing an increase of false positive matching. The transcribed R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E peptide (CH2 85.1-101, V92>L) was assigned to an IGHG2 subset by Mascot following analysis of purified IgG from the PA01 sample. This observation was striking as this peptide is usually found on all IGHG1, all IGHG3 (except IGHG3*09) and all IGHG4 (except IGHG4*02) peptide alleles but never on IGHG2. Similarly, in the case of AS50 and PA16 samples, the transcribed R.EPQVYTLPPSR.E peptide (CH3 1.1-11, Q11>R) was assigned to an IGHG4 set of peptides whereas this peptide is usually exclusive of IGHG1, IGHG2, and IGHG3 peptide alleles. A potentially new IGHG4 peptide, K.VSHK.G (CH2 106-108, N108>H), never referenced among IGHG sequences, was too small to be seen by MS because of the tryptic cleavage specificity, from the AS50, PA07 and PA16 samples. It was not the case of the transcribed R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E peptide (CH2 85.1-101, V91>I), never referenced among IGHG sequences, that Mascot observed and assigned to an IGHG4 set of peptides for purified IgG from both AS50 and PA16 samples, and not in PA07 where it was also expected.

In order to check the accuracy of these last results, a final analysis consisted for each sample in a Mascot query among pooled IMGT®, SwissProt and sample-specific databases.

TABLE III
IGHG2 AA alleles deduced from genomic sequencing of the CH2 and CH3-CHS exons. As IGHG2 is encoded on chromosome 14 (14q 32.3), two IGHG2 alleles are expressed per sample. Amino acid changes not referenced in IMGT® are mentioned in bold

DNA samples	Nt substitutions and AA changes with reference to IGHG2*01 (J00230)		AA EU ^b	Genomic IMGT IGHG2 alleles determined	IGHG2 AA alleles deduced
	Nt IMGT ^a	AA IMGT ^a			
AS50	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
NP49	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
PA01	CH2 t273>c; CH3 a243>g	CH2 V91; CH3 T81	CH2 V308 =; CH3 T394 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
	CH2 t273>c; g274>c; CH3 a243>g	CH2 V91; V92>L ; CH3 T81	CH2 V308 =; V309L ; CH3 T394 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
PA07	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
	CH2 t273>c	CH2 V91	CH2 V308 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
PA09	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
	CH2 t273>c	CH2 V91	CH2 V308 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
PA16	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
	CH2 t273>c	CH2 V91	CH2 V308 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
PA31	CH2 t273>c	CH2 V91	CH2 V308 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
	CH2 c105>t, t273>c; CH3 a243>g, g1173>a	CH2 P35, V91; CH3 T81, T117	CH2 P271 =, V308 =; CH3 T394 =, T437 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
PA42	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
	CH2 t273>c; CH3 g112>t, g1173>a	CH2 V91; CH3 A38>S, T117	CH2 V308 =; CH3 A378S, T437 =	IGHG2*06	IGHG2*06
PA45	CH2 t273>c; CH3 a243>g	CH2 V91; CH3 T81	CH2 V308 =; CH3 T394 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
	CH2 t273>c; CH3 a243>g, g1173>a	CH2 V91; CH3 T81, T117	CH2 V308 =; CH3 T394 =, T437 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
PA48	CH2 t273>c	CH2 V91	CH2 V308 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05
	CH2 t273>c	CH2 V91	CH2 V308 =	not referenced	IGHG2*01*03*04*05

^a Nomenclature according to the IMGT unique numbering for C-DOMAIN (2, 25) and IMGT Allele alignment *Homo sapiens* IGHG2 (<http://www.imgt.org/IMG/Repertoire/Proteins/alleles/index.php?species=Homo%20sapiens&group=IGHC&gene=IGHG2>).

^b Nomenclature adapted from Human Genome Variation Society (www.hgvs.org) and (29); amino acid (AA) EU numbering according to IMGT® www.imgt.org (23).

TABLE IV
IGHG3 AA alleles deduced from genomic sequencing of the CH2 and CH3-CHS exons. As IGHG3 is encoded on chromosome 14 (14q 32.3), two IGHG3 alleles are expressed per sample

DNA samples	Nit substitutions and AA changes with reference to IGHG3*01 (X03604)		AA EU ^b	Genomic IGHG3 alleles determined	IGHG3 AA alleles deduced
	Nit IMGT ^a	AA IMGT ^a			
AS50	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03
NP49	CH3 c237>g, g243>a, c292>g	CH3 N79>K, T81, Q98>E	CH3 N392K, T394 =, Q419E	IGHG3*13	IGHG3*13
	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03
PA01	-	-	-	IGHG3*01*04*05*10	IGHG3*01*04*05*10
	-	-	-	IGHG3*01*04*05*10	IGHG3*01*04*05*10
PA07	CH3 c237>g, g243>a, c292>g	CH3 N79>K, T81, Q98>E	CH3 N392K, T394 =, Q419E	IGHG3*13	IGHG3*13
PA09	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03
PA16	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03
PA31	CH3 c237>g, g243>a, c292>g	CH3 N79>K, T81, Q98>E	CH3 N392K, T394 =, Q419E	IGHG3*13	IGHG3*13
	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03
	CH3 g115>a, c237>g, a250>g, g344>a, t347>a	CH3 V39>M, N79>K, M84>V, R115>H, F116>Y	CH3 V379M, N392K, M397V, R435H, F436Y	IGHG3*17	IGHG3*17
PA42	-	-	-	IGHG3*01*04*05*10	IGHG3*01*04*05*10
PA45	-	-	-	IGHG3*01*04*05*10	IGHG3*01*04*05*10
PA48	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03
	CH3 a250>g, a263>g, c267>a, c292>g, c300>t, a301>g	CH3 M84>V, K88>R, L89, Q98>E, N100, I101>V	CH3 M397V, K409R, L410 =, Q419E, N421 =, I422V	IGHG3*03	IGHG3*03

^a Nomenclature according to the IMGT unique numbering for C-DOMAIN (2, 25) and IMGT Allele alignment *Homo sapiens* IGHG3 (<http://www.imgt.org/IMGTRepertoire/Proteins/alleles/index.php?species=Homo%20sapiens&group=IGHG3&gene=IGHG3>).

^b Nomenclature adapted from Human Genome Variation Society (www.hgvs.org) and (29); amino acid (AA) EU numbering according to IMGT® www.imgt.org (23).

TABLE V
IGHG4 AA alleles deduced from genomic sequencing of the CH2 and CH3-CHS exons. As IGHG4 is encoded on chromosome 14 (14q 32.3), two IGHG4 alleles are expressed per sample. Amino acid changes not referenced in IMGT® are mentioned in bold

DNA samples	Nt substitutions and AA changes with reference to IGHG4*01 (K01316)		AA IMGT ^a	AA EU ^b		Genomic IMGT IGHG4 alleles determined	IGHG4 AA alleles deduced
	Nt IMGT ^a						
AS50	CH3 a267>c CH2 g271>a, a322>c; CH3 a32>g, g243>a, a267>c	CH3 L89 CH2 V91>I, N108>H; CH3 Q11>R, T81, L89	CH3 L410 = CH2 V308I, N325H; CH3 Q355R, T394 =, L410 =	IGHG4*04 not referenced	IGHG4*04 IGHG4*V91>I;N108>H;Q11>R]		
NP49	CH3 a267>c	CH3 L89	CH3 L410 =	IGHG4*04	IGHG4*04		
PA01	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		
PA07	CH2 g3.4>a, t42>c	CH2 E1.4, T14	CH2 E233 =, T250 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH2 g271>a, a322>c; CH3 a267>c	CH2 V91>I, N108>H; CH3 L89	CH2 V308I, N325H; CH3 L410 =	not referenced	IGHG4*V91>I;N108>H]		
PA09	CH2 g3.4>a, t42>c	CH2 E1.4, T14	CH2 E233 =, T250 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH3 a267>c	CH3 L89	CH3 L410 =	IGHG4*04	IGHG4*04		
PA16	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH2 g271>a, a322>c; CH3 a32>g, g243>a, a267>c	CH2 V91>I, N108>H; CH3 Q11>R, T81, L89	CH2 V308I, N325H; CH3 Q355R, T394 =, L410 =	not referenced	IGHG4*V91>I;N108>H;Q11>R]		
PA31	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH3 a267>c	CH3 L89	CH3 L410 =	IGHG4*04	IGHG4*04		
PA42	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH3 a267>c	CH3 L89	CH3 L410 =	IGHG4*01	IGHG4*01		
PA45	-	-	-	IGHG4*04	IGHG4*04		
	-	-	-	IGHG4*01	IGHG4*01		
PA48	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		
	CH2 g3.4>a	CH2 E1.4	CH2 E233 =	not referenced	IGHG4*01*04		

^a Nomenclature according to the IMGT unique numbering for C-DOMAIN (2, 25) and IMGT Allele alignment *Homo sapiens* IGHG4 (<http://www.imgt.org/IMGTRepertoire/Proteins/alleles/index.php?species=Homo%20sapiens&group=IGHC&gene=IGHG4>).

^b Nomenclature adapted from Human Genome Variation Society (www.hgvs.org) and (29); amino acid (AA) EU numbering according to IMGT® www.imgt.org (23).

TABLE VI

Confrontation of serological, proteomic and genomic approaches for IGHG3 allele deduction or determination. As IGHG3 is encoded on chromosome 14 (14q 32.3), two IGHG3 alleles are expressed for each sample

Samples ^a	Combination of IGHG3 alleles according to the method			Discordances between methods ^b		
	Serology (Ser)	Proteomics (Pro)	Genomics (Gen)	Ser vs. Pro	Ser vs. Gen	Pro vs. Gen
AS50	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	IGHG3*03	IGHG3*03	X	X	
	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	IGHG3*13	IGHG3*13	X	X	
NP49	IGHG3*17	IGHG3*03	IGHG3*03	X	X	
	IGHG3*17	IGHG3*17*18*19	IGHG3*01*04*05*10		X	X
PA01	IGHG3*17	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10	X	X	
	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10			
PA07	IGHG3*13	IGHG3*13	IGHG3*13			
	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10			
PA09	IGHG3*03	IGHG3*03	IGHG3*03			
	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10			
PA16	IGHG3*13	IGHG3*03	IGHG3*03	X	X	
	IGHG3*13	IGHG3*13	IGHG3*13			
PA31	IGHG3*03	IGHG3*03	IGHG3*03			
	IGHG3*17	IGHG3*17*18*19	IGHG3*17			
PA42	IGHG3*13	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10	X	X	
	IGHG3*17	all IGHG3	IGHG3*01*04*05*10		X	
PA45	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10			
	IGHG3*01*05*06*07*09*10*11*12	all IGHG3	IGHG3*01*04*05*10			
PA48	IGHG3*03	IGHG3*03	IGHG3*03			
	IGHG3*03	all IGHG3	IGHG3*03			

^a Individual samples consisted in plasma (serology), purified IgG (proteomics) or genomic DNA (genomics).

^b Discordances between methods are mentioned by "X".

The same relevant unexpected (PA01 sample: R.VSVLTVL-HQDWLNGK.E, IGHG2 CH2 85.1–101, V92>L, subset level; AS50 and PA16 samples: R.EPQVYTLPPSR.E, IGHG4 CH3 1.1–11, Q11>R, set level) or at yet undescribed (AS50 and PA16 samples: R.VSVLTVL/HQDWLNGK.E, IGHG4 CH2 85.1–101, V91>I, set level) peptides were identified unambiguously (supplemental Fig. S2).

DISCUSSION

The present study was carried in an attempt to check with another technique the adequacy of bottom-up mass spectrometry for the identification of the IGHG allelic diversity. Therefore, a nucleotide sequencing of the CH2 and CH3-CHS domains, which concentrate the allelic diversity corresponding to the Fc fragment of the IG heavy gamma chain, was undertaken among DNA samples from ten individuals, and results were compared with those obtained in the corresponding sera by a hemagglutination inhibition method as well as in the corresponding purified IgG by bottom-up MS. For IGHG3, the highest concordance was found between proteomics under nonambiguous conditions and genomics (19 identical alleles/groups of alleles out of 20) whereas identical results were found in only 14 and 12 out of 20 alleles when comparing serology *versus* proteomics and serology *versus* genomics, respectively (Table VI). Moreover, the sequencing of the IGHG among these samples originating from Beninese individuals led to the identification of 6 IGHG2 and 4 IGHG4 nucleotide sequences not yet described. When translated, two of these sequences led to 2 putative IGHG peptides not yet described and assigned to IGHG4 by Mas-

cot, that were R.VSVLTVL/HQDWLNGK.E (CH2 85.1–101, V91>I) and K.VSHK.G (CH2 106–108, N108>H). By means of proteogenomics, R.VSVLTVL/HQDWLNGK.E was identified in the genomically modified set peptide group of the Mascot analysis for 2 (AS50 and PA16) out of 3 samples where this peptide was expected. Regarding this last peptide, a sequence alignment performed by a BLAST search on NCBI@ database (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) did not identify any referenced peptide allowing 100% sequence cover: whatever the aligned peptide, the amino acid at position 308 of CH2 85.1–101 is always V instead of I. As the monoisotopic mass difference of 14.015650 Da between V and I is exactly the same as a methylation (UniMod, <http://www.unimod.org/>, protein modifications for mass spectrometry), the possibility of an artifact was considered but immediately ruled out for two reasons: (1) valine is a neutral amino acid not subject to methylation and (2) in both AS50 and PA16 samples, the MS/MS fragmentation reported y and or b fragments circumscribing exactly the residues of interest (supplemental Fig. S2). An experimental proof would consist in the addition to the test sample before injection of an identical synthetic peptide harboring a CH2 85.1–101, V91>I substitution, in order to compare the m/z and retention time values of endogenous *versus* synthetic peptides. Similarly, deamidation of Asn (N) or Gln (Q) as possible amino acids modifications were not considered in the Mascot queries to avoid erroneous appearance of irrelevant allele sequences in the Mascot results. The sample preparation and handling methods must therefore avoid

the conditions of appearance of such particularly misleading artefactual modifications (30, 31).

To summarize, proteomic and genomic results were highly concordant for all IGHG sequences, with the pointing of defined AA changes suggestive of new IGHG2 and/or IGHG4 peptide sequences. For IGHG3, genomic results always consolidated proteomic ones except in one case (Table VI). It concerned the NP49 sample issued from a 6-year old boy hospitalized at Cotonou (Benin) for cerebral malaria combined with clinically diagnosed anemia. As blood transfusion is currently used in African developing countries to prevent worsening of the malaria pathology (32), it is plausible that the IGHG3*17/IGHG3*17*18*19 detected by serology/proteomics may originate from a donor's IgG3 circulating in the blood of the NP49 recipient. The other discordances recorded between IGHG3 alleles deduced by serology *versus* proteomics or genomics may be attributable to the following reasons. First, IGHG3 alleles are encoded by codominant genes (4), but in case of heterozygous carriage, it is plausible that one allele may be expressed more abundantly than the other, as already shown for IGHG1 alleles (33), leading to its only detection by serology, such as may be the case for the PA16 sample, where the IGHG3*13 production may exceed that of IGHG3*03 (found by MS and not by hemagglutination inhibition). In some other cases (PA01 and PA42) the serological attribution of IGHG3*17 seems unlikely because absent from both MS and molecular deductions. It must be kept in mind that IGHG3*17 results from the G3m10,11,13,15,27 combination of Gm allotypes and differs from IGHG3*01 and related alleles from the G3m5*, by a concomitant presence of G3m15 and absence of G3m5 and G3m14 allotypes. It can be argued that the difficulty of obtaining well characterized reagent monoclonal antibodies may lead to unstable agglutinates (we used polyclonal reagents coming from blood donors) (34). Among other possible explanations for discrepancies between serological and proteomic/genomic results, are the access to plasma (containing fibrinogen) rather than serum, combined to availability of limited plasma volumes (implying dilutions), that hampered an optimal realization of the hemagglutination inhibition method. However, an eventual depletion in IgG bearing particular IGHG3 alleles during IgG purification on Protein-G column was not an option, as in any case among the results presented here (Table VI) was an IGHG3 allele found by both serology and genomics and not by proteomics.

The excellent correlation between proteomic and genomic results was partly inherent to the analysis setting used in Mascot, where removing dynamic parameters such as missed cleavages, methionine oxidation and especially deamidation of N or Q prevented a misclassification of alleles linked for example to the identification of the proteotypic peptide R.WQEGNIFSCSVMHEALHNR.F (peptide signature of IGHG3*13) instead of R.WQQGNIFSCSVMHEALHNR.F (peptide signature of IGHG3*01*02*04 to *12). Nonetheless,

these precautions did not prevent a mismatch of short peptide sequences (averaging 20 AA) during the probabilistic reconstitution by Mascot of the polypeptide (more than 200 AA) that covers the CH2 and CH3-CHS domains of the Fc fragment. For example, a misalignment by Mascot of K.PREEQYNSTYR.V and R.WQQGNIFSCSVMHEALHNYTQK.S may lead to identification of IGHG1*04 whereas the second peptide may also be relevant to IGHG3*17 or IGHG3*18*19 alleles when associated with other short discriminatory peptides all present in the mixture resulting from the trypsin digestion of purified IgG from the four IgG subclasses.

A methodological effort of simplification would consist in performing a specific enzymatic cleavage of all Fc/2 fragments by a cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* (*deS*) (35). This enzyme, combined to PNGase F for the hydrolysis of all glycans attached on IgG heavy chain and subject to inter- and intraindividual variations (36), generates polypeptide fragments of about 24 kDa (211 AA) concentrating all possible polymorphic AA combinations on the IGHG CH2 and CH3-CHS domains. This results in 21 possible Fc/2 peptides differing by at least 1 Da which could be analyzed using a middle-down MS strategy (37, 38). This new technology that combines aspects of top-down (intact protein) and bottom-up (enzymatic proteolysis) strategies aims to achieve both high resolution and high mass accuracy (39). It presents the advantage of minimizing wrong assignment to a particular AA IGHG allele which could result from erroneous combinations of small peptides when using the bottom-up process. Moreover, as the identification of one IGHG allele will resume in the characterization of one polypeptide, it is conceivable that the discriminatory peptides under analysis will be more frequent than when dissected by trypsin into small peptides necessitating a probabilistic reconstitution in a single sequence (40).

In the context of the present study, a middle-down MS approach would have allowed to assign VVSVLTVLHQD-WLNGK (CH2 85.1–101, V92>L) to IGHG2 (sample PA01) as well as EPQVYTLPPSR to IGHG4 (samples AS50 and PA16) by identifying these infrequent sequences within a polypeptide harboring other IGHG2 or IGHG4 AA signatures, respectively. It would also have been possible to make analyzable the short VSHK (CH2 106–108, N108>H) new peptide assignable to IGHG4 (samples AS50, PA07 and PA16). Lastly, despite very high sequence percentage of identity, there is no formal proof that the newly identified R.VVSVLT/LHQD-WLNGK.E (CH2 85.1–101, V91>I) peptide originates from an IGHG4 polypeptide sequence. Indeed, the preparative treatment of plasma samples using Protein G columns led more to IgG enrichment than to an exclusive IgG purification, and middle-down MS could refute the very low probability for this peptide to belong to a residual plasma protein bearing an unknown to date amino acid polymorphism. In fact, the advent of middle-down MS combined to proteogenomics will contribute to move forward an increasingly detailed descrip-

tion of the Fc fragment diversity, in support of demonstrations like the one presented here.


In conclusion, this study confirms the reliability of the MS approach for investigating the IGHG AA diversity under stringent conditions of analysis, and brings new molecular tools adapted to a fast screening of this diversity. Many applications can result from an accurate determination of these polymorphisms, such as the full validation of therapeutic antibody sequences whose technology is booming (41). Another promising application would consist in the diagnosis of congenital infections in neonates by a differential detection of maternal and fetal IgG on the basis of the IGHG individual diversity (16, 17). Work is underway in our laboratory to apply the middle-down MS approach to polymorphic Fc/2 fragments obtained after complete isolation of parasite-specific IgG from neonates suspected of congenital toxoplasmosis or Chagas disease. If successful, this new way to neonatal serological diagnosis using proteomics could also benefit to congenital infections of bacterial or viral origin.

Acknowledgments—We thank the participating children and their families. We are grateful to Evelyne Guitard (UMR 5288, CNRS, Université Paul Sabatier Toulouse III, France) for technical advice.

DATA AVAILABILITY

The newly described IGHG2 nucleotide sequences have been deposited in the GenBank database under GEDI (GenBank/ENA/DDBJ/IMG/IMG-DB) Accession Numbers KX670549 to KX670554, sequences KX670550 and KX670551 differing in the intron. Similarly, the newly described IGHG4 exon nucleotide sequences have been deposited in the GenBank database under GEDI Accession Numbers KX670555 to KX670558. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (42) partner repository with the dataset identifier PXD005021.

* This work was supported by DVS-Maturation-IRD grant DVS-2012. A PhD scholarship was awarded to Alexandra Emmanuel by the Quisqueya University, Port-au-Prince, Haiti. The authors have declared that no competing interests exist.

 This article contains [supplemental material](#).

^a To whom correspondence should be addressed: IRD UMR 216, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. Tel.: +33 1 70 64 94 34; Fax: 33 1 53 73 96 17; E-mail: florence.migot-nabias@ird.fr.

^b Current address: Global Health and Infectious Diseases, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio.

REFERENCES

- Lefranc, M. P., and Lefranc, G. (2001) *The Immunoglobulin Factsbook*, pp. 1–458, Academic Press, London, UK
- Lefranc, M. P. (2014) Immunoglobulin (IG) and T cell receptor genes (TR): IMGT® and the birth and rise of immunoinformatics. *Front. Immunol.* **5**, 22
- Lefranc, M. P., Giudicelli, V., Duroux, P., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Aouinti, S., Carillon, E., Duvergey, H., Houles, A., Paysan-Lafosse, T., Hadi-Saljoqi, S., Sasorith, S., Lefranc, G., and Kossida, S. (2015) IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res.* **43**, D413–D422
- Lefranc, M. P., and Lefranc, G. (2012) Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. *Methods Mol. Biol.* **882**, 635–680
- Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M. P. (2005) IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* **33**, D256–D261
- Jefferis, R., and Lefranc, M. P. (2009) Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs* **1**, 332–338
- Magdelaine-Beuzelin, C., Vermeire, S., Goodall, M., Baert, F., Noman, M., Assche, G. V., Ohresser, M., Degenne, D., Dugoujon, J.-M., Jefferis, R., Rutgeerts, P., Lefranc, M. P., and Watier, H. (2009) IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab. *Pharmacogenet. Genomics* **19**, 383–387
- Beck, A., Wagner-Roussel, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A., and Sanglier-Cianféran, S. (2013) Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal. Chem.* **85**, 715–736
- Ward, E. S., and Ober, R. J. (2009) Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv. Immunol.* **103**, 77–115
- Stapleton, N. M., Einarsdóttir, H. K., Stemerding, A. M., and Vidarsson, G. (2015) The multiple facets of FcRn in immunity. *Immunol. Rev.* **268**, 253–268
- Jefferis, R. (2012) Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Arch. Biochem. Biophys.* **526**, 159–166
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., and Carneiro-Sampaio, M. (2012) IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* :985646, 2012
- Carlier, Y., Truyens, C., Deloron, P., and Peyron, F. (2012) Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop.* **121**, 55–70
- Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O., and Buekens, P. (2015) Congenital Chagas disease: an update. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 363–368
- Villard, O., Cimon, B., L'Ollivier, C., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., and Candolfi, E. (2016) Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **84**, 22–33
- Migot-Nabias, F., Dechavanne, C., Guillonnet, F., Dugoujon, J. M., and Lefranc, M. P. (2014) Method of neonatal serological diagnosis. Patents FR 11 57296. (2011), PCT/EP2012065737. (2012), WO2013021057. (2013) and US2014178916A1
- Dechavanne, C., Guillonnet, F., Chiappetta, G., Sago, L., Lévy, P., Salnot, V., Guitard, E., Ehrenmann, F., Broussard, C., Chafey, P., Le Port, A., Vinh, J., Mayeux, P., Dugoujon, J. M., Lefranc, M. P., and Migot-Nabias, F. (2012) Mass spectrometry detection of G3m and IGHG3 alleles and follow-up of differential mother and neonate IgG3. *PLoS ONE* **7**, e46097
- Migot-Nabias, F., Noukpo, J. M., Guitard, E., Doritchamou, J., Garcia, A., and Dugoujon, J. M. (2008) Imbalanced distribution of GM immunoglobulin allotypes according to the clinical presentation of *Plasmodium falciparum* malaria in Beninese children. *J. Infect. Dis.* **198**, 1892–1895
- Dard, P., Lefranc, M.-P., Osipova, L., and Sanchez-Mazas, A. (2001) DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur. J. Hum. Genet.* **9**, 765–772
- Brucato, N., Cassar, O., Tonasso, L., Tortevoeye, P., Migot-Nabias, F., Planoulaine, S., Guitard, E., Larrouy, G., Gessain, A., and Dugoujon, J. M. (2010) The imprint of the Slave Trade in an African American population: mitochondrial DNA, Y chromosome and HTLV-1 analysis in the Noir Marron of French Guiana. *BMC Evol. Biol.* **10**, 314
- Field, L. L., and Dugoujon, J. M. (1989) Immunoglobulin allotyping (Gm, Km) of GAW5 families. *Genet. Epidemiol.* **6**, 31–33
- van Loghem, E., de Lange, G., van Leeuwen, A. M., van Eede, P. H., Nijenhuis, L. E., Lefranc, M. P., and Lefranc, G. (1982) Human IgG allotypes co-occurring in more than one IgG subclass. *Vox Sang.* **43**, 301–309
- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., and Waxdal, M. J. (1969) The covalent structure of an entire

- gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **63**, 78–85
24. Giudicelli, V., Duroux, P., Ginestoux, C., Folch, G., Jabado-Michaloud, J., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2006) IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, D781–D784
 25. Lefranc, M.-P., Pommié, C., Kaas, Q., Duprat, E., Bosc, N., Guiraudou, D., Jean, C., Ruiz, M., Da Piédade, I., Rouard, M., Foulquier, E., Thouvenin, V., and Lefranc, G. (2005) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 185–203
 26. Hernandez, C., Waridel, P., and Quadroni, M. (2014) Database construction and peptide identification strategies for proteogenomic studies on sequenced genomes. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 425–434
 27. Nesvizhskii, A. I. (2014) Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nat. Methods* **11**, 1114–1125
 28. Dugoujon, J.-M., Hazout, S., Loirat, F., Mourrieras, B., Crouau-Roy, B., and Sanchez-Mazas, A. (2004) GM haplotype diversity of 82 populations over the world suggests a centrifugal model of human migrations. *Am. J. Phys. Anthropol.* **125**, 175–192
 29. den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E., and Taschner, P. E. (2016) HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. *Hum. Mutat.* **37**, 564–569
 30. Sinha, S., Zhang, L., Duan, S., Williams, T. D., Vlasak, J., Ionescu, R., and Topp, E. M. (2009) Effect of protein structure on deamidation rate in the Fc fragment of an IgG1 monoclonal antibody. *Protein Sci.* **18**, 1573–1584
 31. Li, X., Cournoyer, J. J., Lin, C., and O'Connor, P. B. (2008) Use of 18O labels to monitor deamidation during protein and peptide sample processing. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **19**, 855–864
 32. Orish, V. N., Illechie, A., Combey, T., Onyeabor, O. S., Okorie, C., and Sanyaolu, A. O. (2016) Evaluation of blood transfusions in anemic children in Effia Nkwanta Regional Hospital, Sekondi-Takoradi, Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **94**, 691–694
 33. Goetze, A. M., Zhang, Z., Liu, L., Jacobsen, F. W., and Flynn, G. C. (2011) Rapid LC-MS screening for IgG Fc modifications and allelic variants in blood. *Mol. Immunol.* **49**, 338–352
 34. Jefferis, R., Reimer, C. B., Skvaril, F., de Lange, G. G., Goodall, D. M., Bentley, T. L., Phillips, D. J., Vlug, A., Harada, S., Radl, J., Claassen, E., Boersma, J. A., and Coolen, J. (1992) Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* **31**, 143–168
 35. Vincents, B., von Pawel-Rammigen, U., Björck, L., and Abrahamson, M. (2004) Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding. *Biochemistry* **43**, 15540–15549
 36. Pucić, M., Knezević, A., Vidic, J., Adamczyk, B., Novokmet, M., Polasek, O., Gornik, O., Supraha-Goreta, S., Wormald, M. R., Redzić, I., Campbell, H., Wright, A., Hastie, N. D., Wilson, J. F., Rudan, I., Wührer, M., Rudd, P. M., Josić, D., and Lauc, G. (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.010090
 37. Leblanc, Y., Romanin, M., Bihoreau, N., and Chevreux, G. (2014) LC-MS analysis of polyclonal IgGs using IdeS enzymatic proteolysis for oxidation monitoring. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **961**, 1–4
 38. He, X. A., Washburn, N., Arevalo, E., and Robblee, J. H. (2015) Analytical characterization of IgG Fc subclass variants through high-resolution separation combined with multiple LC-MS identification. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 7055–7066
 39. Tsiatsiani, L., and Heck, A. J. (2015) Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* **282**, 2612–2626
 40. Nesvizhskii, A. I., and Aebersold, R. (2005) Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1419–1440
 41. Resemann, A., Jabs, W., Wiechmann, A., Wagner, E., Colas, O., Evers, W., Belau, E., Vorwerk, L., Evans, C., Beck, A., and Suckau, D. (2016) Full validation of therapeutic antibody sequences by middle-up mass measurements and middle-down protein sequencing. *MAbs.* **8**, 318–330
 42. Vizcaino, J. A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q. W., Wang, R., and Hermjakob, H. (2016) 2016 update of the PRIDE database and related tools. *Nucleic Acids Res.* **44(D1)**, D447–D456

FIGURES LEGENDS

Supplemental Figure 1: MS/MS fragmentation of the peptides allowing assignment of two distinct IGHG3 AA alleles for the same NP49 sample

Left panel: MS/MS fragmentation of the tryptic peptide R.WQEGNVFSCSVMHEALHNR.F from the NP49 purified IgG sample and assignable to IGHG3*03, as listed in the Table 2; Right panel: MS/MS fragmentation of the tryptic peptide R.WQQGNIFSCSVMHEALHNHYTQK.S from the NP49 purified IgG sample and assignable to IGHG3*17*18*19, as listed in the Table 2.

Supplemental Figure 2: MS/MS fragmentation of a putatively new IGHG4 peptide identified in two distinct samples of purified IgG

Left panel: MS/MS fragmentation of the tryptic peptide R.VVSVLTILHQDWLNGK.E included in the amino acid sequence FMN|AS50|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410 from the AS50 purified IgG sample, as listed in the Supplemental Table S1; Right panel: MS/MS fragmentation of the tryptic peptide R.VVSVLTILHQDWLNGK.E included in the amino acid sequence FMN|PA16|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410 from the PA16 purified IgG sample, as listed in the Supplemental Table S1.

Supplemental Table S1: Database of IGHG CH2 and CH3-CHS amino acid sequences from the 10 patients included in the study (60 sequences; 13,004 amino acids)

>FMN|AS50|G1|02^a

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|AS50|G2|06

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|AS50|G3|03

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

>FMN|AS50|G3|13

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQEGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

>FMN|AS50|G4|04

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|AS50|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410^b (FMN_AS50_IGHG4*06_CH2_I91_CH2_H108_CH3_R11)^c

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSHKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|NP49|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|NP49|G2|06

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|NP49|G3|03

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

>FMN|NP49|G3|01040510^d

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

>FMN|NP49|G4|04

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|NP49|G4|0104|E233^e

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA01|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA01|G2|01030405|V308|T394

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA01|G2|V308|V309L|T394 (FMN_PA01_IGHG2*07_CH2_L92)^c

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA01|G3|01040510

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

>FMN|PA01|G4|0104|E233

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA01|G4|0104|E233|T250

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA07|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA07|G2|06

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA07|G2|01030405|V308

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA07|G3|01040510

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYNTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNRFTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA07|G3|13

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYKTTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNIFSCSV MHEALHNRFTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA07|G4|V308I|N325H|L410 (FMN_PA07_IGHG4*05_CH2_I91_CH2_H108) ^c

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSHKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA07|G4|0104|E233|T250

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G2|06

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G2|01030405|V308

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G3|03

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYNTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNRFTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G3|01040510

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYNTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNRFTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G4|04

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA09|G4|0104|E233

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA16|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA16|G2|06

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSALTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA16|G2|01030405|V308

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSALTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA16|G3|03

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSALTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPVLSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

>FMN|PA016|G3|13

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSALTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTPMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNIFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

>FMN|PA16|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410 (FMN_PA16_IGHG4*06_CH2_I91_CH2_H108_CH3_R11) ^c

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSHKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

>FMN|PA16|G4|0104|E233

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

>FMN|PA31|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA31|G2|01030405|V308

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSALTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA31|G2|01030405|P271|V308|T394|T437

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSALTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA31|G3|03

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSALTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPVLSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

>FMN|PA31|G3|17

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAMEWESSGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA31|G4|04

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA31|G4|0104|E233

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA42|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA42|G2|06

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA42|G3|01040510

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA42|G4|01

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA42|G4|04

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA45|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA45|G2|01030405|V308|T394

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA45|G2|01030405|V308|T394|T437

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>FMN|PA45|G3|01040510

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNRFQKLSLSLSPGK

>FMN|PA45|G4|01

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA48|G1|02

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA48|G2|01030405|V308

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

>FMN|PA48|G3|03

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYNTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFNCSVMHEALHNRFQKLSLSLSPGK

>FMN|PA48|G4|0104|E233

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFNCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

^a: “>”: FASTA format; “FMN”: origin; “|AS50|”: sample ID; “|G1|”: IG heavy chain type 1; “|02|”: IG heavy chain type-related AA allele already referenced in IMGT[®]. For each sample and each IG heavy chain, one to two AA alleles are mentioned according to the homozygous or heterozygous allele carriage, respectively.

^b: For an AA sequence which is not yet referenced in IMGT[®], each SAAV (with or without substitution) is mentioned between vertical bars, according to IMGT[®] (<http://www.imgt.org>) amino acid EU numbering (23).

^c: Novel IGHG2 and IGHG4 IMGT AA alleles identified in this study and approved by the IMGT Nomenclature committee (IMGT-NC).

^d: Combination of IGHG3*01, IGHG3*04, IGHG3*05 and IGHG3*10 alleles sharing the same AA sequence.

^e: AA sequence already referenced in IMGT[®] under IGHG4*01 or IGHG4*04 allele but whose nucleotide sequence carries synonymous variations at the codon corresponding to amino acid E233.

Supplemental Table S2: Nucleotide positions of the IGHG gene components from the hinge exon (and for IGHG3 from the most 3' hinge exon) to the CH3-CHS exons

Nt numbering	Hinge exon	Intron	CH2 exon	Intron	CH3-CHS exon
IMGT/LIGM-DB numbering ^a:					
IGHG1*01 (J00228)	892-936	937-1054	1055-1384	1385-1480	1481-1800
IGHG2*01 (J00230)	902-937	938-1055	1056-1382	1383-1479	1480-1799
IGHG3*01 (X03604)	1471-1515	1516-1633	1634-1963	1964-2060	2061-2380
IGHG4*01 (K01316)	900-935	936-1053	1054-1383	1384-1480	1481-1800
IMGT unique numbering for C-DOMAIN ^b:					
all IGHG	1-45 or 1-36 ^c		1.6-375		1.4-375 (1-6) ^d

The five IGHG gene components are represented in the 5'→3' direction, starting with the hinge exon (most 3' hinge exon (H4) for IGHG3*01) and ending with the CH3-CHS exon. Allele*01 of each IGHG is given with its accession number in IMGT/LIGM-DB reference sequence (24).

^a: The numbering position is according to IMGT/LIGM-DB (<http://www.imgt.org>) accession number.

^b: The numbering position is according to IMGT Scientific chart (2, 25).

^c: 1-45 for IGHG1*01 and for IGHG3*01 H4 hinge exon; 1-36 for IGHG2*01 and IGHG4*01.

^d: The numbering in brackets corresponds to CHS.

Supplemental Table S3: Validation of IGHG1, IGHG2, IGHG3 and IGHG4 gene amplification according to IGHG gene specific codons

IMGT Nt numbering ^c	AA numbering		Contigs ^a					Samples ^b				
	IMGT ^c	EU ^d	IGHG1	IGHG2	IGHG3	IGHG4	IGHGP	IGHG1	IGHG2	IGHG3	IGHG4	IGHGP ^e
CH2 exon			5 (5)	6 (8)	19 (57)	4 (4)						
1.6-3.6	1.6	231	gca	gca	gca	gca	aca					no aca
1.5-3.5	1.5	232	cct	cca	cct	cct	act		cca			no act
1.4-3.4	1.4	233	gaa	---	gaa	gag	gaa		---		gag^f	
1.3-3.3	1.3	234	ctc	cct	ctc	ttc	ccc		cct		ttc	no ccc
1.2-3.2	1.2	235	ctg	gtg	ctg	ctg	ctg		gtg			
1.1-3.1	1.1	236	ggg	gca	gga	ggg	ggg		gca	gga		
4-6	2	238	ccg	ccg	ccg	cca	ccg				cca	
16-18	6	242	ctc	ctc	ctc	ctg	ctc				ctg	
40-42	14	250	acc	acc	acc	act	acc				act^f	
43-45	15	251	ctc	ctc	ctt	ctc	ctc			ctt		
43.2-45.2	15.2	253	atc	atc	att	atc	atc			att		
64-66	22	260	aca	acg	acg	acg	acg	aca				
88-90	30	268	cac	cac	cac	cag	cac				cag	
118-120	40	276	aac	aac	aag	aac	aac			aag		
130-132	44	280	gac	gac	gac	gat	gac				gat	
244-246	82	291	ccg	cca	ccg	ccg	ccg		cca			
253.1-255.1	85.1	301	cg ^t /cg ^g ^g	cg ^t	cg ^t	cg ^t	cat					no cat
283-285	95	312	gac	gac	gac	gac	aac					no aac
292-294	98	315	aat	aac	aac	aac	aac	aat				
340-342	114	329	cca	cca	cca	ccg	cca				ccg	
343-345	115	330	gcc	gcc	gcc	tcc	gcc				tcc	
346-348	116	331	ccc	ccc	ccc	tcc	ccc				tcc	
CH3-CHS exons												
1-3	1	345	gaa	gaa	gaa	gag	gaa				gag	
34-36	12	356	gat/gag ^h	gag	gag	gag	aag					no aag
37-39	13	357	gag	gag	gag	gag	---					no deletion
58-60	20	364	agc	agc	agc	agc	acc					no acc
85-87	29	373	tat	tac	tac	tac	tac	tat				
112-114	38	378	gcc	gcc/tcc ⁱ	gcc	gcc	acc					no acc

250.4-252.4	84.4	401	gac	gac	gac	gac	aac		no aac
328-330	110	431	gct	gct	gct	gct	ggt		no ggt
373-375	125	445	ccg	ccg	ccg	ctg	ccg	ctg	

Number of alleles for each IGHG gene (and between parentheses number of sequences) is shown below the four IGHG functional genes (IMGT Alignments of alleles, IMGT Repertoire, <http://www.imgt.org>) (3); specific codons in bold.

^a : sequence compilations of 5 IGHG1, 6 IGHG2, 19 IGHG3, 4 IGHG4 and 2 IGHGP alleles according to IMGT[®] <http://www.imgt.org>.

^b : contigs results for the 10 samples under study (AS50, NP49, PA01, PA07, PA09, PA16, PA31, PA42, PA45 and PA48).

^c : Nucleotide (Nt) and amino acid (AA) numbering according to IMGT[®] <http://www.imgt.org>, IMGT unique numbering for C-DOMAIN (2, 25).

^d : amino acid EU numbering according to IMGT[®] <http://www.imgt.org> (23).

^e : verification of the absence of IGHGP amplification

^f : this specific codon was not validated in several cases (CH2 g3.4>a and CH2 t42>c), see Table 5 for more precisions.

^g : cgt for all IGHG1 except for IGHG1*01 (cgg).

^h : gat for all IGHG1 except for IGHG1*03 (gag).

ⁱ : gcc for all IGHG2 except for IGHG2*06 (tcc).

Supplemental Table S4: Decision tree reading for IGHG nucleotide sequences with the representation of the CH2 and CH3-CHS polymorphisms

IMGT	CH2 domain												CH3 domain												IGHG alleles									
	1.5	1.4	1.1	9	45.1	82	83	84.3	85.1	91	92	124	1.4	12	14	38	39	44	79	81	84	86	88	89		90	98	100	101	115	116	117	124	
EU index	232	233	236	245	282	291	292	296	301	308	309	339	341	356	358	378	379	384	392	394	397	407	409	410	411	419	421	422	435	436	437	444		
	P	-	A	P	M	P	R	F	R	V	V	T	G	E	M	A	V	N	K	T	M	Y	K	L	T	Q	N	V	H	Y	T	S	IGHG2*02	
	cca	---	gca	cca	atg	cca	cgg	ttc	cgt	gtc	gtg	acc	ggg	gag	atg	gcc	gtg	aat	aag	aca	atg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	gtc	cac	tac	aca	tct	IGHG2*06	
				└─									ggg	gag	atg	tcc	gtg	aat	aag	aca	atg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	gtc	cac	tac	aca	tct	IGHG2*01*03*04	
									└─				ggg	gag	atg	gcc	gtg	aat	aag	aca	atg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	gtc	cac	tac	aca	tct	IGHG2*05	
										└─										└─	acg	atg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	gtc	cac	tac	aca	tct	IGHG1*01
	P	E	G	P	V	P	R	Y	R	V	L	A	G	D	L	A	V	N	K	T	V	Y	K	L	T	Q	N	V	H	Y	T	S	IGHG1*03	
	cct	gaa	ggg	cca	gtg	cgg	cgg	tac	cgg	gtc	ctg	gcc	ggg	gat	ctg	gcc	gtg	aat	aag	acg	gtg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	gtc	cac	tac	acg	tct	IGHG1*04	
								└─					ggg	gat	atg	gcc	gtg	aat	aag	acg	gtg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	gtc	cac	tac	acg	tct	IGHG1*02	
													└─	gat	ctg	gcc	gtg	aat	aag	acg	gtg	tac	aag	ctc	acc	cag	aac	atc	cac	tac	acg	tct	IGHG1*05	
																											└─	V	H	Y	T	S	IGHG3*02	
																												└─	gtc	cac	tac	acg	tct	IGHG3*16
																																		IGHG3*15
																																		IGHG3*14
																																		IGHG3*18*19
																																		IGHG3*11*12
																																		IGHG3*09
																																		IGHG3*06*07
																																		IGHG3*17
																																		IGHG3*08
																																		IGHG3*13
																																		IGHG3*03
																																		IGHG3*01*04*05*10
	E	G	P	V	P	R	F	R	V	V	A	G	E	M	A	V	N	K	T	V	Y	R	L	T	E	N	V	H	Y	T	S	IGHG4*02		
	gag	ggg	cca	gtg	cgg	cgg	ttc	cgt	gtc	gtg	gcc	ggg	gag	atg	gcc	gtg	aat	aag	acg	gtg	tac	agg	cta	acc	gag	aac	gtc	cac	tac	acg	tct	IGHG4*03		
												G	E	M	A	V	N	K	T	V	Y	K	L	T	E	N	V	H	Y	T	S	IGHG4*01		
												ggg	gag	atg	gcc	gtg	aat	aag	acg	gtg	tac	agg	cta	acc	gag	aac	gtc	cac	tac	aca	tct	IGHG4*04		

Supplemental Table S5: Discriminatory nucleotide and/or AA positions along the alignment of *Homo sapiens* IGHG2 alleles, including the 5 (exon) IGHG2 novel alleles

GenBank Accession N°	IMGT allele name		IMGT UN ^a	CH1 exon					CH2 exon			CH3-CHS exon			
				19	82	92	95	96	35	45.1	91	92	38	81	117
J00230	IGHG2*01	F	AA gDNA	A gcc	P cca	P ccc	N aac	F ttc	P ccc	V gtg	V ggt	V gtg	A gcc	T aca	T acg
Z49802	IGHG2*01	F	AA gDNA				No data		---	---	---	---	---	---	---
AJ250170	IGHG2*02	F	AA gDNA	--g	--g	T a--	---	---	---	M a--	--c	---	---	---	--a
Z49801	IGHG2*02	F	AA gDNA				No data		---	M a--	--c	---	---	---	--a
AF449616	IGHG2*03	F	AA gDNA	--g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AF449617	IGHG2*04	F	AA gDNA	--g	---	---	--g	--g	---	---	---	---	---	---	---
AF449618	IGHG2*05	F	AA gDNA	--g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--g	---
AL928742	IGHG2*06	F	AA gDNA	--g	--g	---	---	---	---	---	--c	---	S t--	---	--a
KX670549	IGHG2*07 ^b		AA gDNA				No data		---	---	--c	L c--	---	--g	---
KX670550 ^c	IGHG2*08 ^b		AA gDNA				No data		---	---	--c	---	---	---	---
KX670551 ^c	IGHG2*08 ^b		AA gDNA				No data		---	---	--c	---	---	---	---
KX670552	IGHG2*09 ^b		AA gDNA				No data		---	---	--c	---	---	--g	---
KX670553	IGHG2*10 ^b		AA gDNA				No data		--t	---	--c	---	---	--g	--a
KX670554	IGHG2*11 ^b		AA gDNA				No data		---	---	--c	---	---	--g	--a

^a: IMGT Unique Numbering, according to IMGT® scientific chart (<http://www.imgt.org>).

^b: the denomination of IGHG2*07*08*09*10*11 alleles is followed by “i” to signify that this denomination is in process and not yet formalized in IMGT® repertoire.

^c: KX670550 and KX670551 sequences are different in the intron between the CH2 and CH3-CHS exons.

F: functional. AA: amino acid. gDNA: genomic DNA.

No letter at AA position indicates identical amino acid in comparison with IGHG2*01. Dashes at gDNA position indicate identical nucleotides in comparison with allele IGHG2*01. Nucleotide and amino acid changes (for a given codon) are indicated in bold letter.

Supplemental Table S6: Discriminatory nucleotide and/or AA positions along the alignment of *Homo sapiens* IGHG4 alleles, including the 4 IGHG4 alleles newly identified

GenBank Accession N°	IMGT allele name	IMGT UN ^a	CH1 exon			CH2 exon					CH3-CHS exon				
			3	1.4	14	91	92	108	11	81	88	89	100	117	
K01316	IGHG4*01	F	AA	S	E	T	V	L	N	Q	T	R	L	N	T
			gDNA	tcc	gag	act	gtc	ctg	aac	cag	acg	agg	cta	aat	aca
AJ001563	IGHG4*02	F	AA	No data				V							
			gDNA		---	---	---	g--	---	---	---	---	---	---	--g
AJ001564	IGHG4*03	F	AA	No data								K			
			gDNA		---	---	---	---	---	---	---	-a-	--c	--c	--g
AL928742	IGHG4*04	F	AA												
			gDNA	--g	---	---	---	---	---	---	---	---	--c	---	---
KX670555	IGHG4*05i ^b		AA	No data			I		H	R					
			gDNA		---	---	a--	---	c--	-g-	--a	---	--c	---	---
KX670556	IGHG4*06i ^b		AA	No data			I		H						
			gDNA		---	---	a--	---	c--	---	---	---	--c	---	---
KX670557	IGHG4*07i ^b		AA	No data											
			gDNA		--a	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KX670558	IGHG4*08i ^b		AA	No data											
			gDNA		--a	--c	---	---	---	---	---	---	---	---	---

^a: IMGT Unique Numbering, according to IMGT® scientific chart (<http://www.imgt.org>).

^b: the denomination of IGHG4*05*06*07*08 alleles is followed by “i” to signify that this denomination is in process and not yet formalized in IMGT® repertoire.

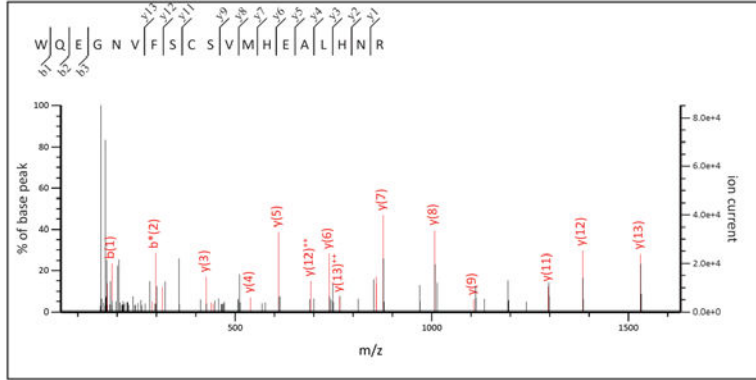
F: functional. AA: amino acid. gDNA: genomic DNA.

No letter at AA position indicates identical amino acid in comparison with IGHG4*01. Dashes at gDNA position indicate identical nucleotides in comparison with allele IGHG4*01. Nucleotide and amino acid changes (for a given codon) are indicated in bold letter.

Supplemental Figure 1: MS/MS fragmentation of the peptides allowing assignment of two distinct IGHG3 AA alleles for the same NP49 sample

MS/MS Fragmentation of **WQEGNVFSCVMHEALHNR**
Found in **X16110** in **IGHGhaplotypes**, IGHG3*03/Homo

Match to Query 12882: 2242.997472 from(748.673100,3+) intensity(357626.9688) rtinseconds(1700) scans(12318) index(9712)
Title: File14018 Spectrum9797 scans: 12318
Data file \\10.114.108.227\qexdata\Data\2014\Pharma\FIMI140719_Q695aQ704\FIMI140719_NP49_Q704.mgf

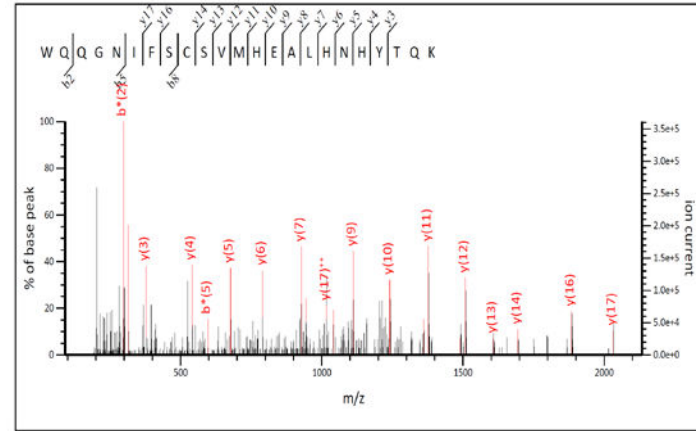


Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2243.0000
Ions Score: 37 Expect: 0.00021
Matches : 21/200 fragment ions using 76 most intense peaks (help)

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	187.0866	94.0469					W							19
2	315.1452	158.0762	298.1186	149.5629			Q	2057.9280	1029.4676	2040.9015	1020.9544	2039.9174	1020.4624	18
3	444.1878	222.5975	427.1612	214.0842	426.1772	213.5922	E	1929.8694	965.4384	1912.8429	956.9251	1911.8589	956.4331	17
4	501.2092	251.1082	484.1827	242.5950	483.1987	242.1030	G	1800.8268	900.9171	1783.8003	892.4038	1782.8163	891.9118	16
5	615.2522	308.1297	598.2256	299.6164	597.2416	299.1244	N	1743.8054	872.4063	1726.7788	863.8930	1725.7948	863.4010	15
6	714.3206	357.6639	697.2940	349.1506	696.3100	348.6586	V	1629.7624	815.3849	1612.7359	806.8716	1611.7519	806.3796	14
7	861.3890	431.1981	844.3624	422.6849	843.3784	422.1928	F	1530.6940	765.8507	1513.6675	757.3374	1512.6835	756.8454	13
8	948.4210	474.7141	931.3945	466.2009	930.4104	465.7089	S	1383.6256	692.3164	1366.5991	683.8032	1365.6150	683.3112	12
9	1051.4302	526.2187	1034.4036	517.7055	1033.4196	517.2135	C	1296.5936	648.8004	1279.5670	640.2872	1278.5830	639.7951	11
10	1138.4622	569.7347	1121.4357	561.2215	1120.4517	560.7295	S	1193.5844	597.2958	1176.5579	588.7826	1175.5738	588.2906	10
11	1237.5306	619.2690	1220.5041	610.7557	1219.5201	610.2637	V	1106.5524	553.7798	1089.5258	545.2665	1088.5418	544.7745	9
12	1368.5711	684.7892	1351.5446	676.2759	1350.5606	675.7839	M	1007.4840	504.2456	990.4574	495.7323	989.4734	495.2403	8
13	1505.6300	753.3187	1488.6035	744.8054	1487.6195	744.3134	H	876.4435	438.7254	859.4169	430.2121	858.4329	429.7201	7
14	1634.6726	817.8400	1617.6461	809.3267	1616.6621	808.8347	E	739.3846	370.1959	722.3580	361.6826	721.3740	361.1906	6
15	1705.7097	853.3585	1688.6832	844.8452	1687.6992	844.3532	A	610.3420	305.6746	593.3154	297.1613			5
16	1818.7938	909.9005	1801.7673	901.3873	1800.7832	900.8953	L	539.3049	270.1561	522.2783	261.6428			4
17	1955.8527	978.4300	1938.8262	969.9167	1937.8421	969.4247	H	426.2208	213.6140	409.1942	205.1008			3
18	2069.8956	1035.4515	2052.8691	1026.9382	2051.8851	1026.4462	N	289.1619	145.0846	272.1353	136.5713			2
19							R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

MS/MS Fragmentation of **WQQGNFSCVMHEALHNYTQK**
Found in **AJ390272** in **IGHGhaplotypes**, IGHG3*17/Homo

Match to Query 15326: 2757.252822 from(920.091550,3+) intensity(6484194.0000) rtinseconds(1684) scans(12154) index(9558)
Title: File14018 Spectrum9643 scans: 12154
Data file \\10.114.108.227\qexdata\Data\2014\Pharma\FIMI140719_Q695aQ704\FIMI140719_NP49_Q704.mgf



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2757.2540
Ions Score: 66 Expect: 2.3e-07
Matches : 21/244 fragment ions using 52 most intense peaks (help)

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	187.0866	94.0469					W							23
2	315.1452	158.0762	298.1186	149.5629			Q	2572.1820	1286.5946	2555.1554	1278.0814	2554.1714	1277.5893	22
3	443.2037	222.1055	426.1772	213.5922			Q	2444.1234	1222.5653	2427.0969	1214.0521	2426.1128	1213.5601	21
4	500.2252	250.6162	483.1987	242.1030			G	2316.0648	1158.5361	2299.0383	1150.0228	2298.0543	1149.5308	20
5	614.2681	307.6377	597.2416	299.1244			N	2259.0434	1130.0253	2242.0168	1121.5120	2241.0328	1121.0200	19
6	727.3522	364.1797	710.3257	355.6665			I	2145.0004	1073.0039	2127.9739	1064.4906	2126.9899	1063.9986	18
7	874.4206	437.7139	857.3941	429.2007			F	2031.9164	1016.4618	2014.8898	1007.9486	2013.9058	1007.4565	17
8	961.4526	481.2300	944.4261	472.7167	943.4421	472.2247	S	1884.8480	942.9276	1867.8214	934.4143	1866.8374	933.9223	16
9	1064.4618	532.7346	1047.4353	524.2213	1046.4513	523.7293	C	1797.8159	899.4116	1780.7894	890.8983	1779.8054	890.4063	15
10	1151.4939	576.2506	1134.4673	567.7373	1133.4833	567.2453	S	1694.8068	847.9070	1677.7802	839.3937	1676.7962	838.9017	14
11	1250.5623	625.7848	1233.5357	617.2715	1232.5517	616.7795	V	1607.7747	804.3910	1590.7482	795.8777	1589.7642	795.3857	13
12	1381.6028	691.3050	1364.5762	682.7917	1363.5922	682.2997	M	1508.7063	754.8568	1491.6798	746.3435	1490.6957	745.8515	12
13	1518.6617	759.8345	1501.6351	751.3212	1500.6511	750.8292	H	1377.6658	689.3365	1360.6393	680.8233	1359.6553	680.3313	11
14	1647.7043	824.3558	1630.6777	815.8425	1629.6937	815.3505	E	1240.6069	620.8071	1223.5804	612.2938	1222.5963	611.8018	10
15	1718.7414	859.8743	1701.7148	851.3610	1700.7308	850.8690	A	1111.5643	556.2858	1094.5378	547.7725	1093.5538	547.2805	9
16	1831.8254	916.4164	1814.7989	907.9031	1813.8149	907.4111	L	1040.5272	520.7672	1023.5007	512.2540	1022.5166	511.7620	8
17	1968.8843	984.9458	1951.8578	976.4325	1950.8738	975.9405	H	927.4431	464.2252	910.4166	455.7119	909.4326	455.2199	7
18	2082.9273	1041.9673	2065.9007	1033.4540	2064.9167	1032.9620	N	790.3842	395.6958	773.3577	387.1825	772.3737	386.6905	6
19	2219.9862	1110.4967	2202.9596	1101.9835	2201.9756	1101.4914	H	676.3413	338.6743	659.3148	330.1610	658.3307	329.6690	5
20	2383.0495	1192.0284	2366.0230	1183.5151	2365.0390	1183.0231	Y	539.2824	270.1448	522.2558	261.6316	521.2718	261.1396	4
21	2484.0972	1242.5522	2467.0706	1234.0390	2466.0866	1233.5470	T	376.2191	188.6132	359.1925	180.0999	358.2085	179.6079	3
22	2612.1558	1306.5815	2595.1292	1298.0683	2594.1452	1297.5762	Q	275.1714	138.0893	258.1448	129.5761			2
23							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

Supplemental Figure 2: MS/MS fragmentation of a putatively new IGHG4 peptide identified in two distinct samples of purified IgG

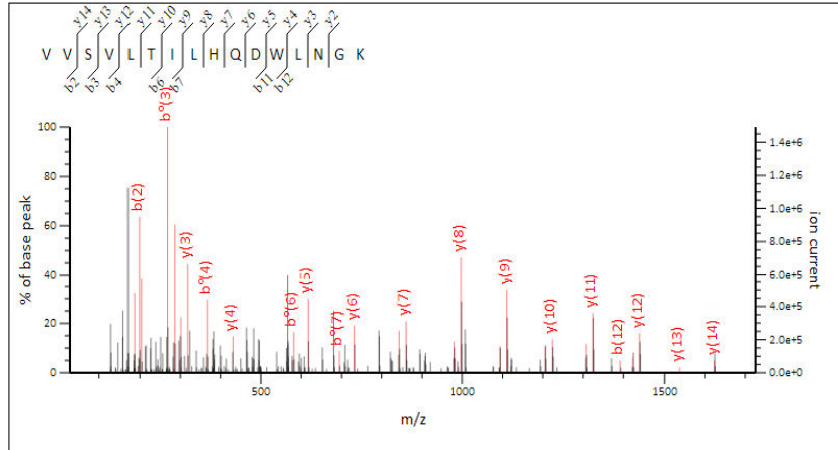
MS/MS Fragmentation of **VVSVLTILHQDWLNGK**

Found in **FMN|AS50|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410** in **FIMIAS50**, FMN|AS50|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410

Match to Query 9406: 1821.011208 from(911.512880,2+) intensity(18404198.0000) rtinseconds(2090) scans(16738) index(13848)

Title: File14016 Spectrum14014 scans: 16738

Data file \\10.114.108.227\qexdata\Data\2014\Pharma\FIMI140719_Q695aQ704\FIMI140719_AS50_Q695.mgf



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1821.0149

Ions Score: 78 Expect: 1.6e-05

Matches : 28/148 fragment ions using 59 most intense peaks ([help](#))

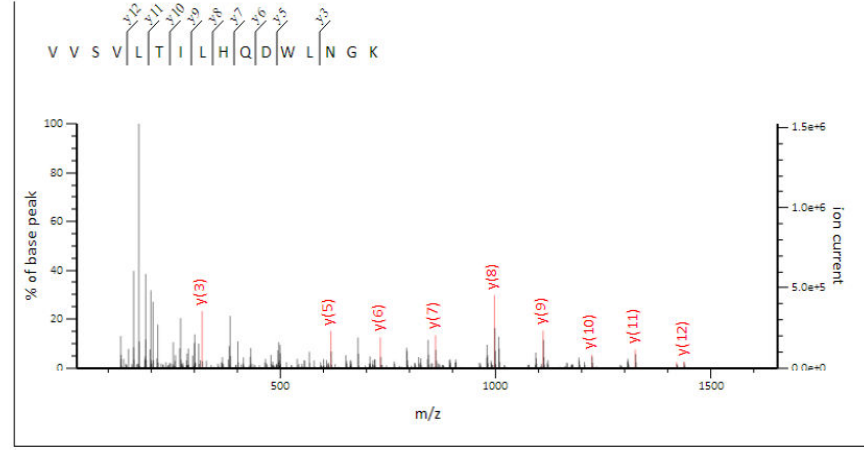
MS/MS Fragmentation of **VVSVLTILHQDWLNGK**

Found in **FMN|PA16|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410** in **FIMIPA16**, FMN|PA16|G4|V308I|N325H|Q355R|T394|L410

Match to Query 9760: 1821.011142 from(608.010990,3+) intensity(2270489.5000) rtinseconds(2091) scans(16469) index(13608)

Title: File14026 Spectrum13745 scans: 16469

Data file \\10.114.108.227\qexdata\Data\2014\Pharma\FIMI140719_Q695aQ704\FIMI140719_PA16_Q699.mgf



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1821.0149

Ions Score: 64 Expect: 4.2e-07

Matches : 10/148 fragment ions using 15 most intense peaks ([help](#))

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	100.0757	50.5415					V							16
2	199.1441	100.0757					V	1722.9537	861.9805	1705.9272	853.4672	1704.9432	852.9752	15
3	286.1761	143.5917			268.1656	134.5864	S	1623.8853	812.4463	1606.8588	803.9330	1605.8748	803.4410	14
4	385.2445	193.1259			367.2340	184.1206	V	1536.8533	768.9303	1519.8267	760.4170	1518.8427	759.9250	13
5	498.3286	249.6679			480.3180	240.6627	L	1437.7849	719.3961	1420.7583	710.8828	1419.7743	710.3908	12
6	599.3763	300.1918			581.3657	291.1865	T	1324.7008	662.8540	1307.6743	654.3408	1306.6902	653.8488	11
7	712.4604	356.7338			694.4498	347.7285	I	1223.6531	612.3302	1206.6266	603.8169	1205.6426	603.3249	10
8	825.5444	413.2758			807.5339	404.2706	L	1110.5691	555.7882	1093.5425	547.2749	1092.5585	546.7829	9
9	962.6033	481.8053			944.5928	472.8000	H	997.4850	499.2461	980.4585	490.7329	979.4744	490.2409	8
10	1090.6619	545.8346	1073.6354	537.3213	1072.6513	536.8293	Q	860.4261	430.7167	843.3995	422.2034	842.4155	421.7114	7
11	1205.6889	603.3481	1188.6623	594.8348	1187.6783	594.3428	D	732.3675	366.6874	715.3410	358.1741	714.3569	357.6821	6
12	1391.7682	696.3877	1374.7416	687.8744	1373.7576	687.3824	W	617.3406	309.1739	600.3140	300.6606			5
13	1504.8522	752.9298	1487.8257	744.4165	1486.8417	743.9245	L	431.2613	216.1343	414.2347	207.6210			4
14	1618.8952	809.9512	1601.8686	801.4379	1600.8846	800.9459	N	318.1772	159.5922	301.1506	151.0790			3
15	1675.9166	838.4619	1658.8901	829.9487	1657.9061	829.4567	G	204.1343	102.5708	187.1077	94.0575			2
16							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

#	b	b ⁺⁺	b [*]	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	100.0757	50.5415					V							16
2	199.1441	100.0757					V	1722.9537	861.9805	1705.9272	853.4672	1704.9432	852.9752	15
3	286.1761	143.5917			268.1656	134.5864	S	1623.8853	812.4463	1606.8588	803.9330	1605.8748	803.4410	14
4	385.2445	193.1259			367.2340	184.1206	V	1536.8533	768.9303	1519.8267	760.4170	1518.8427	759.9250	13
5	498.3286	249.6679			480.3180	240.6627	L	1437.7849	719.3961	1420.7583	710.8828	1419.7743	710.3908	12
6	599.3763	300.1918			581.3657	291.1865	T	1324.7008	662.8540	1307.6743	654.3408	1306.6902	653.8488	11
7	712.4604	356.7338			694.4498	347.7285	I	1223.6531	612.3302	1206.6266	603.8169	1205.6426	603.3249	10
8	825.5444	413.2758			807.5339	404.2706	L	1110.5691	555.7882	1093.5425	547.2749	1092.5585	546.7829	9
9	962.6033	481.8053			944.5928	472.8000	H	997.4850	499.2461	980.4585	490.7329	979.4744	490.2409	8
10	1090.6619	545.8346	1073.6354	537.3213	1072.6513	536.8293	Q	860.4261	430.7167	843.3995	422.2034	842.4155	421.7114	7
11	1205.6889	603.3481	1188.6623	594.8348	1187.6783	594.3428	D	732.3675	366.6874	715.3410	358.1741	714.3569	357.6821	6
12	1391.7682	696.3877	1374.7416	687.8744	1373.7576	687.3824	W	617.3406	309.1739	600.3140	300.6606			5
13	1504.8522	752.9298	1487.8257	744.4165	1486.8417	743.9245	L	431.2613	216.1343	414.2347	207.6210			4
14	1618.8952	809.9512	1601.8686	801.4379	1600.8846	800.9459	N	318.1772	159.5922	301.1506	151.0790			3
15	1675.9166	838.4619	1658.8901	829.9487	1657.9061	829.4567	G	204.1343	102.5708	187.1077	94.0575			2
16							K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1

IV-Commentaires

Au-delà de l'intérêt porté à l'étude du polymorphisme du fragment Fc/2¹ dans le but de faire la distinction entre les Ig d'origine maternelle et foétale, l'étude des allèles IGHG au niveau moléculaire se confronte au problème de la forte homologie de séquence entre les allèles. Bien que cette difficulté soit souvent relevée et quelle que soit la méthodologie utilisée la stratégie est identique et consiste à traquer la moindre hétérogénéité entre les allèles dans le but de discriminer le maximum d'entre eux, en particulier pour IGHG3 (Ghanem *et al.*, 1988 ; Balbín *et al.*, 1994 ; Dard *et al.*, 2001). Le travail mené ici a l'avantage d'avoir séquencé les domaines CH2 et CH3-CHS en entier, intron compris, des quatre sous-classes des IgG de façon indépendante. Une lecture fine des chromatogrammes a permis de mettre en évidence des variations nucléotidiques non répertoriées, dans les parties codantes (exoniques) comme dans la partie non codante (intronique entre le CH2 et le CH3). D'un point de vue moléculaire, toutes ces variations sont intéressantes puisqu'elles définissent en elles-mêmes l'existence de nouveaux allèles, alimentant les bases de données, même si certains d'entre eux codent pour des enchaînements peptidiques déjà référencés.

De façon inattendue, notre travail de traduction des séquences nucléotidiques a mis en lumière des séquences peptidiques déjà existantes mais non identifiées car non répertoriées dans les bases de données. Cette illustration de protéogénomique est prometteuse car cela permet d'enrichir les bases de données et ainsi de pouvoir élargir la discrimination allélique représentative de la diversité IGHG. Un travail sur deux échantillons d'ADN d'individus volontaires sains, européen et eurasien, réalisé en parallèle de l'article présenté dans le mémoire et non publié, appuie l'importance et l'intérêt de la protéogénomique, puisque le séquençage des domaines CH2 et CH3-CHS révèle l'existence de 3 nouveaux allèles nucléotidiques (un pour IGHG1, IGHG2 et IGHG4). Le nouvel allèle IGHG1 engendre une variation peptidique théorique non répertoriée. Son existence biologique est en cours d'investigation grâce à la MS-*middle down*.

Ainsi, cette nouvelle variation peptidique théorique bénéficie de la suite des travaux de MS menés par notre groupe de travail pour être réellement identifiée. Effectivement, afin de

¹ Fc/2 : fragment Fc séparé en deux après clivage enzymatique de la région charnière sous les ponts disulfures.

contourner les pertes d'informations causées par différents facteurs techniques limitant la MS-BU à l'étude de petits fragments peptidiques (20 acides aminés), notre groupe de travail se penche sur la MS-*middle down* où les fragments Fc/2 sont analysés dans leur intégralité (210 acides aminés) suite à la coupure exclusive à la jonction région charnière/domaine CH2 des IgG par l'endopeptidase IdeS (*Ig-degrading enzyme of Streptococcus pyogenes*). Cette technologie, en plus d'une meilleure identification allélique, permettra également une meilleure quantification des différents allèles. Cet aspect reste important pour notre travail de distinction de l'origine des IgG, d'autant plus qu'une analyse quantitative plus précise des différentes sous-classes des IgG pourrait améliorer le diagnostic d'infection congénitale.

**PARTIE 4 - ADAPTATION DE LA TECHNIQUE ELISPOT
POUR METTRE EN EVIDENCE LES LYMPHOCYTES B
NEONATAUX**

I-La technique ELISPOT

I-1-Son principe

Inspirée de deux techniques sur gel, l'une appelée *Diffusion In Gel-ELISA* (DIG-ELISA) permettant de quantifier les Ig sériques grâce au diamètre de diffusion sur gel (Elwing et Nygren, 1979), et l'autre ayant pour but de visualiser à l'échelle cellulaire une population spécifique productrice d'Ig anti-globules rouges de mouton parmi un mélange multicellulaire suite à la lyse de globules rouges reconnus (Jerne et Nordin, 1963), l'ELISPOT est une technique de quantification immuno-enzymatique en phase solide permettant de dénombrer les cellules sécrétrices d'Ac spécifiques (Czerkinsky *et al.*, 1983 ; Sedgwick et Holt, 1983). Sa technicité est passée du gel d'agarose coulé en boîte de pétri à l'utilisation de plaques de culture dont le fond est tapissé d'une membrane de nature distincte suivant les éléments recherchés et son utilisation s'est étendue à la détection de Ly sécréteurs de protéines spécifiques (Ac, interleukines).

Je décris ici le principe de l'ELISPOT appliqué aux LyB (figure n°29). Les LyB activés en plasmocytes, aussi appelés cellules sécrétrices d'Ac (ASC pour *Antibody Secreting Cells*), sont déposés en monocouche sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) placée au fond d'un puits de culture, où l'Ag d'intérêt a été préalablement adsorbé. Les Ac sécrétés par les ASC sont capturés spécifiquement par l'Ag à proximité de l'emplacement de la cellule. Après élimination des cellules par lavages, les Ac sécrétés et fixés à l'Ag sont révélés par un deuxième Ac conjugué à une enzyme par la formation d'un produit chromogène. Se forment sur la membrane des tâches/spots, pouvant être observés à l'œil nu. Chaque spot représente l'empreinte sécrétoire d'une ASC spécifique d'un Ag donné.

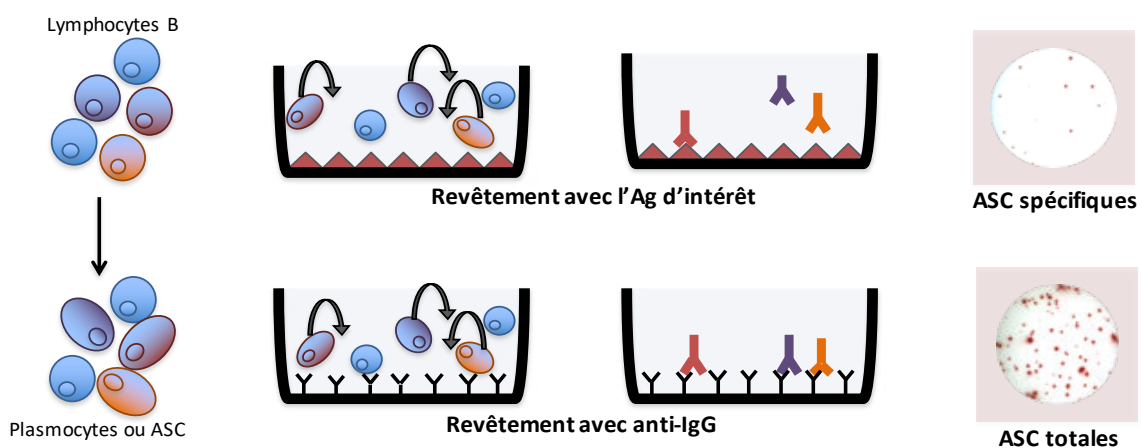


Figure n°29. Schéma du principe de l'ELISPOT B.
Composition personnelle.

I-2-Ses applications

Aujourd'hui utilisé pour détecter les produits et les fonctions des cellules immunitaires, l'ELISPOT a été particulièrement développé dans l'immunopathogénèse et le diagnostic/pronostic des maladies infectieuses (Lima-Junior *et al.*, 2017). Le cancer, les virus, les allergies, l'autoimmunité, les transplantations et les vaccins sont les principaux thèmes pour lesquels l'ELISPOT est utilisé, avec une forte exploration des LyT détectés grâce à leurs cytokines mais aussi avec l'étude des populations de LyB mémoires (Crotty *et al.*, 2004 ; Bauer et Jilg, 2006 ; Buisman *et al.*, 2009 ; Jahnmatz *et al.*, 2013 ; Lima-Junior *et al.*, 2017). Pour la thématique qui concerne mon travail de thèse, c'est à dire les infections tropicales et/ou négligées, une synthèse bibliographique non exhaustive réalisée sur cette technique montre que i/son utilisation pour ce thème avoisine 3%, ii/*Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* et *Toxoplasma* sont les parasites pour lesquels elle trouve une application, avec notamment le suivi des réponses lymphocytaires T et B mémoires suite à des essais vaccinaux pour *Plasmodium* (Weiss *et al.*, 2012 ; Gbédandé *et al.*, 2017) et *Leishmania* et iii/comme le montre le tableau n°4, l'ELISPOT est pratiquement inexistant dans le paysage du diagnostic (Lima-Junior *et al.*, 2017).

	Diagnostic Pronostic	Pathogénicité	Développement vaccinal	Identification d'épitope
<i>Plasmodium</i>	-	5	8	2
<i>Leishmania</i>	1	1	2	1
Maladie de Chagas	-	2*	-	5
Toxoplasmose	-	2	-	2

Tableau n°4. Nombre de publications où le test ELISPOT est utilisé dans les maladies dues aux protozoaires.

* : une publication a été ajoutée aux données (Hermann *et al.*, 2002). D'après Lima-Junior *et al.*, 2017.

II-Mode opératoire classique de l'ELISPOT

Dans les grandes lignes, le protocole utilisé est celui décrit par nos collègues pour la quantification de la réponse lymphocytaire B mémoire à un candidat vaccin dans le cadre du paludisme gestationnel (Gbédandé *et al.*, 2017). L'utilisation et le choix des Ag parasitaires

mentionnés dans les opérations menées à J5, dans le tableau n°5, seront détaillées dans le chapitre III « Adaptation de la technique ELISPOT dans la toxoplasmose congénitale ».

J1 - Isolement des cellules mononucléées (CMN)

Le sang veineux est collecté dans un tube (9ml) contenant comme anticoagulant du Citrate Phosphate Dextrose Adénine, tube CPDA. Après dilution du sang total volume à volume avec du RPMI 1640 sans L-glutamine (Sigma) préchauffé à 37°C, les CMN du sang périphérique sont isolées par centrifugation en gradient de densité (Ficoll-Paque Premium, GE Healthcare), 30min à 2500 tours/min (t/min). Elles sont lavées deux fois 10min à 1500 t/min avec le RPMI 1640 préchauffé, puis dénombrées avec du bleu trypan (Eurobio) en cellules KOVA afin de connaître le nombre de cellules viables.

Si les cellules sont utilisées le jour même, elles sont gardées dans le RPMI 1640 dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂. Sinon, elles sont remises en suspension dans une solution de cryoconservation composée de sérum de veau fœtal décomplémenté (80% SVF Gold, GE Healthcare) et de diméthylsulfoxyde (20% DMSO, Sigma), et sont réparties de façon à avoir un minimum de 5.10⁶ CMN par cryotube. Les cellules restent une nuit à -80°C avant d'être entreposées dans de l'azote liquide.

J1 - Décongélation des CMN

Les CMN sorties de l'azote liquide sont rapidement décongelées dans un bain-marie à 37°C, puis lentement re-suspendues volume à volume avec un milieu complet préchauffé à 37°C, appelé RPMIc. Deux lavages avec du RPMIc (5 à 10 ml) préchauffé sont effectués, 10min à 1400 t/min, pour enlever au maximum le DMSO, puis les cellules sont comptées comme précédemment, cellules vivantes *versus* cellules mortes. Après dénombrement, la solution cellulaire est ajustée avec du RPMIc pour avoir une solution de travail à 1.10⁶ cellules viables/ml.

Le RPMIc contient 450ml de RPMI 1640 sans L-glutamine (Sigma), 5ml de sodium pyruvate 100mM (Gibco), 5ml de MEM non essential amino acids 100X (Gibco), 5ml de L-Glutamine 200mM (Gibco), 5ml de Pénicilline 10 000U/ml - Streptomycine 10 000µg/ml (Gibco), 500µl de 2-mercapto-éthanol 50mM (Gibco) et 50ml de SVF Gold décomplémenté (GE Healthcare).

J1 - Activation/différenciation des cellules B mémoires

Dans une plaque de culture 24 puits (Corning), on dépose comme témoin négatif 1ml de solution cellulaire de travail. Autrement, on dépose 1ml de solution cellulaire de travail en présence de 2,5µl de CpG ODN2006 à 1mg/ml (TibMolBiol) et 2µl d'IL-15 à 5µg/ml (R&D Systems), réactifs sur la composition desquels nous reviendrons plus loin. La plaque est incubée 5 jours à 37°C avec 5% de CO₂.

J5 - Préparation de la plaque ELISPOT

Une plaque stérile PVDF 96 puits multiscreen HTS-IP (Millipore) est régénérée avec 15µl/puits d'éthanol à 70% (Fisher). Elle est ensuite lavée deux fois avec 200µl/puits de solution tampon saline 1X (DPBS pour *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*) sans calcium ni magnésium (Gibco). Puis suivant les cas, on dépose 100µl des différents réactifs présentés dans le tableau n°5. La plaque est hermétiquement fermée et incubée sur la nuit à +4°C. Cette étape peut être réalisée à J6, dans ce cas la plaque reste 2heures à température ambiante.

Réactifs	Rôle	Concentration [C]	Provenance
DPBS 1X	Témoin négatif	-	Gibco
Ac de chèvre anti-IgG humaine	Témoin positif Détection de la réponse globale (ASC en IgG)	[C] initiale 200µg/ml [C]/puits 5µg/ml	Sigma
Ag recombinant de <i>T. gondii</i> de type I (utilisé au début des mises au point)	Détection de la réponse spécifique (ASC en IgG anti-Ag recombinant)	[C] initiale 1000µg/ml [C]/puits variable	Jena Bioscience
Lysat parasitaire de <i>T. gondii</i> de type I	Détection de la réponse spécifique (ASC en IgG anti- <i>T. gondii</i> de type I)	[C] initiale 2500µg/ml [C]/puits variable	CNR Toxoplasmose de Reims

Tableau n°5. Réactifs déposés pour préparer la plaque ELISPOT.

J6 -Mise en contact des CMN avec la plaque ELISPOT

Deux opérations sont à mener en parallèle, la fin de la préparation de la plaque ELISPOT et le lavage des cellules. Après le retrait des réactifs adsorbés, la plaque est lavée deux fois avec 150µl/puits du mélange DPBS/BSA (DPBS 1X + 3% de *Bovine Serum Albumin*, Sigma), suit une étape de blocage avec 150µl/puits du mélange DPBS/BSA, incubés durant 30min à

température ambiante. Pendant ce temps, les cellules sont collectées et lavées deux fois avec du RPMIc préchauffé, 10min à 1400 t/min. Puis elles sont comptées comme décrit plus haut. Après numération, les différentes préparations cellulaires sont réajustées à 2.10^6 cellules viables/ml dans du RPMIc.

A la fin de l'étape de blocage, la plaque est lavée deux fois avec 200µl/puits de DPBS 1X. Puis, en duplicat, 100µl de suspension cellulaire sont déposés dans les puits témoins négatifs ou ceux revêtus de l'Ag d'intérêt, et des dilutions en série (1/2) sont effectuées dans du RPMIc (volume final : 100µl) au niveau des puits témoins positifs. La plaque est ensuite incubée une nuit dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂.

J7 -Lavages de la plaque ELISPOT et révélation

Les solutions cellulaires sont enlevées et la plaque lavée cinq fois activement puis deux fois normalement avec 150µl/puits de tampon de lavage (DPBS 1X + BSA 3% + 0,5% Tween 20). L'Ac secondaire, Ac de chèvre anti-IgG humaine biotinylé (Sigma) dilué au 1/500^{ème} dans du DPBS 1X/BSA 3% et filtré, est ajouté à raison de 100µl/puits. La plaque est incubée 2 heures à température ambiante à l'obscurité, puis lavée sept fois comme précédemment.

Ensuite 100µl/puits d'ExtrAvidine-péroxydase (Sigma) diluée au 1/600^{ème} sont ajoutés et la plaque reste une heure à température ambiante à l'obscurité. Elle est ensuite lavée trois fois avec 200µl/puits de DPBS 1X, puis 100µl/puits d'une solution chromogène (3-amino-9-éthylcarbazole, AEC ; Sigma) sont déposés. On laisse la révélation se faire durant 10 min à température ambiante à l'obscurité, puis on jette le contenu, on enlève avec précaution l'opercule en plastique qui se trouve sous la plaque et on rince abondamment la plaque avec de l'eau osmosée.

La plaque est ensuite placée à température ambiante à l'obscurité le temps de son séchage, avant d'être lue à l'aide d'un automate de lecture de plaque ELISPOT AID (AutoImmun Diagnostika, GMBH) qui permet de dénombrer les spots formés grâce à son logiciel de traitement des données. La lecture peut parfois se réaliser à **J8**, si la plaque n'est pas complètement sèche.

III-Adaptation de la technique ELISPOT à la toxoplasmose congénitale

La patience est requise dans le domaine de la culture cellulaire qui a tendance à être capricieuse, c'est pourquoi l'optimisation de l'ELISPOT B appliqué à la toxoplasmose poursuit son cheminement. J'ai choisi d'aborder les points sur lesquels il me semblait important d'intervenir afin que la technique réponde au mieux à notre objectif, c'est à dire la mise en évidence des LyB néosynthétisés de façon précoce suite à une primo-infection à *T. gondii* et ceci quel que soit le génotype de la souche infectante.

III-1-Choix de l'antigène parasitaire

En premier lieu, la protéine majeure de surface de *T. gondii*, SAG1 (*Surface Antigen 1*) a été utilisée pour le revêtement des membranes, dans la mesure où cet Ag est généralement utilisé sous sa forme de protéine recombinante rec-SAG1 dans les techniques sérologiques ELISA. Des mises au point ont été faites pour déterminer la concentration minimale nécessaire pour mettre en évidence la population de LyB spécifiquement productrice d'Ac anti-SAG1. Nous avons testé en quadrupliquet les CMN de 4 individus déjà immunisés contre la toxoplasmose avec trois concentrations différentes de SAG1 (5µg/ml, 10µg/ml et 20µg/ml). Les résultats obtenus permettent de valider cette approche et ont été présentés à l'occasion de la journée des jeunes chercheurs organisée par le Département Hospitalo Universitaire (DHU) Risques et Grossesse de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) sous forme d'une présentation affichée qui se trouve en annexe n°2.

Cependant, l'utilisation d'un seul Ag paraissait trop restrictive, car si certains Ag sont exprimés à tous les stades du cycle parasitaire, d'autres sont d'expression plus fugace ([Denis, Médecine Science Sélection, 2002](#)). La pertinence de l'utilisation d'un mélange de protéines recombinantes ou bien d'un lysat parasitaire s'est posée.

L'utilisation d'un mélange de protéines recombinantes suppose la connaissance des différents Ag produits au cours du cycle parasitaire ainsi que de ceux qui permettent de détecter les IgM et/ou les IgG produites en fonction du type d'infection, aiguë ou chronique.

Les premiers articles analysant les protéines de surface de *T. gondii* montraient la présence de plusieurs protéines en quantité plus ou moins importante, caractérisées par leurs poids

moléculaires et affiliées par défaut à celles exprimées à la surface du parasite ([Handman et al., 1980](#) ; [Couvreur et al., 1988](#) ; [Boothroyd et al., 1998](#)). Or, parmi les cinq protéines les plus immunogènes identifiées, étaient incluses la protéine majeure de surface P30 (Protéine de 30 kDa), ensuite appelée SAG1 ([Sibley et al., 1991](#)), P22-SAG2 et P43-SAG3, mais aussi deux protéines excrétées de granules denses (GRA), P23/24-GRA1 et P35-GRA8. Depuis, dans le cadre de l'optimisation de la technique ELISA principalement pour réaliser un diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale, d'autres Ag parasitaires ont été identifiés (figure n°30) et leurs protéines recombinantes synthétisées afin d'utiliser les épitopes les plus immunogènes ([Aubert et al., 2000](#)).

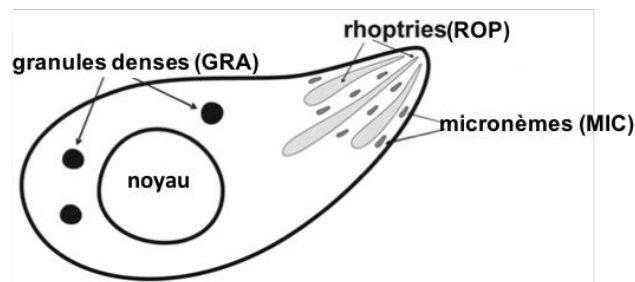


Figure n°30. Organelles sécrétoires contenant des protéines caractéristiques chez *T. gondii*. D'après illustration de [Dziadek et Brzostek, 2012](#) et complétée de [Kotesha et Noordin, 2010](#).

Qu'ils les testent de façon indépendante ou sous forme de cocktails antigéniques, les auteurs choisissent les Ag en fonction de ce qu'ils cherchent à révéler : chronologie d'apparition des mêmes isotypes dirigés contre différents Ag reflétant le stade parasitaire, infection récente ou ancienne, intensité de réponse IgG et IgM ou identification des Ag appelant une réponse Ac très précoce. Il ressort de ces travaux que la plus-value apportée par l'utilisation d'un mélange d'Ag ne doit pas dépasser 3 à 4 protéines recombinantes, que ce mélange doit être spécifique du stade parasitaire (début de cycle, fin de cycle) et qu'il est préférable d'y inclure un Ag hautement immunogène ([Aubert et al., 2000](#) ; [Li et al., 2000 b](#)) ; que les Ac anti-SAG1 n'apparaissent pas en début d'infection ([Pfrepper et al., 2005](#)) et que l'inclusion des Ag GRA semble nécessaire puisqu'ils constituent une fraction importante des Ag circulant dans le sang durant les premières heures suivant l'infection et ont été identifiés comme marqueurs d'une infection aiguë ([Golkar et al., 2008](#)), notamment GRA6 ([Golkar et al., 2008](#)) et GRA8 ([Li et al., 2000 a et 2000 b](#) ; [Suzuki et al., 2000](#) ; [Pfrepper et al., 2005](#)), ce dernier ayant été étudié dans la réponse Ac au sein d'une population de femmes enceintes. Les Ac anti-GRA4 et anti-GRA7 ont été détectés chez des enfants de moins de 4 mois suspectés de TC ([Altchek et al., 2006](#) ; [Pfrepper et al., 2005](#)). Les Ag recombinants MIC permettent également de faire la distinction

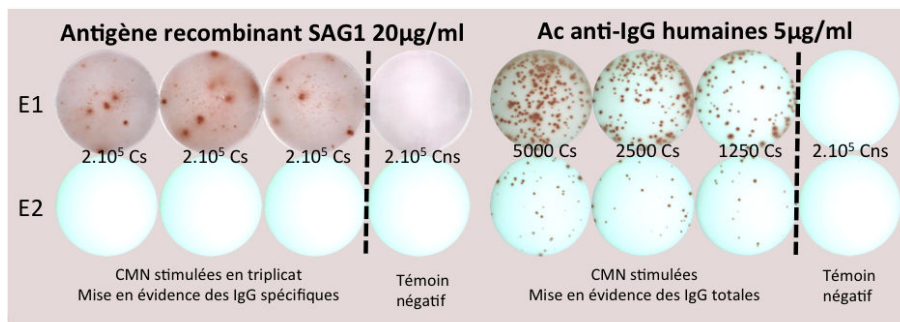
entre les enfants de moins de 3 mois infectés ou non issus de mères ayant eu une primo-infection toxoplasmique durant la grossesse (Buffolano *et al.*, 2005).

Ainsi pour notre étude, l'utilisation d'un mélange antigénique, le plus immunodominant possible et spécifique de stade (Aubert *et al.*, 2000 ; Kotresha et Noordin, 2010), est nécessaire pour permettre la détection de la plus large population lymphocytaire réactive possible. L'utilisation des Ag recombinants a l'avantage de standardiser les techniques au profit des utilisateurs. Cependant elle a l'inconvénient de limiter le spectre de la réponse étudiée et la comparaison des résultats pour un même épitope antigénique est délicate puisqu'elle dépend de la réponse Ac en lien avec la zone recombinée de l'épitope qui diffère d'un fournisseur à l'autre (Kotresha et Noordin, 2010).

Notre objectif étant de capturer la réponse Ac spécifique la plus diverse possible, même en cas de faible signal, l'utilisation d'un lysat parasitaire semble la plus adaptée. Un autre avantage du lysat parasitaire réside dans son éventuelle capacité à mieux révéler, que ne le feraient les Ag recombinants, la réponse Ac particulière qu'est celle issue des LyB néonataux. Ainsi, le lysat parasitaire de *T. gondii* de type I est une bonne option car il permet de mettre en évidence davantage d'Ac spécifiques de la toxoplasmose qu'un Ag recombinant seul ou associé à d'autres, tout en étant représentatif de la cinétique des stades parasites, ce qui augmente nos chances de détecter les Ac toxoplasmiques spécifiques du nouveau-né s'ils sont peu nombreux.

La suite des mises au point s'est faite avec ce lysat qui a l'avantage de présenter toute la mosaïque antigénique de *T. gondii*. Et dans ce cas de figure, l'inclusion d'un témoin négatif, réalisé sur des cellules stimulées et non stimulées d'un individu n'ayant jamais été en contact avec le parasite, est d'autant plus justifiée pour exclure d'éventuelles réponses non spécifiques trouvées lors d'études antérieures sur la toxoplasmose (Potasman *et al.*, 1986 a et 1986 b). Différentes concentrations de lysat parasitaire, dont la gamme allait de 20µg/ml à 100µg/ml, ont été testées sur des CMN d'un individu séropositif et d'un individu séronégatif à la toxoplasmose. Le résultat des comparaisons entre SAG1 et le lysat de *T. gondii* de type I, pour lequel la concentration de 20µg/ml a finalement été retenue, est présenté sur la figure n°31 et a été exploité pour argumenter plusieurs demandes de financements.

Expérience A



Expérience B

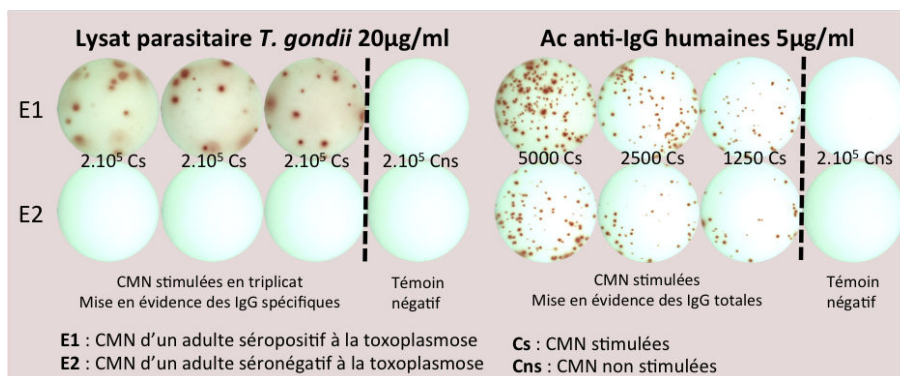


Figure n°31. Détermination d'ASC sécrétrices d'IgG dirigées contre SAG1 (expérience A) vs. lysat de *T. gondii* de type I (expérience B).

E1 : CMN issues d'un adulte séropositif à la toxoplasmose. E2 : CMN issues d'un adulte séronégatif à la toxoplasmose. Cet essai montre la faisabilité de la technique dans un contexte de toxoplasmose ancienne. Expérience A : visualisation de la population d'ASC spécifiques sécrétrices d'IgG anti-SAG1 de *T. gondii*. Expérience B : visualisation de la population d'ASC spécifiques sécrétrices d'IgG anti-lysate parasite de *T. gondii*. Le test est validé par l'absence d'ASC d'IgG en l'absence de stimulation (Cns) et par la présence d'un grand nombre d'ASC d'IgG totales (à droite).

III-2-Le temps d'activation cellulaire

Le cocktail d'activation polyclonal utilisé à J1 permet de simuler une activation cellulaire Ag-indépendante afin d'induire la transformation des LyB mémoires circulants en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Cette activation est nécessaire dans la mesure où les individus, desquels proviennent les CMN, sont dans un état d'équilibre, c'est à dire hors contexte d'infection ou de vaccination récente (Bernasconi *et al.*, 2002), et qu'une pré-stimulation des cellules B mémoires est nécessaire pour provoquer la différenciation en ASC (Jahnmatz *et al.*, 2013).

Les deux composés que nous utilisons sont le CpG ODN2006 ou Cytosine phosphorothionate Guanine OligoDéoxyNucléotide de classe B, qui est une petite séquence d'ADN simple brin (5'-TCgTCgTTTTgTCgTTTTgTCgTT-3') forte stimulatrice immunitaire des LyB de par sa liaison à leurs récepteurs TLR9 (*Toll Like Receptor*) (Krieg *et al.*, 1995 ; Krieg, 2012) et l'IL-15

(interleukine 15), qui induit la prolifération et la différenciation des LyB (Armitage *et al.*, 1995). L'association de ces deux composés pour l'activation des LyB a été employée dans des études d'optimisation de cette étape (Bernasconi *et al.*, 2002 ; Gupta *et al.*, 2018), avec parfois l'ajout d'une autre interleukine (IL10) pour maximiser la prolifération et la différenciation des LyB avec production d'IgG (Buisman *et al.*, 2009).

Suivant le protocole décrit ci-dessus, le temps d'activation ou de pré-incubation est de 6 jours avec révélation de la plaque à J7. Or, nous voulions savoir si un signal cellulaire pouvait être détectable avant ce délai dans la mesure où la finalité de l'ELISPOT dans notre projet est d'apporter une réponse de diagnostic précoce. Pour cela, a été réalisée une mise en contact cellulaire, séquentielle dans le temps toutes les 24h de J2 à J6, sur une plaque ELISPOT revêtue d'Ac anti-IgG (puits contrôles à 5µg/ml) et de lysat de *T. gondii* (puits tests à 20µg/ml). La révélation avait lieu le lendemain de l'étape de dépôt cellulaire. Les CMN provenaient d'un stock de cellules congelées d'un adulte séropositif à la toxoplasmose. Les résultats sont présentés sur la figure n°32.

Nos résultats indiquent que sur des CMN d'adulte déjà immunisé contre la toxoplasmose une détection cellulaire est possible au bout de 48h (J3) de pré-incubation avec un mélange mitogénique au lieu de 120h (J6) et que la durée globale du protocole peut ainsi être raccourcie. Bien qu'utilisant d'autres mélanges mitogéniques, différentes études ont également montré que l'étape de pré-incubation pouvait être écourtée et ramenée à 48-72h (Weiss *et al.*, 2012 ; Jahnmatz *et al.*, 2013).

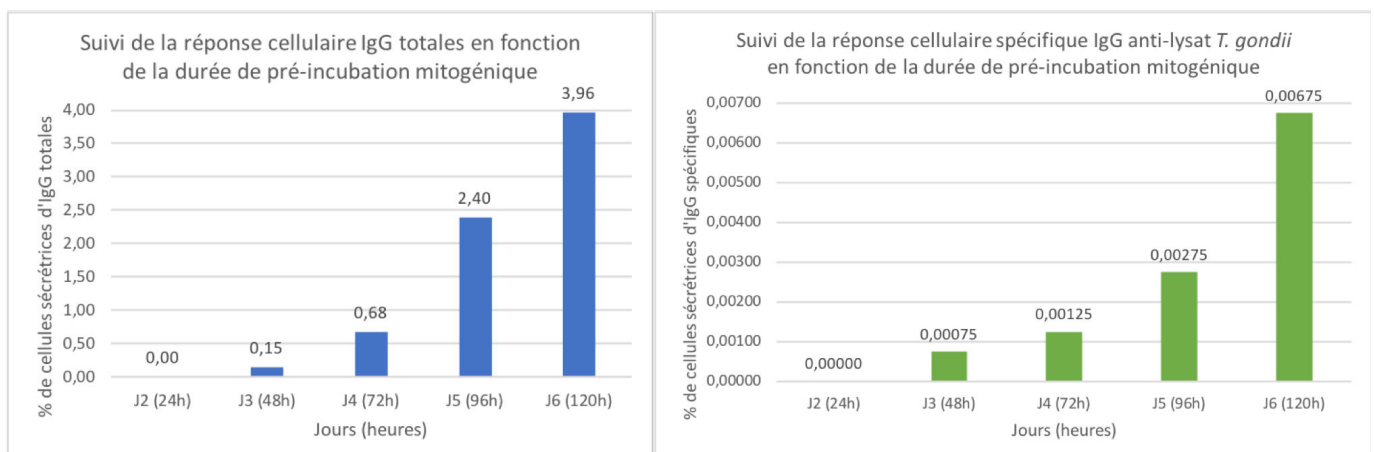


Figure n°32. Suivi de l'apparition des ASC anti-IgG totales et spécifiques du lysat parasite issues de CMN d'un individu séropositif à la toxoplasmose.

III-3-Les autres paramétrages effectués

Plusieurs autres essais ont été réalisés afin de tester la robustesse de l'ELISPOT dans des conditions de travail de terrain.

Impact de la cryoconservation

Bien que ce paramètre ait été testé dans d'autres études où aucune différence n'était observable entre les LyB frais et congelés (Crotty *et al.*, 2004 ; Buisman *et al.*, 2009 ; Weiss *et al.*, 2012), nous avons entrepris de réaliser un essai sur des cellules fraîchement recueillies vs. des cellules cryoconservées décongelées d'un même individu sain. Les résultats sont observables sur la figure n°33. La moindre réactivité des cellules après décongélation n'a pas impacté la suite des différents essais de mise au point. De plus, les cellules recueillies étaient issues de sang périphérique prélevé sur EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) comme anticoagulant, et non sur CPDA comme nous l'avons défini dans la suite de nos essais.

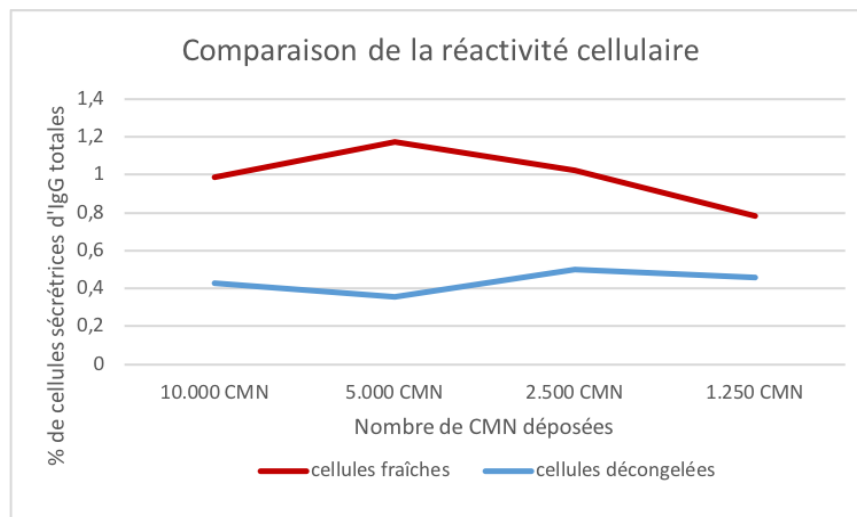


Figure n°33. Comparaison de réactivité entre cellules fraîches et cellules cryoconservées décongelées.

Impact des anticoagulants et des réactifs de séparation cellulaire (Ficoll)

Les résultats présentés sur la figure n°34 mettent en avant les différences de rendement cellulaire en lien avec le choix des réactifs. Le type d'anticoagulant CPDA vs. EDTA ainsi que la particularité du Ficoll, Ficoll Paque Plus qui permet de séparer uniquement les Ly vs. Ficoll Paque Premium qui isole les CMN dont font partie les Ly, ont été testés simultanément sur des cellules fraîchement recueillies d'un individu sain. Bien que nous travaillons sur les LyB, la notion de coopération cellulaire est importante, ainsi le Ficoll Paque Premium répond mieux

à cette exigence, et la combinaison CPDA/Ficoll Paque Premium s'est avérée la plus prometteuse.

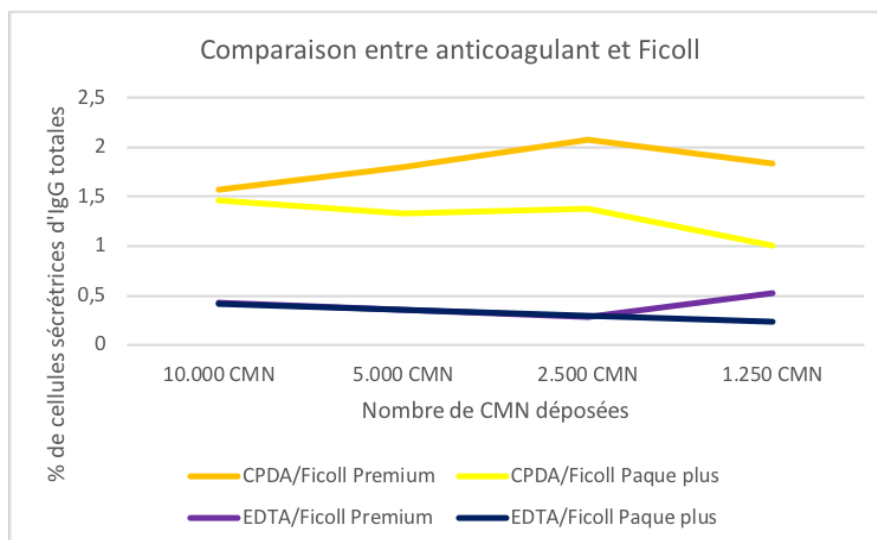


Figure n°34. Comparaison de la réactivité cellulaire suivant l'anticoagulant et le réactif de séparation cellulaire utilisés sur des CMN fraîchement recueillies d'un individu sain.

Impact du conditionnement des prélèvements

Afin de déterminer les limites de flexibilité des conditions d'acheminement du prélèvement sanguin compatibles avec une réponse cellulaire de qualité, nous avons regroupé dans un essai deux paramètres : la température de stockage des tubes de sang périphérique après le prélèvement (température ambiante vs. +4°C) et le temps d'acheminement depuis le jour du prélèvement (J1) jusqu'à J4. Cet essai s'est réalisé en deux temps :

1/le sang périphérique prélevé sur CPDA a été réparti en plusieurs aliquotes comme le montre le tableau n°6. Pour chaque aliquote, une séparation cellulaire a été faite avec du Ficoll Paque Premium et les CMN ont été cryoconservées ;

2/les cellules ont ensuite été toutes décongelées le même jour pour réaliser en une seule fois un test ELISPOT.

	J1		J2 (24h)		J3 (48h)		J4 (72h)	
	TA	+4°C	TA	+4°C	TA	+4°C	TA	+4°C
Matin	Ficoll 1		Ficoll 3		Ficoll 5		Ficoll 7	
Après-midi*	Ficoll 2		Ficoll 4		Ficoll 6		Ficoll 8	

Tableau n°6. Schéma expérimental de conditionnement des échantillons.

* : l'intervalle de temps entre les Ficoll effectués le matin et l'après-midi était de 5heures (± 30min).

Malgré des aléas techniques, et bien que les prélèvements doivent être manipulés le plus rapidement possible, les résultats obtenus montrent que les échantillons sanguins doivent être entreposés à température ambiante et sont exploitables jusqu'à 48h après le prélèvement (figure n°35). Dans le même souci de connaître l'impact du temps de transport sur la viabilité cellulaire, une étude a été menée sur différentes classes cellulaires suite à l'acheminement d'échantillons de sang de cordon à température ambiante dans le cadre de transplantation cellulaire, et ce temps ne devait pas dépasser les 96 heures (Pereira-Cunha *et al.*, 2013). Toutefois, une différence de résultats est à noter sur la température de stockage dans la mesure où une autre étude relate que le stockage à +4°C permet de conserver plus longtemps les cellules (72h) en comparaison d'un stockage à température ambiante (48h) (Solomon *et al.*, 2010).

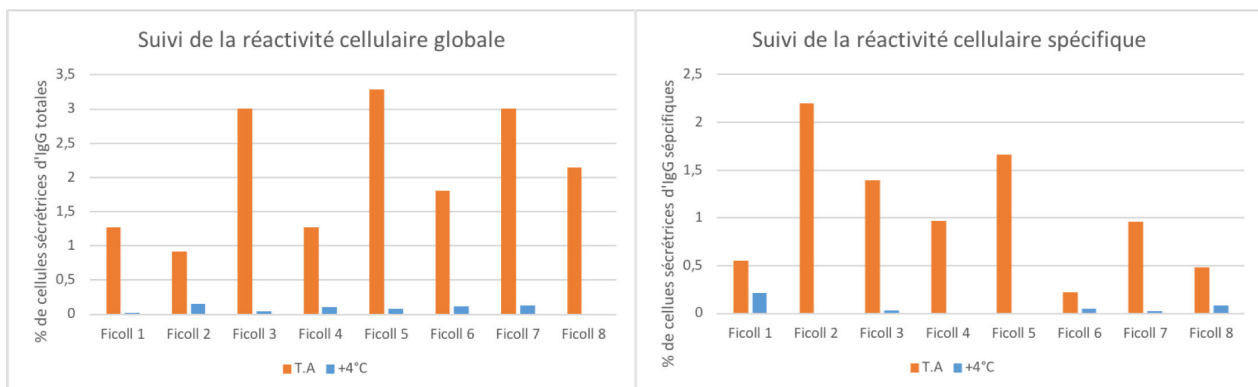


Figure n°35. Impact des conditions de stockage et du temps d'acheminement des prélèvements sanguins.

IV-Bilan actuel et points clefs à développer

Actuellement, le bilan de l'adaptation de la technique ELISPOT faite sur des CMN d'adulte immunisé ou non vis-à-vis de la toxoplasmose est que i/l'utilisation de l'anticoagulant CPDA et du Ficoll Paque Premium sont un plus pour favoriser l'observation des ASC, ii/l'emploi de lysat parasite est satisfaisant pour la suite de notre optimisation et iii/comme il n'y a pas de perte de signal suite à une cryoconservation, nous pouvons constituer une cellulothèque afin de réaliser des ELISPOT groupés pour combiner en une seule expérimentation les tests sur la réactivité des CMN provenant d'individus différents notamment vis-à-vis d'Ag d'un autre génotype parasite.

Pour finaliser les mises au point de la technique ELISPOT, plusieurs aspects doivent encore être abordés :

- Tester un autre lysat de *T. gondii*.

Habituellement, ce sont les éléments de *T. gondii* de type I qui sont utilisés pour la conception ou la fabrication des tests. Or, nous souhaitons utiliser le lysat parasitaire de *T. gondii* de type II afin de nous rapprocher de la biologie de la toxoplasmose congénitale où ce génotype est le plus fréquemment rencontré (cf. chapitre 1.3.2.2).

D'une façon plus générale, nous pouvons supposer que, malgré de fortes similitudes, les légères variations structurales des composés antigéniques majeurs des types I et II de *T. gondii* peuvent être responsables de différences dans la réponse immune. Ceci a été décrit pour les SAG (SAG 1, SAG 2 et SAG 3) où des différences ont été remarquées entre les Ag des trois principaux types de *T. gondii* malgré une bonne conservation structurale observée par séquençage (Boothroyd *et al.*, 1998). Si nous observons une même réponse sécrétoire des ASC dirigée contre le type I et le type II, nous continuerons le test ELISPOT avec *T. gondii* de type I qui est le plus facile à obtenir et à cultiver (données recueillies auprès du CNR Toxoplasmose).

- Obtenir des cellules i/de personnes en séroconversion toxoplasmique, ii/d'individus ayant été en contact avec des génotypes de toxoplasme différents, et iii/de nouveau-nés.

Ces différentes provenances cellulaires nous permettraient de :

i/supprimer (peut être) l'étape de pré-stimulation et de réaliser une recherche conjointe de cellules productrices d'IgG et d'IgM spécifiques de *T. gondii*. Effectivement, comme l'organisme est stimulé *in vivo* durant la période de séroconversion, nous pourrions profiter de cet état pour réaliser immédiatement l'ELISPOT, comme le suggère la brochure du fournisseur U-CyTech Biosciences (annexe n°3). De plus, durant cette période, comme deux types d'Ig sont produites, les IgG et les IgM, nous pourrions réaliser une double détection qui aurait l'avantage de mettre en évidence soit la population de cellules productrices d'IgM seules, soit celle de cellules productrices d'IgG seules ou encore les deux populations conjointement (Saletti *et al.*, 2013).

ii/valider l'ubiquité du test. Cette étape essentielle est en relation avec le type de parasite sur lequel nous concevons la technique. La technique ELISPOT une fois adaptée étant vouée à être utilisée dans différentes zones géographiques, il est important, et d'autres auteurs le soulignent aussi, d'apprécier en quoi la diversité des génotypes parasitaires infectants

impacte la sensibilité et la spécificité de la méthode ([Kotesha et Noordin, 2010](#) ; [Weiss et al., 2012](#)).

iii/valider notre hypothèse, à savoir si nous pouvons utiliser cette technologie pour détecter les Ac néosynthétisés propres au nouveau-né, IgG et IgM.

L'accès au matériel biologique d'intérêt, à savoir des CMN de personnes en séroconversion toxoplasmique et de nouveau-nés suspectés de toxoplasmose congénitale, est rendu possible par la mise en place de deux études de terrain, CoLa et TOXODIAG, complémentaires l'une de l'autre et décrites ci-après.

Enfin, lorsque la technique sera mieux maîtrisée dans le cadre du diagnostic post-natal, on pourra envisager de compiler les avancées technologiques de la technique ELISPOT utilisant le marquage fluorescent du révélateur final qui permet de réaliser des détections multiples, FluoroSpot ([Mabtech](#) ; [U-CyTech Biosciences](#)), avec les recherches faites sur le terrain, pour réaliser la technique sur de faibles volumes d'échantillons ([Weiss et al., 2012](#) ; [Saletti et al., 2013](#)) et en compressant les étapes finales de révélation ([Saletti et al., 2013](#)).

Nous pouvons également aborder l'ELISPOT selon d'autres modalités. Après avoir revêtu la membrane de l'ELISPOT avec un Ac anti-Ig, les CMN sont déposées puis révélées par un Ag marqué par fluorescence. Cela permettrait, à partir d'une même suspension cellulaire, de détecter plusieurs motifs antigéniques de provenance différente, pour visualiser par exemple une co-infection ou de cibler une infection distincte (comme la maladie de Chagas) suivant l'Ag utilisé, ou encore de révéler des isotypes d'Ac différents (IgG, IgM, IgA) ou de différentes sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) grâce à la détection multiple décrite récemment ([Jahnmatz et al., 2016](#) ; [Jahnmatz et Ahlborg, 2018](#)).

En dehors du cadre du diagnostic, L'ELISPOT pourrait être utilisé pour une exploration approfondie de la réponse immune du nouveau-né. Cette technique offre en effet le moyen d'apprécier l'affinité des Ac sécrétés par la cellule grâce à l'aspect du spot (bord flou ou net), ainsi que la quantité relative d'Ac produits par la cellule en fonction du diamètre du spot (beaucoup ou peu de production), comme l'a testé une équipe sur la production de cytokines par les LyT ([Hesse et al., 2001](#)), et de relier ces informations à la quantité d'Ac retrouvée dans le surnageant de culture ([Vendrell et al., 1992](#) ; [Saletti et al., 2013](#)).

**PARTIE 5 - L'ACCES AU MATERIEL
BIOLOGIQUE D'INTERET**



Cette partie décrit trois études qui nourrissent et/ou contribuent chacune à la poursuite de nos travaux en particulier l'aspect méthodologie ELISPOT. Il s'agit :

- du projet STOPPAM : projet réalisé entre 2007 et 2010 au sein de notre unité, avec utilisation de plasmas pour mener une étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose sur des femmes enceintes au Bénin ;
- des études de terrain CoaLa et TOXODIAG : études en cours, avec recrutement de femmes enceintes au statut sérologique toxoplasmique connu, en vue de la constitution d'une bio-banque.



I-Étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose au Bénin à partir de la cohorte STOPPAM

I-1-L'idée de départ

L'étude séro-épidémiologique de la toxoplasmose au Bénin chez les femmes enceintes est ancillaire à la ligne directrice de mon projet de thèse. Cependant, elle permet i/d'actualiser les chiffres de la séroprévalence toxoplasmique sur la côte atlantique du Bénin, peu renseignée (Rodier *et al.*, 1995 ; Ogouyèmi-Hounto *et al.*, 2014) et apportant un argument supplémentaire à la justification du projet CoaLa décrit dans le chapitre suivant, et ii/de documenter de manière originale les chiffres de séroconversion toxoplasmique au cours de la grossesse.

De plus, la clinique bien documentée des femmes suivies dans ce projet nous permettra d'évaluer le possible impact de la toxoplasmose sur un groupe particulier de femmes enceintes ayant subi un événement fœto-délétère durant leur grossesse. Cette dernière observation nous semblait intéressante pour le projet CoaLa afin d'élargir notre recrutement aux femmes appartenant à ce groupe clinique pour les cas de séroconversion, comme le suggère le pourcentage de toxoplasmose retrouvé dans le contexte des avortements (Abdoli *et al.*, 2017).

I-2-Description de la cohorte STOPPAM

Le projet STOPPAM, bien détaillé par Huynh *et al.*, 2011 a et 2011 b, s'est déroulé entre 2008 et 2010 sur deux sites, la Tanzanie et le Bénin. Une cohorte prospective de femmes enceintes a été constituée pour connaître la période de la grossesse au cours de laquelle l'infection palustre a le plus d'impact sur le poids de naissance ainsi que sur l'anémie maternelle à l'accouchement.

Un millier de femmes ont eu un suivi mensuel clinique, parasitologique et immuno-biologique depuis leur inclusion jusqu'à l'accouchement sur chacun des sites. Le recueil de diverses données cliniques ainsi qu'un suivi échographique ont été effectués durant le suivi. A chaque visite, différents prélèvements biologiques étaient réalisés dont des prises de sang. En dehors des consultations pré-natales (CPN), les consultations d'urgence entraient également dans ce suivi.

Étant coordinatrice du projet, notre unité dispose des données cliniques et des échantillons biologiques des femmes enceintes béninoises ayant participé à cette étude. Le recrutement s'est déroulé dans les villes de Comé, Akodéha et Ouédèmè-Pédah, du district de Comé, à 70km à l'ouest de Cotonou, la capitale économique du Bénin (figure n°36). L'âge moyen des femmes enceintes à l'inclusion était de $26,4 \pm 6,2$ ans, l'âge moyen gestationnel estimé par ultrason était de $17,2 \pm 4,7$ semaines et la co-infection par le VIH concernait 1,9% de femmes.

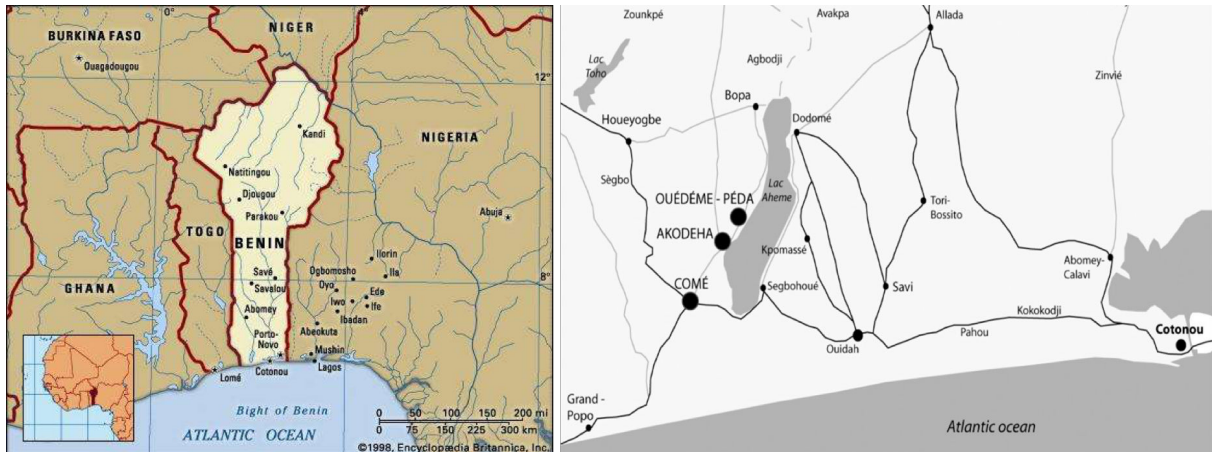


Figure n°36. Situation géographique du Bénin et de la zone de recrutement STOPPAM.

D'après [Huynh et al, 2011 b](#).

I-3-Matériel et méthode

I-3-1-Les échantillons biologiques

Le Comité STOPPAM a donné son approbation pour l'utilisation des échantillons plasmatiques, répartis dans des plasmathèques à Cotonou et à Paris, collectés auprès des femmes enceintes aux deux moments les plus distants du suivi de leur grossesse : l'inclusion et l'accouchement. Les échantillons plasmatiques correspondant à l'inclusion, notés « .1 », serviront à réaliser les sérologies d'IgG anti-*T. gondii* pour déterminer la séroprévalence. Ceux correspondant à l'accouchement, notés « .2 », permettront d'effectuer la cinétique sérologique pour déterminer la séroconversion au cours de la grossesse.

Suite à leur utilisation pour le projet STOPPAM en lui-même, certains échantillons sont épuisés. Pour pallier leur absence et afin d'avoir le maximum d'échantillons exploitables, nous avons d'une part sélectionné en deuxième intention les plasmas collectés à des temps de grossesse n'excédant pas un mois par rapport au temps d'inclusion (également notés « .1 ») ou d'accouchement (« .2 ») et d'autre part récupéré et rassemblé à Paris les échantillons

plasmatiques disponibles se trouvant dans la collection de Cotonou. La stratification du recrutement des femmes et des échantillons disponibles ainsi que les analyses qui sont réalisées dans notre étude rétrospective sont représentées sur la figure n°37.

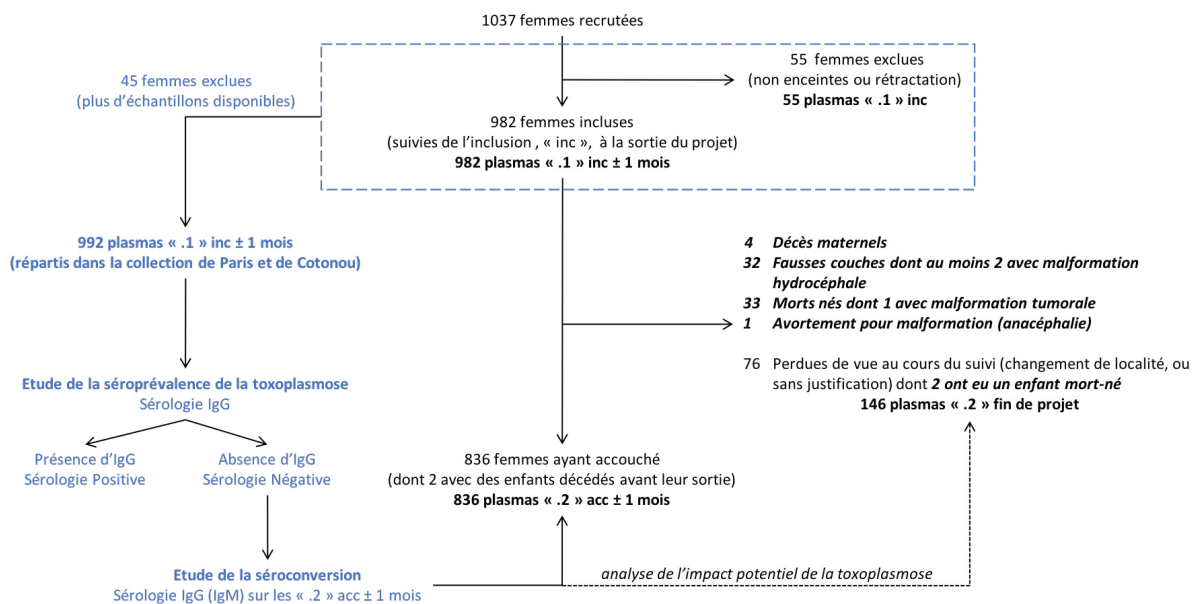


Figure n°37. Déroulé de l'étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose à partir de la cohorte STOPPAM.

En noir : recrutement des femmes pour le projet STOPPAM au Bénin ; en italique gras noir **les évènements pour lesquels la toxoplasmose aurait un potentiel impact**. **En bleu** : illustration de ce qui a été fait pour l'étude sérologique rétrospective avec les plasmas encore disponibles dans nos plasmathèques.

I-3-2-Les techniques sérologiques utilisées

La technique Bio-Plex® Bio-Rad pour l'étude de la séroprévalence

La technologie Luminex, détaillée en annexe n°4, a été utilisée sur les échantillons à l'inclusion. Il s'agit d'un immunodosage multiple qui utilise des billes magnétiques Luminex pour quantifier conjointement plusieurs Ac à partir d'une faible quantité de matériel biologique (Houser, 2012). Nous avons utilisé le kit BioPlex®2200 ToRC (**T**oxoplasmose **R**ubéole **C**ytomégalovirus) IgG. Ce kit détecte quantitativement de façon simultanée les IgG anti-*T. gondii* et anti-rubéole et qualitativement les IgG anti-cytomégalovirus (anti-CMV). Notre analyse peut ainsi être étendue à deux autres infections congénitales. La réalisation technique s'est faite dans le service de microbiologie de l'hôpital Saint Louis à Paris, dirigé par le Professeur François Simon, qui dispose de l'automate, a l'expérience de cette technologie et qui a démontré une bonne sensibilité et spécificité de la technique (Guigue *et al.*, 2014).

Une étape préparatoire a consisté à décongeler et aliquoter tous les plasmas correspondant au temps de l'inclusion. La prise d'essai était comprise entre 50 et 60µl en veillant à prendre le moins de débris possibles notamment le fibrinogène.

Les plasmas ont été entreposés à -20°C sur site, et centrifugés 10 min à 10 000 tours/min à +4°C après décongélation et avant passage sur l'automate. Environ 2/3 des plasmas ont été analysés sans difficulté par l'automate. Le tiers restant a nécessité les interventions suivantes : i/première centrifugation 10 min à 10 000 tours/min à +4°C, ii/dans un nouveau tube, dilution au 1/3 dans 90µl de volume final avec du tampon de lavage, iii/deuxième centrifugation 10 min 10 000 tours/min à +4°C et enfin iv/passage sur l'automate.

Au total, 960 plasmas ont été analysés dont 603 sans dilution et 357 dilués au 1/3. Les valeurs seuils pour cette technologie sont présentées dans le tableau n°7.

	Négatif	Douteux	Positif
IgG anti- <i>Toxoplasma</i> (UI/ml)	≤ 9	10 - 11	≥ 12
IgG anti-rubéole (UI/ml)	≤ 7	8 - 9	≥ 10
IgG anti-CMV (AI)	≤ 0,8	0,9 - 1	≥ 1,1

Tableau n°7. Valeurs seuils du kit BioPlex®2200 ToRC IgG.
UI : unité internationale ; AI : *antibody indice*

La technique Platelia™ Bio-Rad pour l'étude de séroconversion à *T. gondii*

Pour cet aspect de l'étude, seuls les plasmas correspondant à l'accouchement ou à la fin de suivi du projet, des femmes pour lesquelles à l'inclusion le résultat de la recherche d'IgG anti-*T. gondii* est négatif ou douteux (échantillon testé dilué ou non dilué), ont été pris en compte.

Pour cette recherche, nous utilisons le kit Platelia™ Toxo IgG (Bio-Rad) en suivant les recommandations du fournisseur. Il s'agit d'une méthode immunoenzymatique quantitative de type ELISA indirect pour rechercher les IgG anti-*T. gondii* dans le sérum ou le plasma. Brièvement, les puits d'une plaque 96 puits sont recouverts de lysat parasite de la souche *T. gondii* de type I (souche RH). Après avoir déposé le plasma dilué au 1/21^{ème} ou les témoins du kit, laissé incuber 1h à 37°C, puis lavé les puits, un Ac de souris anti-IgG humaine monoclonal spécifique conjugué à la peroxydase est ajouté à la plaque. Le conjugué non lié est éliminé par lavages puis le complexe Ag-Ac est révélé grâce au TétraméthylBenzidine

(TMB). La réaction enzymatique est stoppée avec une solution d'acide sulfurique. Puis la plaque est lue par un spectrophotomètre à 450/620nm. La densité optique détectée dans les puits des échantillons est proportionnelle à la quantité d'IgG anti-*T. gondii* présente dans les échantillons témoins.

Ce travail est effectué en collaboration avec l'équipe du laboratoire de parasitologie du Pr Sandrine Houzé à l'hôpital Bichat Claude-Bernard à Paris. Nous allons analyser 370 plasmas avec le kit Platelia™ Toxo IgG dont les valeurs seuils sont indiquées dans le tableau n°8.

	Négatif	Douteux	Positif
IgG anti- <i>Toxoplasma</i> (UI/ml)	≤ 6	6 - 9	≥ 9

Tableau n°8. Valeurs seuils du kit Platelia™ Toxo IgG.

I-4-Les résultats préliminaires et interprétations

La figure n°38 montre le devenir des échantillons avant l'analyse des données sérologiques.

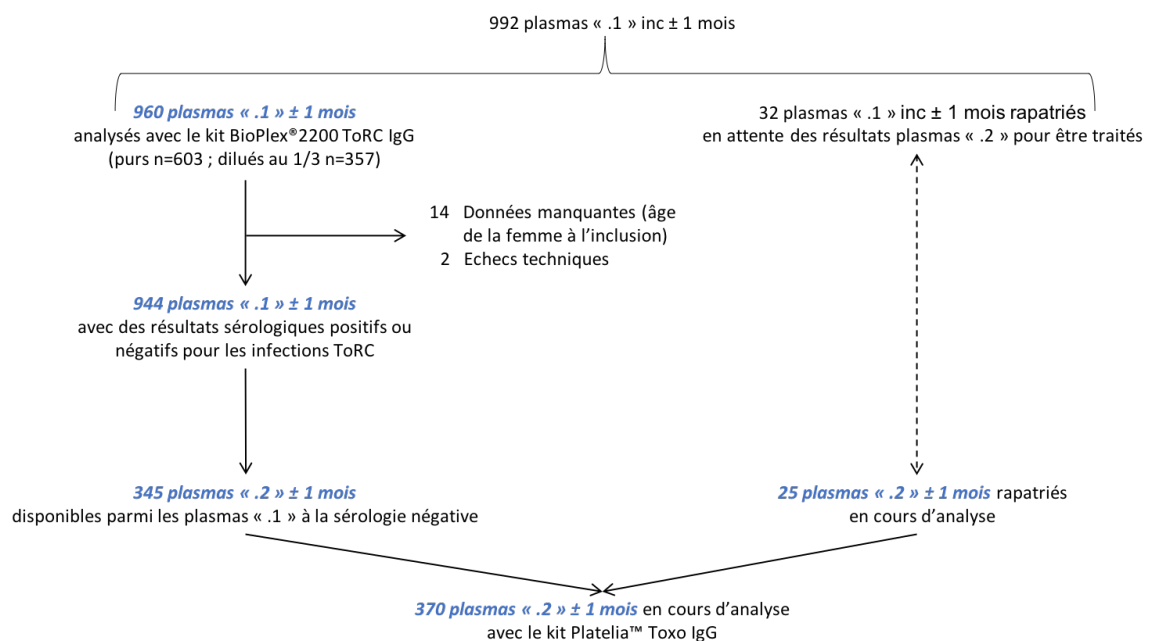


Figure n°38. Diagramme de flux du devenir des échantillons.

Le kit BioPlex®2200 ToRC IgG nous permet d'avoir les données des infections ToRC. Nous pouvons calculer la séroprévalence pour ces trois infections, notamment la toxoplasmose, en prenant garde à l'interprétation des résultats issus de la dilution au 1/3.

Bien que l'exclusion des données des échantillons dilués ne modifie pas les résultats finaux (cf. tableau n°9), nous avons quand même établi des règles pour l'interprétation de ces cas précis, à savoir :

- la positivité d'un échantillon est acquise qu'il soit dilué ou non ;
- les échantillons dilués ayant un résultat douteux sont systématiquement reclassés dans le groupe des positifs ;
- pour la toxoplasmose et la rubéole, les échantillons dilués pour lesquels nous observons respectivement des valeurs <3 et 3 UI/ml ou <1 et 1 UI/ml, sont laissés dans le groupe des négatifs, dans les autres cas les échantillons sont considérés positifs.

Dans la mesure où la séroprévalence pour le CMV est de 100%, le tableau n°9 illustre uniquement les résultats obtenus pour la toxoplasmose et la rubéole. Lorsque le même système de calcul est appliqué sur la population fractionnée par tranches d'âges, nous obtenons une répartition des séroprévalences telle que présentée dans le tableau n°10.

Séroprévalence en % (nombre d'échantillons)				
Toxoplasmose	Douteux	Neg	Pos	Total
Echantillons dilués et non dilués	0,8 (8)	46,4 (438)	52,8 (498)	100 (944)
Echantillons non dilués	0,8 (5)	46,4 (276)	52,8 (314)	100 (595)
Application des règles	0,5 (5)	44,5 (420)	55,0 (519)	100 (944)
Rubéole	Douteux	Neg	Pos	Total
Echantillons dilués et non dilués	1,5 (14)	25,1 (237)	73,4 (693)	100 (944)
Echantillons non dilués	0,7 (4)	24,4 (145)	75,0 (446)	100 (595)
Application des règles	0,4 (4)	22,1 (209)	77,4 (731)	100 (944)

Tableau n°9. Séroprévalence de la toxoplasmose et de la rubéole.

Séroprévalence en % (nombre d'échantillons) en fonction de l'âge												
	15-24 ans				25-34 ans				35-45 ans			
	Douteux	Neg	Pos	Total	Douteux	Neg	Pos	Total	Douteux	Neg	Pos	Total
Toxoplasmose												
Echantillons dilués et non dilués	0,8 (3)	54,9 (208)	44,3 (168)	100 (379)	1,2 (5)	43,2 (187)	55,7 (241)	100 (433)	0 (0)	32,6 (43)	67,4 (89)	100 (132)
Echantillons non dilués	0,4 (1)	54,4 (124)	45,2 (103)	100 (228)	1,5 (4)	44,2 (121)	54,4 (149)	100 (274)	0 (0)	33,3 (31)	66,7 (62)	100 (93)
Application des règles	0,3 (1)	52,2 (198)	47,5 (180)	100 (379)	0,9 (4)	41,8 (181)	57,3 (248)	100 (433)	0 (0)	31,1 (41)	68,9 (91)	100 (132)
Rubéole												
Echantillons dilués et non dilués	1,3 (5)	29,8 (113)	68,9 (261)	100 (379)	0,9 (4)	24,5 (106)	74,6 (323)	100 (433)	3,8 (5)	13,6 (18)	82,6 (109)	100 (132)
Echantillons non dilués	0,4 (1)	31,6 (72)	68,0 (155)	100 (228)	0,4 (1)	22,6 (62)	77,0 (211)	100 (274)	2,2 (2)	11,8 (11)	86,0 (80)	100 (93)
Application des règles	0,3 (1)	27,4 (104)	72,3 (274)	100 (379)	0,2 (1)	20,8 (90)	79,0 (342)	100 (433)	1,5 (2)	11,4 (15)	87,1 (115)	100 (132)

Tableau n°10. Séroprévalence de la toxoplasmose et de la rubéole suivant l'âge des femmes enceintes.

La notion de dilution des plasmas impacte peu les données de séroprévalence des infections ToRC, durant la période 2008-2010, dans la région du sud Bénin, qui sont de l'ordre de 53% pour la toxoplasmose, 75% pour la rubéole et 100% pour l'infection au CMV. Ces données témoignent d'une certaine constance des chiffres avec une légère diminution du taux de séroprévalence pour la rubéole depuis 1995. Effectivement, bien que leurs données provenaient d'une population suivie dans une clinique cotonoise, [Rodier et al.](#) avaient observé à cette période des taux de 53,6% pour la toxoplasmose, 85,8% pour la rubéole et 97,2% pour l'infection au CMV. Des données plus récentes sur la toxoplasmose d'[Ogouyemi-Hounto et al.](#) datant de 2012 et provenant du Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant de la Lagune (CHU-MEL) à Cotonou, montraient quant à eux une séroprévalence de 48,9% dans une autre population de femmes enceintes.

Bien que cette diminution soit minime, plusieurs paramètres peuvent l'expliquer mais demandent à être explorés, on peut notamment mentionner :

-la prise du TPIp-SP de mieux en mieux suivie depuis son instauration à la fin des années 1990 et qui pourrait avoir un impact avec une baisse de l'infection par *T. gondii* lors de la grossesse comme mentionné dans le chapitre « Traitement de la toxoplasmose congénitale ».

-la différence de la séroprévalence de la toxoplasmose entre les régions au sein d'un même pays ainsi qu'entre les milieux ruraux et urbains au sein d'une même région, comme mentionné dans la partie « Contexte scientifique ». Les résultats de [de Paschale et al.](#), publiés en 2014, le prouvent avec 30% de femmes enceintes séropositives en 2011 dans une région rurale du nord Bénin, les séroprévalences de ces mêmes femmes pour la rubéole et l'infection au CMV étant respectivement de 94% et 100%.

Une dernière lecture de nos résultats montre une augmentation de la séroprévalence suivant l'âge, qui reflète ce qui est décrit et acquis dans la littérature scientifique sur la thématique de la toxoplasmose.

Actuellement, l'étude des plasmas collectés en fin de suivi, accouchement ou dernier prélèvement avant la sortie du programme, des femmes enceintes qui ont eu une sérologie négative à la toxoplasmose à l'inclusion, est en cours de réalisation. Les plasmas des femmes

pour lesquelles une évolution du taux d'IgG sera observée seront réexaminés en parallèle du premier prélèvement et un dosage d'IgM sera ajouté (kit Platelia™ Toxo IgM, Bio-Rad). Concernant les 25 plasmas « .2 » de la collection de Cotonou (cf. figure n°38), si les résultats sérologiques sont positifs à la toxoplasmose, les points d'inclusion ± 1 mois seront repris pour ces cas. Ces dernières données nous permettront d'avancer un chiffre sur le taux de séroconversion durant la grossesse dans le district de Comé du sud Bénin et d'étudier la corrélation possible entre évènements indésirables sur le fœtus durant la grossesse et toxoplasmose.

Ainsi, les résultats de la séoprévalence et de la séroconversion de la toxoplasmose associés à la clinique des femmes incluses dans l'étude STOPPAM pourront être valorisés dans une publication scientifique.

II-Projet CoaLa : étude de terrain au Bénin sur la toxoplasmose en fin de grossesse

II-1-But du projet et choix géographique

Ce projet a été construit en parallèle du projet TOXODIAG, décrit ci-après, et réalisé pour un recrutement de femmes enceintes à Cotonou au Bénin, où notre unité de recherche dispose d'une implantation secondaire depuis 2004 et entretient des collaborations de longue date avec des cliniciens et scientifiques béninois. CoaLa a été conçu pour nous permettre d'accéder à des CMN de femmes enceintes suspectées de séroconversion toxoplasmique et de leurs nouveau-nés suspectés de toxoplasmose congénitale causées par des souches de *T. gondii* circulant en Afrique de l'Ouest. L'obtention de ces cellules est nécessaire pour la poursuite de notre adaptation de l'ELISPOT et de notre réflexion générale sur les Ig du nouveau-né.

Le choix du Bénin a été conditionné pour les raisons suivantes : i/la circulation de génotypes parasitaires différents de ceux rencontrés en France, ii/une autre politique de santé relative au suivi de la toxoplasmose pendant la grossesse, iii/la présence de l'implantation secondaire de notre unité et les collaborations béninoises déjà existantes et iv/la concrétisation en autonomie d'une dynamique « terrain », élément précieux pour mon parcours professionnel.

II-2-Les étapes antérieures au terrain

Demandes de financements

Afin de pouvoir mener à bien ce projet, j'ai rédigé en 2016 des dossiers pour une demande de bourse au Groupe Pasteur Mutualité et une demande de subvention à la Fondation Mérieux. C'est grâce au budget alloué, en 2017, par l'Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée-Fondation Internationale Léon Mba (IMEA) que le projet CoaLa a pu se dérouler durant les mois de février, mars et avril 2018 au Bénin.

Éthique

Le projet CoaLa, soumis au Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé (CNERS) du Bénin, avec avis d'experts dans le domaine, a reçu l'autorisation de mise en œuvre de la recherche (annexe n°5).

Protocole de Nagoya

Conformément au Protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation, accord international sur la biodiversité, je me suis rapprochée de la personne correspondante nationale compétente,

dite « point focal », du Bénin pour constituer et soumettre le dossier pour l'accès et le partage des avantages (APA).

II-3-La mission CoaLa

II-3-1-Cadre de l'étude

La mission s'est déroulée du 4 février au 4 mai 2018 à Cotonou au Bénin. Le recrutement des femmes enceintes s'est réalisé au CHU-MEL dans le service de gynécologie-obstétrique dirigé par le Pr René-Xavier Perrin. Recrutée pour le projet, une infirmière-enquêtrice diplômée d'État était chargée d'informer les femmes enceintes de l'étude et de réaliser les prélèvements sanguins de pré-inclusion lors des CPN de fin de grossesse. Secondée par les sages-femmes de la salle d'accouchement, elle réalisait également les prélèvements sanguins des couples mère-enfant(s) (sang périphérique de la mère et sang de cordon), ainsi qu'un prélèvement de placenta suivant les cas. Enfin, elle acheminait les prélèvements au laboratoire partenaire, dirigé par le Pr Achille Massougbodji, à la Faculté des Sciences de la Santé (FSS) où je les prenais en charge (figure n°39).

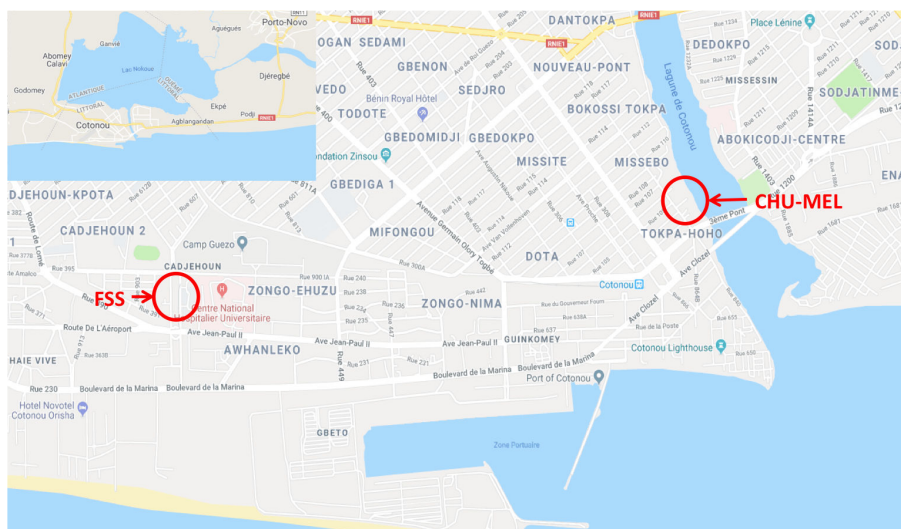


Figure n°39. Situation géographique des sites de travail.

II-3-2-Méthode d'étude

II-3-2-1-Population cible et constitution des groupes

Le recrutement des couples mère-enfant a tenu compte des données sanitaires de 2008-10 pour le CHU-MEL qui enregistre en moyenne 300 accouchements par mois ([Seventh Framework Programme, 2010](#)). Ce flux moyen de patientes permettait de pré-inclure 500 femmes adhérentes à l'étude en leur proposant un test sérologique de la toxoplasmose,

couvrant la détection des IgG et IgM spécifiques du parasite. Les femmes enceintes concernées étaient celles qui venaient en CPN pour le dernier bilan de grossesse précédant leur accouchement, soit à partir de 7 mois de grossesse, ce choix étant justifié par le fait que nous ne pouvions réaliser un suivi de grossesse.

Suivant les données d'[Ogouyèmi-Hounto et al.](#), sur les 500 femmes pré-incluses, environ 250 femmes étaient attendues séropositives en IgG (IgG pos) avec une majorité de séronégatives en IgM (IgM neg) et ainsi considérées comme ayant développé une immunité contre une infection ancienne par *T. gondii*.

L'autre moitié des femmes (n= 250) était attendue séronégative en IgG (IgG neg), et pour une majorité d'entre elles également IgM neg. Ce groupe était considéré comme n'ayant pas eu de contact avec le toxoplasme.

Toujours d'après [Ogouyèmi-Hounto et al.](#) où 1,2% de séroconversion a été observé au cours de la grossesse, sur un effectif de 266 femmes, il était attendu qu'environ 5 femmes présenteraient un profil IgM positif associé ou non à la présence d'IgG, signant un contact récent avec *T. gondii*.

Grâce aux résultats sérologiques obtenus suite au prélèvement de pré-inclusion, une liste de femmes a été dressée suivant les 3 conditions citées plus haut. Les premières femmes qui accouchaient étaient incluses dans le projet et différents prélèvements étaient réalisés. Elles rentraient dans un des groupes « Toxo Pos », « Toxo Neg » ou « Toxo Seroco » selon qu'elles remplissaient l'un des 3 critères sérologiques comme l'illustre la stratégie de recrutement résumée dans le diagramme de flux présenté dans la figure n°40.

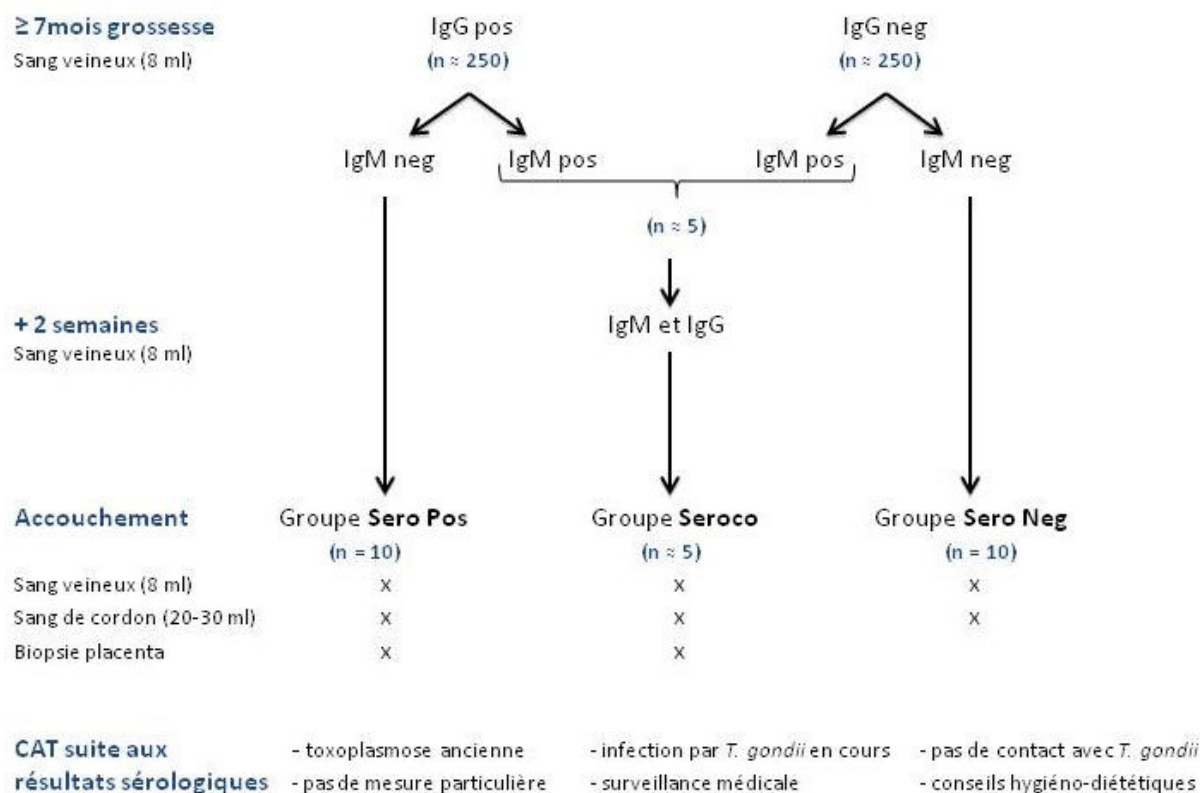


Figure n°40. Diagramme de flux des recrutements du projet CoaLa.

(CAT : Conduite à tenir)

II-3-2-2-Logistique du recrutement et prélèvements effectués

CPN précédant l'accouchement

Durant les CPN, en lien avec le corps médical, l'infirmière-enquêtrice identifiait les femmes en fin de grossesse pour les convoquer et, aidée de ses compétences linguistiques, leur expliquer oralement le projet CoaLa de façon claire. Les critères d'inclusion étaient vérifiés avant de poursuivre la pré-inclusion : âge ≥ 18 ans, grossesse ≥ 7 mois et cliniquement non compliquée, accouchement prévu à la maternité et lieu de résidence proche du CHU-MEL. Une fiche d'information et une autre fiche résumant quelques recommandations hygiéno-diététiques simples leur étaient remises et un questionnaire était rempli.

Pour les femmes désireuses d'être pré-incluses, nous leur demandions de signer un consentement éclairé nous autorisant à i/pratiquer le jour même un prélèvement veineux au pli du coude, pour effectuer le test sérologique de la toxoplasmose, ii/la convoquer pour une sérologie de contrôle sous 2 semaines en cas de sérologie évocatrice d'un contage récent de la toxoplasmose et iii/pratiquer le jour de l'accouchement, si celui-ci est eutocique, un nouveau prélèvement veineux ainsi qu'un prélèvement de sang de cordon et, dans le cas des femmes des groupes « Toxo Pos » et « Toxo Seroco », un prélèvement d'un fragment de

placenta, sachant que ces deux derniers échantillons pouvaient être refusés sans exclusion de la mère de l'étude. Les modèles de ces documents se trouvent en annexe 6.

Nous les assistions dans le renseignement des documents à remplir et les rassurions en nous tenant à leur disposition si toutefois elles avaient des questions.

Conduite tenue entre la dernière CPN et l'accouchement

Les examens sérologiques étaient effectués et les femmes dont la sérologie évoquait une séroconversion (IgM Pos et IgG Pos/Neg) étaient reconvoquées gracieusement pour une sérologie de contrôle. Cette dernière aurait confirmé une séroconversion si un maintien ou une diminution des IgM spécifiques conjointe à une apparition ou une augmentation des IgG spécifiques étaient apparus.

Accouchement

Pour les femmes ayant intégré les groupes « Toxo Pos », « Toxo Neg » ou « Toxo Seroco », un prélèvement de sang périphérique au pli du coude était pratiqué au moment de l'accouchement.

Après la naissance de l'enfant et avant la délivrance du placenta, un clampage du cordon était réalisé pour permettre le prélèvement dans la veine ombilicale sans intervention sur le nouveau-né et la mère.

Enfin, un prélèvement de placenta était effectué dans le cas des femmes des groupes « Toxo Pos » et « Toxo Seroco ».

II-3-3-Activités au laboratoire

II-3-3-1-Echantillonnage

Frottis et goutte épaisse

Un frottis en couche mince et une goutte épaisse ont été réalisés sur les prélèvements des femmes incluses afin de vérifier si elles étaient infectées par *Plasmodium*, parasite responsable du paludisme, au moment de l'accouchement.

Un frottis en couche mince a été réalisé sur les prélèvements de sang de cordon afin de pouvoir vérifier ultérieurement la non contamination par le sang de la mère, par la technique de Kleinhauer-Betke basée sur la propriété acido-résistante de l'hémoglobine fœtale.

Conditionnement des plasmas

Les plasmas ont été conditionnés sous forme d'aliquotes et stockés à -20°C après centrifugation (10 min, 1 500 tours/min) des tubes de sang, prélevés sur Vacutainer® EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) lors des CPN ou sur Vacutainer® CPDA lors de la reconvoction ou au moment de l'accouchement (mère et sang de cordon).

Ils nous permettent de réaliser en première intention la sérologie de la toxoplasmose selon la technique utilisée sur le terrain décrite ci-après.

Conditionnement des CMN

Les CMN des femmes reconvoquées, des femmes incluses et du sang de cordon ont été isolées suivant le mode opératoire de la technique ELISPOT décrit plus haut, et conditionnées sous forme d'aliquotes dans l'azote liquide.

Elles seront utilisées ultérieurement pour la suite de l'optimisation de la technique ELISPOT.

Conditionnement de l'ADN de *T. gondii*

Dans l'optique de réaliser un génotypage de *T. gondii*, si toutefois sa présence est fortement suspectée, les prélèvements de fragment de placenta ont été broyés et le matériel génétique extrait, comme décrit ci-après.

II-3-3-2-Sérologie de la toxoplasmose

J'ai utilisé une technique immuno-enzymatique ELISA, avec les kits recomWell *Toxoplasma* IgG et recomWell *Toxoplasma* IgM (Mikrogen Diagnostik), pour faire un pré-criblage sérologique des femmes enceintes lors de leur dernière CPN.

Les plaques utilisées sont recouvertes de 5 Ag recombinants immunodominants de tachyzoïtes et de bradyzoïtes : ROP1 (66 kDa), MAG1 (65 kDa), rSAG1 (30 kDa), GRA7 (29 kDa) et GRA8 (35 kDa). Ce panel d'Ag dans un même test, reflétant la cinétique d'apparition des Ag durant le cycle parasitaire, permet de détecter à la fois une réponse précoce et tardive vis à vis de la toxoplasmose.

La différence entre les deux kits utilisés, recomWell *Toxoplasma* IgG et recomWell *Toxoplasma* IgM, se situe au niveau des contrôles et des Ac conjugués, respectivement anti-IgG humaine

et anti-IgM humaine. La recherche d'IgG et d'IgM s'est faite en parallèle et les instructions données dans le manuel d'utilisation ont été suivies.

Brièvement, après avoir préparé le tampon de lavage et le conjugué, 5µl de plasma ou de contrôles sont dilués dans 500µl de tampon de dilution. 100µl de chaque dilution sont déposés par puits et la plaque est incubée une heure à 37°C. Après les lavages, 100µl d'Ac conjugué sont déposés dans chaque puits et la plaque est mise 30 min à 37°C. La plaque est ensuite relavée et après avoir bien enlevé le tampon de lavage, 100µl de substrat chromogène (TMB) sont ajoutés et laissés 30 min à l'obscurité à température ambiante. La réaction est stoppée avec 100µl d'une solution d'arrêt d'acide phosphorique.

Enfin, la lecture de la plaque au spectrophotomètre s'est faite sur l'automate Infinite® F200Pro (Tecan) à 450 nm contre un filtre de référence à 620 nm par défaut (650 nm dans le mode opératoire) et les résultats ont été récupérés grâce au logiciel i-control™ 1.10 (Tecan).

Les valeurs seuils de la technique sont indiquées dans le tableau n°11 et un calcul avec des coefficients propres à chaque kit doit être appliqué aux valeurs des IgG pour transformer les unités/ml (U/ml) en UI/ml.

	Négatif	Douteux	Positif
IgM (U/ml)	<20	20 - 24	>24
IgG (U/ml)	<20	20 - 24	>24
IgG (UI/ml)	<3	3 - 3,9	>3,9

Tableau n°11. Valeurs seuils du test recomWell *Toxoplasma*.

Comme recommandé par le CNR Toxoplasmose et en collaboration avec l'équipe du laboratoire de parasitologie du Pr Sandrine Houzé, un dosage sérologique de la toxoplasmose, effectué avec une autre technique, est réalisé sur les plasmas des femmes vues durant leurs CPN ainsi que des couples mère/enfant(s) appartenant aux différents groupes constitués durant le projet. Nous pratiquons notamment un test de dépistage du statut immunitaire qui utilise une technique ELISA avec une détection par fluorescence, ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) grâce aux kits VIDAS® TOXO IgGII et VIDAS® TOXO IgM (Biomérieux).

Le principe de cette technologie est la suivante : le kit est composé d'une barrette de 10 puits, un puits de dépôt, 8 puits représentatifs de chaque étape de l'ELISA et un puits de lecture, et

d'un cône SPR® (*Solid Phase Receptacle*) dont l'intérieur est revêtu soit d'Ag, soit d'Ac et qui sert à la fois de phase solide et de système de pipetage.

Brièvement, l'échantillon est déposé dans le premier puits de la cartouche avec un cône normal qui permet de diluer l'échantillon. Puis il est pipeté avec le cône SPR® aux parois duquel les Ig vont se fixer. Ensuite, le cône recouvert de complexe immun évolue de puits en puits jusqu'au puits de lecture. La figure n°41 illustre ce processus qui, en incluant le rendu des résultats, est automatisé.

Figure n°41. Technologie du test unique VIDAS®.
Source : <http://www.biomerieux.fr/> (consulté en août 2018).

Dans le kit VIDAS® TOXO IgGII, le cône SPR® est revêtu d'Ag toxoplasmiques membranaire et cytoplasmique. Toutes les IgG spécifiques de ces Ag vont se fixer à la paroi du cône SPR®. Puis l'Ac conjugué, qui se trouve dans le puits n°6 et qui est un Ac monoclonal de souris anti-IgG humaine marqué à la phosphatase alcaline, se fixe sur le complexe immun formé.

Dans le kit VIDAS® TOXO IgM (Biomérieux), le cône SPR® est revêtu d'Ac polyclonaux de chèvre anti-chaîne μ (mu). Toutes les IgM vont se fixer à la paroi du cône SPR®, puis l'immun complexe, composé d'Ag de toxoplasme inactivé et d'Ac monoclonal de souris anti-P30 conjugué à la phosphatase alcaline, et qui se trouve dans le puits 6 va se fixer sur les IgM spécifiques anti-SAG1.

Les valeurs seuils des kits sont mentionnées dans le tableau n°12.

	Négatif	Douteux	Positif
IgM (indice)	<0,55	0,55 – 0,65	>0,65
IgG (UI/ml)	<4	4 - 8	>8

Tableau n°12. Valeurs seuils des kits VIDAS® TOXO.

II-3-3-Extraction d'ADN des prélèvements de placenta

Choix du placenta

Pour notre étude, deux types d'échantillons biologiques, le liquide amniotique ou le placenta, pouvaient servir pour accéder à l'ADN parasitaire, afin de réaliser des techniques de biologie moléculaire, pour mettre en évidence et identifier la présence de *T. gondii* mais surtout pour réaliser un génotypage afin de connaître la souche de *T. gondii* responsable de l'infection (HAS, 2017). Notre choix s'est porté sur le placenta, plus adapté au travail pratique de terrain. De plus comme le montre la figure n°42, cet organe donne d'assez bons résultats pour le génotypage du parasite et se trouve être l'endroit privilégié de *T. gondii* par rapport au liquide amniotique et au sang circulant, de la mère ou du cordon (Robert-Gangneux *et al.*, 2011).

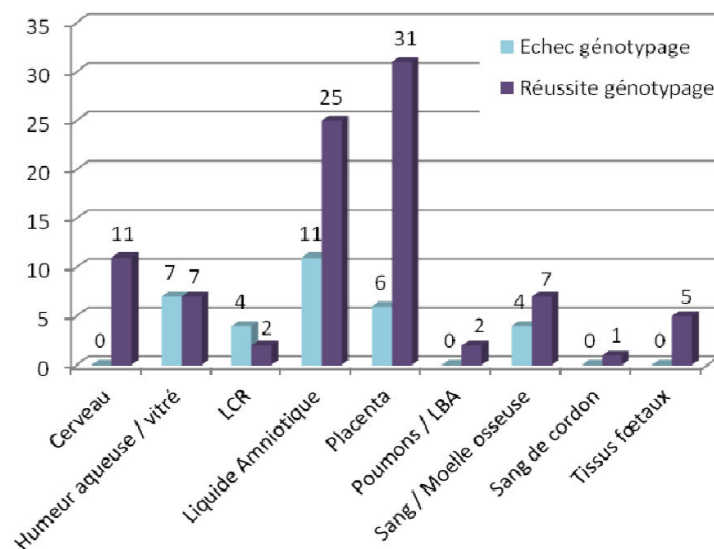


Figure n°42. Taux de réussite du génotypage de *T. gondii* en fonction de l'origine des échantillons biologiques. Sources : CNR Toxoplasmose, 2017.

Le protocole proposé par le CNR Toxoplasmose (CNR Toxoplasmose, 2011) indique qu'une fois le placenta entier transmis au laboratoire, il faut prélever plusieurs endroits de l'organe, en excluant l'enveloppe et les parties nerveuses, pour atteindre entre 50 à 200g de tissus. Comme en Afrique de l'Ouest, certaines traditions entourent le placenta, l'accès à cet organe est possible mais délicat. C'est pour cette raison que nous avons opté pour un micro-prélèvement au moment de la délivrance afin de rendre le placenta à la maman dans le

meilleur état d'intégrité possible. Il fallait prélever au moins un cotylédon, partie du placenta où la présence du parasite est la plus probable car cumulant les deux types cellulaires vus précédemment, le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste.

Traitement des prélèvements placentaires

Les fragments placentaires sont pesés avant d'être traités. Ils sont ensuite broyés avec un appareil électrique, qui est décontaminé entre chaque utilisation, ou avec un broyeur manuel après avoir coupé le prélèvement en petits morceaux avec des ciseaux stériles. Le broyat est ensuite récupéré dans un pot ou un tube de 50ml stérile où 1ml de trypsine 0,5% (Gibco) est ajouté. On laisse une heure au bain-marie à 37°C en remuant de temps en temps. La pâte organique est récupérée dans une gaze stérile que l'on presse pour récupérer le filtrat dans un tube de 12ml. Puis on centrifuge 10min à 3000 tours/min. Le surnageant est jeté et le culot est réparti en 200µl d'aliquotes pour l'extraction d'ADN. Les culots (≈200µl) des prélèvements suspectés de contenir du parasite sont conservés avec 50µl de pénicilline/streptomycine (10 000U/ml, 10 000µg/ml, Gibco) et du SVF/DMSO (400µl/200µl).

Extraction de l'ADN

Nous avons utilisé le kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), comme le recommande le CNR Toxoplasmosse ([CNR Toxoplasmosse, 2011](#)) et avons suivi le protocole du fournisseur.

Brièvement, le broyat est laissé une heure à 56°C en présence de protéinase K pour être complètement lysé. On ajoute de l'éthanol et un tampon de lyse et on dépose le mélange sur une colonne qui va retenir les acides nucléiques. On réalise plusieurs lavages et on élue les acides nucléiques que l'on récupère dans un volume final de 150µl de tampon d'élution. Les aliquotes sont stockées à -20°C.

II-4-Résultats préliminaires

Constitution des groupes d'étude mère/enfant(s)

Durant la période de recrutement, nous avons dû composer avec les grèves dans le secteur de la santé. Néanmoins, nous avons pré-inclus 106 femmes dont la moyenne d'âge était de 28,5 ans ($\pm 5,4$ ans) et dont le terme à la CPN du 3^{ème} trimestre était de 35 SA + 3 jours (± 2 SA + 2 j). L'inclusion définitive a concerné 25 femmes dont aucune était infectée par le paludisme

au moment de l'accouchement et dont la répartition par groupes d'étude a été la suivante : 12 « Séro Pos », 10 « Séro Nég », et 3 « Séroco possible ».

Sérologie de la toxoplasmose

Les résultats sérologiques obtenus sont présentés selon les deux méthodes qui ont été appliquées aux prélèvements :

- la méthode recomWell utilisée sur le terrain
- la méthode Vidas® utilisée à postériori à titre de contrôle

Sur le terrain, les résultats sérologiques ont guidé la constitution des pré-groupes de femmes enceintes en amont de l'accouchement tel que présenté dans le tableau n°13, après avoir exclus 11 plasmas pour une raison de discordance intra-test (n=95).

Combinaison IgG/IgM	IgG-/IgM-	IgG±/IgM-	IgG±/IgM+	IgG+/IgM±	IgG+/IgM+	IgG+/IgM-
Nb de femmes (n=95)	32	3	1	1	6	52
Pré-groupe Sérologique	Séro Neg	exclues	Séroco possible			Séro Pos
Inclusion = accouchement	10	-	3			12

Tableau n°13. Attribution d'un groupe sérologique suivant les résultats recomWell *Toxoplasma*.

Après vérification des résultats sérologiques de terrain avec la méthode Vidas® pour les 25 femmes incluses à l'accouchement, les groupes sérologiques ont été redéfinis comme l'illustre la figure n°43. Les cas de séroconversions identifiés par la méthode recomWell ne se confirment pas avec la méthode Vidas®.

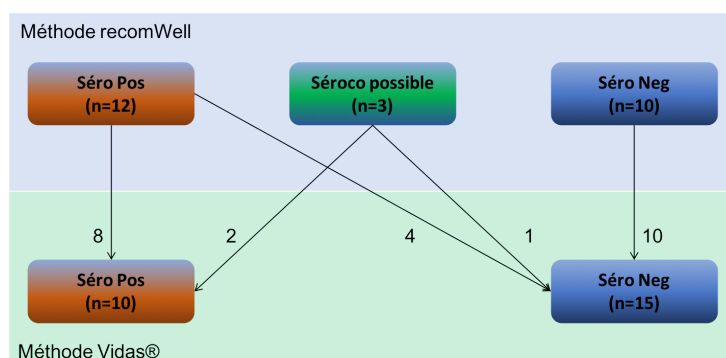


Figure n°43. Constitution des groupes mère/enfant(s) suivant le statut sérologique de la mère.

Par extension aux groupes sérologiques des 95 femmes pré-incluses, les taux de séroprévalence de la toxoplasmose se distribuent différemment selon la méthode utilisée, comme le montre la figure n°44. Les résultats pour les IgM avec la méthode VIDAS® TOXO sont tous négatifs à l'exception de 4 échantillons (deux douteux et deux positifs). Ils ont été testés pour une recherche d'avidité IgG, qui s'est avérée positive, excluant ainsi une infection récente et indiquant la présence d'IgM spécifiques résiduelles, comme décrit dans la littérature.

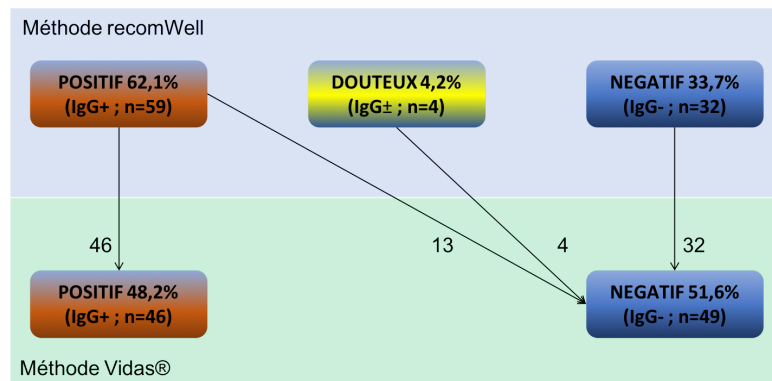


Figure n°44. Séroprévalence de la toxoplasmose suivant la méthode utilisée.

L'observation de la séroprévalence en fonction de l'âge a été réalisée avec les résultats des IgG de la méthode VIDAS® TOXO et est présentée dans le tableau n°14.

Séroprévalence en % (nombre d'échantillons) en fonction de l'âge			
	17-24 ans (n=26)	25-34 ans (n=55)	35-42 ans (n=14)
Positif	34,6% (9)	54,5% (30)	50% (7)
Négatif	65,4% (17)	45,5% (25)	50% (7)

Tableau n°14. Séroprévalence de la toxoplasmose suivant la tranche d'âge.

II-5-Bilan et perspectives

Présence au CHUMEL

Lors des pré-inclusions, j'ai pu constater que les sérologies pour la recherche d'immunisation contre la toxoplasmose sont demandées lors de la première visite de la mère dans un centre hospitalier. Cet examen est réalisé chez la majeure partie des femmes enceintes, cependant le rendu des résultats biologiques est disparate, pouvant aller de « positif/négatif » à un rendu en UI/ml. Le suivi sérologique devient ainsi délicat, d'autant plus que la deuxième prescription pour une sérologie de contrôle est rarement effectuée par faute de moyens. Dans de rares

cas, des sérologies sont demandées alors que la patiente est déjà immunisée, laissant penser à un manque d'informations. Ces observations corroborent celles, non publiées, effectuées par une équipe collaboratrice où parmi les femmes séronégatives vis-à-vis de la toxoplasmose, seulement 4% d'entre elles avaient réalisé au moins une fois un test de contrôle.

Méthode sérologique utilisée

La méthode recomWell, malgré son marquage CE, est en cours de vérification car les résultats obtenus i/fluctuent pour un même échantillon (données exclues des résultats présentés dans ce travail) et ii/diffèrent d'une méthode à l'autre impactant l'attribution d'un individu à un groupe sérologique. Cela remet en cause la robustesse de cette technique sur le terrain où les conditions expérimentales telle que la température des locaux aurait possiblement pu impacter la stabilité des réactifs utilisés. La question du type d'Ag utilisé peut-être soulevée, puisque le kit recomWell utilise un mélange de cinq Ag recombinants alors que le kit VIDAS® utilise du lysat parasitaire (Ag entier).

Collaboration enrichissante

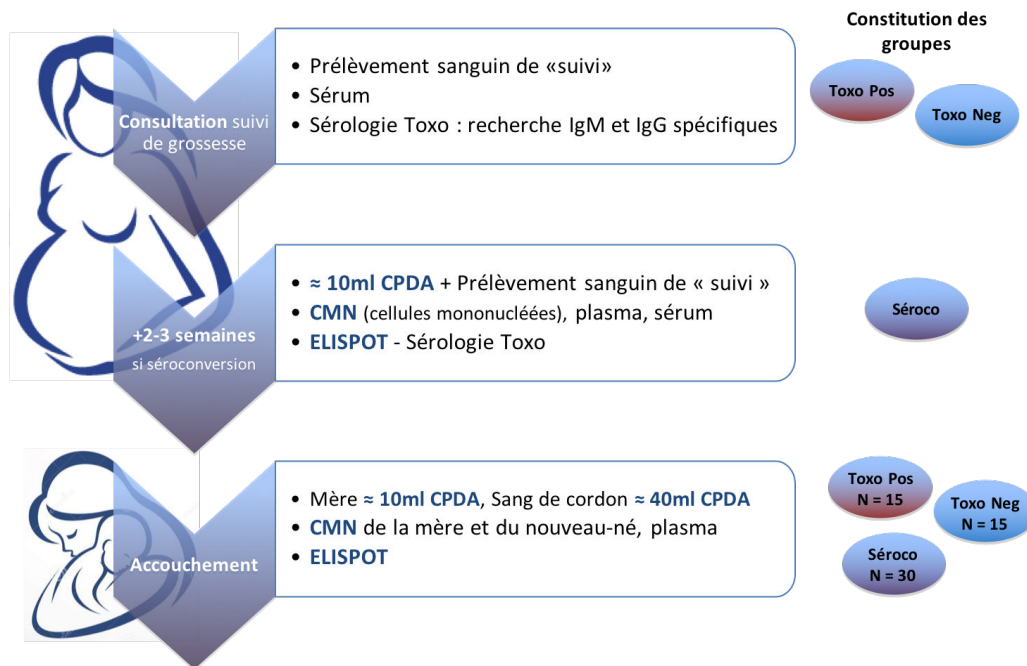
La courte durée de la mission ne m'a pas permis d'accéder à des CMN de femmes enceintes suspectées en séroconversion toxoplasmique et de nouveau-nés suspectés de toxoplasmose congénitale. Cependant, une collaboration soutenue a été mise en place avec nos collaborateurs de l'Université de Limoges, le Pr Marie-Laure Dardé et le Dr Aurélien Mercier, membres du CNR Toxoplasmose, sur deux aspects : l'accès à des cas de séroconversion au CHU-MEL et le partage des données de génotypage de *T. gondii* retrouvé dans les prélèvements placentaires. En effet, dans le cadre d'un travail de thèse intitulé « Étude de la toxoplasmose chez la femme enceinte et le nouveau-né au Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant-Lagune de Cotonou : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques », débuté peu après mon départ de Cotonou, nous pourrions accéder aux cas de séroconversion qui se présenteront durant la grossesse, puisqu'un suivi régulier de femmes enceintes sera assuré pendant une période de 3 ans. Le projet CoLa a fourni, quant à lui, du matériel biologique pour réaliser le génotypage du parasite si sa présence est validée dans les placentas issus du groupe « Séro Pos », où de l'ADN parasitaire est fréquemment retrouvé dans cet organe chimérique bien que l'infection soit ancienne (Kwofie *et al.*, 2016). Ces résultats pourront i/enrichir les bases de données du CNR Toxoplasmose et ii/être recoupés

avec ceux qui seront générés par le projet « IntroTox : Phénomènes d'introggression dans la diversité génétique du toxoplasme entre la France et l'Afrique de l'Ouest et Centrale : des influences humaines et environnementales » et ainsi contribuer à faire le lien et avoir une meilleure compréhension de la circulation du parasite entre l'être humain et son environnement.

III-Essai clinique TOXODIAG : étude de terrain en Ile de France sur la toxoplasmose au cours de la grossesse

III-1-Conception du projet

De même que pour le projet CoaLa, cet essai clinique, reposant sur un recrutement en Ile de France de couples mère/enfant(s) dans le cadre de la toxoplasmose, vise à recueillir du matériel biologique nécessaire à la poursuite de notre investigation sur l'étude des Ac du nouveau-né. Sa réalisation s'adosse au dispositif de surveillance de la toxoplasmose chez les femmes enceintes instauré en France (cf. Contexte scientifique, chapitre II-1-2). Il nous a semblé intéressant de pouvoir bénéficier de ce système de prévention qui permet d'identifier les femmes qui ont déjà eu la toxoplasmose, celles qui ne l'ont pas contractée et celles qui font une infection active.



d'après JP Com.B events, 1^{ère} journée d'infectiologie périnatale 2017 et <https://www.dreamstime.com>

Figure n°45. Diagramme de flux du projet TOXODIAG. Présenté lors du séminaire annuel du DHU Risques et Grossesse, septembre 2017.

Il s'agit de constituer 3 groupes de couples mère/enfant(s) dont 2 groupes témoins :

Groupe Toxo Pos : femmes enceintes étant déjà immunisées contre la toxoplasmose

Groupe Toxo Neg : femmes enceintes non immunisées contre la toxoplasmose

Groupe Séroco : femmes enceintes dont la sérologie toxoplasmique se positive durant la grossesse.

Comme le montre la figure n°45, les femmes enceintes sont pré-identifiées dans les maternités au moment de leur suivi prénatal, grâce aux résultats sérologiques déjà réalisés. Pour les trois groupes, lors de l'accouchement, des prélèvements sanguins seront réalisés afin de récolter du matériel biologique. Pour les cas de séroconversion toxoplasmique, l'accès aux cellules mononucléées des femmes enceintes se fera lors du prélèvement de contrôle.

D'un point de vue statistique, pour avoir un nombre suffisant de femmes enceintes pour lesquelles une séroconversion toxoplasmique aura été identifiée durant la grossesse (20 à 30 femmes) et par la suite 5 à 10 cas de toxoplasmose congénitale, sur une période de 18 mois d'inclusion, nous avons associé trois maternités de l'AP-HP pour cet essai clinique, celles des hôpitaux Bichat-Claude Bernard et Cochin-Port Royal à Paris et celle de l'hôpital Louis Mourier à Colombes. Au moment de l'écriture du projet, ce choix a été motivé i/par le nombre d'accouchements recensés dans ces trois maternités en 2014 qui était au nombre de 10 700 ([scope Santé, HAS](#)), la dernière mise à jour de 2016 élevant ce chiffre à 10 840 accouchements, ii/par une prévalence globale de 2,2 cas de TC diagnostiqués pour 10 000 naissances en France en 2013, 3 cas en 2015 et 2,4 cas en 2016 ([CNR Toxoplasmose](#)), et iii/par un taux de transmission *in utero* de 30%. Ce choix prend également en compte le niveau, indice basé sur le degré des soins assurés aux nouveau-nés, auquel appartiennent les maternités, niveau 2 pour l'hôpital Bichat avec son service de néonatalogie et niveau 3 pour les hôpitaux Cochin et Louis Mourier avec l'habilitation à prendre en charge les grossesses pathologiques ([scope Santé, HAS](#)), favorisant ainsi un nombre de cas plus important par rapport à la moyenne nationale.

III-2-Déroulement de la mise en place d'une recherche clinique

Proposé durant deux années consécutives aux appels à candidature du DHU Risques et Grossesse de l'AP-HP, ce projet a été lauréat en janvier 2017 du prix PRIDE 2016. Il s'est très vite imposé de mettre en place une démarche de demande d'autorisation de recherche impliquant un être humain. Cette procédure, aux rouages complexes, est réglementée par l'article L1121-1 du Code de la Santé Publique modifié par l'ordonnance n°2016-800 du 16/11/2016 et le décret n°2016-1537 du 16/11/2016 (loi Jardet) d'application de la loi n°2012-300 du 05/03/2012 relative aux Recherches Impliquant la Personne Humaine (RIPH) ([sites cnil et recherche clinique Paris Centre](#)). Ainsi, pour que notre projet soit pris en charge et puisse

passer les différentes étapes de validation, notamment l'obtention des autorisations technico-réglementaires, nous nous sommes mises en relation et avons travaillé de concert avec l'antenne méthodologique de l'hôpital Bichat Claude-Bernard, à savoir l'Unité de Recherche Clinique Paris Nord Val de Seine (URC PNVS), qui est une composante de la Délégation de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) de l'AP-HP ([site recherche-hupnvs](#)).

Cette structure chargée du suivi de la recherche nous a accompagnées dans le montage de notre dossier, qui entrait dans le cadre d'une recherche interventionnelle à risques minimes hors médicaments. Les autres types de recherche recensés sont i/les recherches interventionnelles à risques : médicaments et hors médicaments et iii/les recherches non interventionnelles : produits de santé (dont médicaments) + hors produits de santé ([site recherche clinique Paris centre](#)).

Nous avons constitué notre dossier pour une soumission au Comité de Protection des Personnes (CPP) où nous apparaissions en qualité d'Investigateur-Coordonnateur et l'AP-HP en tant que Promoteur. C'est en octobre 2017 que nous avons obtenu l'avis favorable du CPP Sud-Méditerranée II (annexe n°7). Suite à cet avis, notre projet a été déclaré auprès de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) et de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).

Enfin, nous avons répondu aux différentes informations requises pour un enregistrement de notre étude à ClinicalTrials.gov. Cette structure, créée en 1997, est une ressource internet dématérialisée gérée par la National Library of Medicine (NLM) du National Institutes of Health (NIH). Elle donne une visibilité à tout essai clinique, notamment à ceux pour lesquels un usage de molécules médicamenteuses est requis et dont le numéro d'enregistrement est demandé pour toutes publications depuis 2005 ([site clinicaltrials](#)). Notre essai clinique TOXODIAG est enregistré sous le numéro NCT03385499 et est consultable sous le lien <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03385499>.

III-3-Organisation annexe de l'étude

En parallèle de cette démarche de demande d'autorisation, nous avons rédigé et formalisé les documents relatifs à l'essai clinique.

La note d'information et le consentement éclairé, préalablement rédigés pour le projet CoaLa, ont été reformulés et formatés pour correspondre au modèle de la DCRI. Les critères d'inclusion/d'exclusion et le questionnaire ont été intégrés dans le cahier d'observation électronique, appelé electronic Case Report Form (e-CRF), ainsi que différentes données dont les données cliniques et biologiques relatives à l'étude. Nous l'avons testé avant de le mettre en ligne. Ainsi, toutes les personnes habilitées et déclarées, notamment celles du corps médical, peuvent consulter et compléter l'e-CRF *via* le système cleanWeb™ « Solution intégrée globale de gestion électronique d'études cliniques ».

Des réunions de présentation ont été organisées sur les trois sites hospitaliers entre novembre 2017 et janvier 2018. Ces rencontres avec les membres des équipes des pôles cliniques participant à l'étude, ont permis d'améliorer des points de logistique et/ou d'éclaircir certaines incompréhensions, par exemple i/au niveau de l'organisation du recrutement des couples mère-enfant(s) des groupes témoins et ii/au niveau du circuit des prélèvements. En effet, ce dernier doit répondre aux exigences du transport du matériel biologique de l'AP-HP, ainsi nous avons établi une « feuille de route » pour faciliter le travail du personnel hospitalier.

D'autres documents ont été élaborés notamment une plaquette récapitulant succinctement les principaux points scientifiques de l'étude, les principaux points de logistique et les contacts.

III-4-Etat d'avancement du projet

L'essai clinique TOXODIAG a officiellement commencé le 14 mai 2018. Les premières inclusions ont débuté durant la 2^{ème} quinzaine de juin. A l'heure où j'écris ces mots, le nombre d'inclusions est illustré dans la figure n°46.

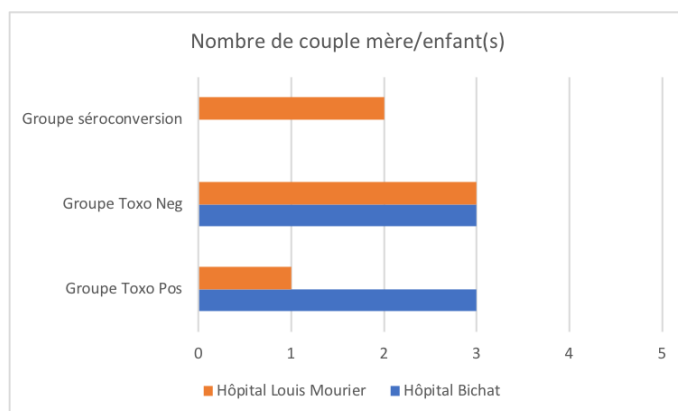


Figure n°46. Répartition des inclusions des couples mère/enfant(s) en fonction des groupes d'étude depuis le démarrage du projet TOXODIAG.

Pour des raisons de logistique technique et par souci de standardisation, les CMN recueillies sont congelées afin de poursuivre les adaptations de la technique ELISPOT de façon simultanée avec celles des groupes constitués lors du projet CoLa.

III-5-Interconnexion des projets TOXODIAG et CoLa

La figure n°47 permet de mieux visualiser l'intérêt des projets TOXODIAG et CoLa sur la poursuite de l'adaptation de la technique ELISPOT, pour mettre en évidence la production d'Ig néosynthétisées par les LyB du nouveau-né dans le cadre d'infection parasitaire. En fonction de l'avancée de chacun des projets, la valorisation des résultats obtenus sous forme de publication scientifique se fera de façon indépendante ou conjointement.

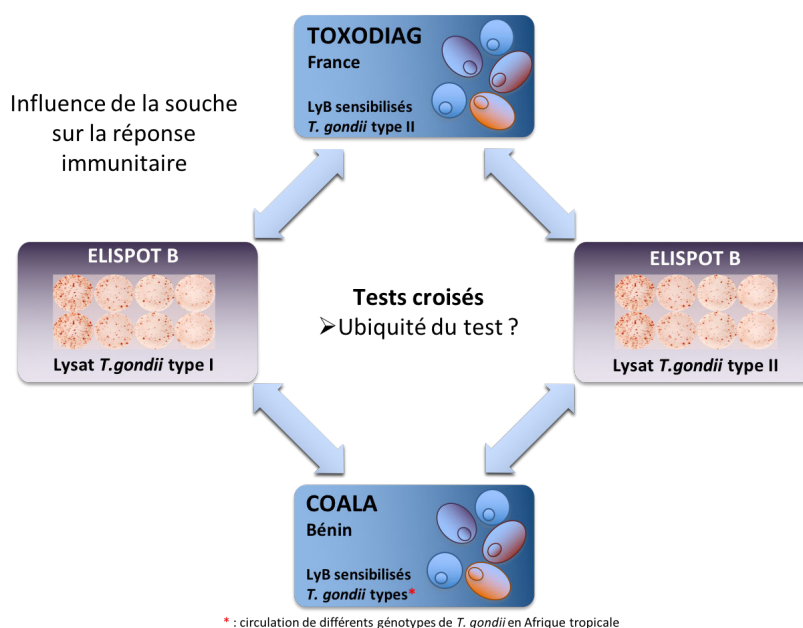


Figure n°47. Apport mutuel des projets TOXODIAG et CoLa.

PARTIR 6 - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse entre dans un projet de recherche plus vaste portant sur une meilleure caractérisation de la réponse immunitaire propre à l'enfant en étudiant les Ig spécifiques du nouveau-né lors d'infection parasitaire congénitale. Dans la période temporelle propice à une détection précoce de la réponse spécifique du nouveau-né, c'est à dire entre 0 et 6 mois de vie, le défi est de pouvoir étudier les Ig qui lui sont propres sans le biais occasionné par celles de sa mère, puisque ces deux types d'Ig sont conjointement présentes dans la circulation sanguine du jeune enfant. De ce fait, notre groupe de travail explore différentes pistes de réflexion autour de l'Ig en utilisant des approches méthodologiques distinctes.

Les deux objectifs principaux de mon travail de thèse étaient de :

1/valider par biologie moléculaire une investigation protéomique déjà en cours, la MS-BU, afin de poursuivre les travaux sur la distinction entre les IgG sériques maternelles et fœtales basée sur l'étude du **polymorphisme individuel de la chaîne lourde des IgG** ;

2/mettre en place des travaux permettant la détection des LyB néonataux par l'adaptation d'une technique cellulaire, l'ELISPOT, en misant sur la plasticité de la réponse immunitaire fœtale en cas d'infection congénitale à même de créer un cadre *in vivo* de stimulation cellulaire.

L'évolution entre l'objectif 1/ et l'objectif 2/ s'est imposée à nous de par la nécessité de travailler sur des IgG exclusivement spécifiques du pathogène, ce que les IgG sécrétées à l'échelon cellulaire par les LyB néonataux pouvait nous garantir. Ainsi, l'atteinte de l'objectif 2/ est rendue possible par la mise en place :

i/**de deux études de terrain** pour la collecte d'échantillons biologiques : le projet **CoaLa** à Cotonou au Bénin et le projet **TOXODIAG** en Ile de France;

ii/**d'une étude complémentaire** pour mieux appréhender **le contexte infectieux de la toxoplasmose** au cours de la grossesse au Bénin, grâce aux données provenant d'un projet déjà réalisé au Bénin au sein de notre unité, le projet STOPPAM.

Le travail réalisé sur les gènes des domaines constants (CH2 et CH3-CHS) de la chaîne lourde des 4 sous-classes des IgG a atteint son objectif puisqu'il a permis de valider l'approche protéomique MS-BU par une corrélation de 95% avec les résultats de séquençage génétique. Cette investigation moléculaire sur le polymorphisme individuel nous a offert le privilège d'avoir conceptualisé une liste de couples d'amorces pour identifier les allèles IGHG ainsi

qu'un arbre décisionnel qui, nous l'espérons, pourront être utilisés comme des outils contributifs à de nouvelles mises à jour en immunologie moléculaire de l'Ig. Les 13,5% d'allèles nucléotidiques nouvellement mis en évidence sur notre échantillonnage restreint (12 individus : 10 d'origine africaine dont les résultats sont publiés - MCP 2017 - un d'origine européenne et un d'origine eurasiennne - non publiés -) illustrent la richesse de cette diversité allélique encore inexplorée et dont découlent des allèles peptidiques nouveaux. Concernant notre thématique, cette diversité insoupçonnée apporte la promesse d'une plus grande finesse de discrimination entre les Ig maternelles et les Ig fœtales, confortant totalement notre choix de cette méthodologie innovante.

Ces variations alléliques sont des marqueurs d'intérêt pour des études populationnelles. Leur examen poussé peut également contribuer à améliorer nos connaissances sur les associations entre les caractéristiques individuelles des Ig et la susceptibilité aux infections, dans la continuité de travaux ayant établi un rôle différentiel des allotypes Gm des Ig dans l'immunité spécifique à certains pathogènes ([Pandey, 2000](#)). Cette diversité est également explicative de certains aspects de la fonctionnalité de l'Ig. Effectivement, faisant partie de la constitution du fragment Fc, une variation peptidique des allèles IGHG impacte les capacités de liaison s'établissant entre l'Ig et ses différents récepteurs membranaires (FcγR), et comme ces derniers subissent également des variations structurelles ([Kapur et al., 2014](#) ; [Nguyen et al., 2014](#)), une meilleure caractérisation des interactions Fc/FcγR prenant en compte ces variations sera informative pour établir un degré d'affinité de liaison. Ces différences d'interactions sont également soulignées au niveau du placenta. Dans le cadre du paludisme gestationnel, une modification d'un acide aminé à une position critique de la chaîne lourde de l'IgG3 peut favoriser l'ancrage de cette isoforme d'Ig sur le récepteur néonatal FcRn et donc son passage dans la circulation fœtale, avec pour conséquence une meilleure protection de l'enfant face aux infections palustres au début de la vie ([Dechavanne et al., 2017](#)).

Autant la connaissance de cette palette de variations alléliques est-elle importante pour identifier la liaison Ig-FcγR la plus adaptée dans le cadre de l'optimisation de traitements médicaux utilisant les Ig comme transporteur moléculaire, autant elle l'est pour éviter toute forme d'effets secondaires du type des réactions immunes de patients dans le cadre des traitements contre les maladies infectieuses ou inflammatoires utilisant les Ig en intraveineuse (IVIg pour *Intravenous Ig*).

Le deuxième objectif de mon travail de thèse, qui consistait à identifier directement les Ig individuelles spécifiques de pathogène grâce à leur sécrétion par les ASC, est toujours en cours et ne sera finalisé que lorsque l'ELISPOT sera pratiqué sur les CMN, en cours d'obtention, de femmes dépistées en séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse et de leurs enfants (sang de cordon). Au-delà de l'amélioration diagnostique que cette approche sera à terme en mesure de proposer, cette étude apportera une contribution à une meilleure compréhension de la maturité de la réponse lymphocytaire du nouveau-né dans un cadre d'infection congénitale. Des validations seront ajoutées comme par exemple le dosage des Ig dans les surnageants de culture des LyB après stimulation mitogénique afin de corrélérer le taux d'Ig avec le nombre d'ASC quantifiées par ELISPOT. Ces deux tests augmenteraient le potentiel de l'utilisation des cellules sécrétrices d'Ig dans l'étiologie des infections comme le suggère [Carter et al. \(2017\)](#). L'apport du dosage de l'IFN γ ([Chapey et al., 2010](#)) pourrait également être contributif à l'analyse globale de la réponse du nouveau-né dans un cadre d'infection congénitale.

Par ailleurs, ce travail repose sur l'acquisition de matériel biologique humain, via des chemins indispensables et exigeants, mais ô combien nécessaires à la poursuite de notre réflexion. J'évoquerai pour exemple ma belle expérience du travail de terrain au Bénin. Sous la bienveillance des Dr Nadine Fievet et Florence Migot-Nabias, ce travail a été enrichissant, intéressant et formateur d'un point de vue scientifique et humain. Cela va du travail préparatoire, effectué en amont de la mission avec les différentes prises de contact réalisées à distance ainsi que la logistique ; en passant par le travail de terrain en lui-même qui, bien que relativement balisé puisqu'effectué en ville, oblige à composer quotidiennement avec un environnement différent de celui habituellement connu ; pour aboutir à des collaborations prometteuses.

Enfin, les perspectives de travail à venir sont motivantes puisque la bio-banque, une fois constituée, va nous permettre non seulement de poursuivre notre approche cellulaire avec la finalisation de l'adaptation de l'ELISPOT, mais aussi d'approfondir nos connaissances sur les immunoglobulines du nouveau-né dans un contexte infectieux. L'étude du répertoire des LyB par l'analyse de la région hypervariable de la chaîne lourde de l'Ig, caractérisée par le CDR3 et

spécifique de l'Ag, serait dans ce sens intéressante à envisager. L'examen de cette région ouvre le champ des possibles suivant la technologie envisagée. Durant la recombinaison V(D)J, les ajouts ou pertes de nucléotides s'effectuant aux jonctions D-J puis V-DJ font varier la longueur de cette région, qui est ainsi spécifique de chaque LyB. La population clonale des LyB peut ainsi être observée grâce à l'analyse des longueurs des CDR3. Décrite par [Pannetier et al.](#) (1995) et communément appelée *CDR3 spectratyping* ou Immunoscope, cette technique permet d'amplifier le CDR3 par PCR à l'aide de plusieurs couples d'amorces encadrant cette région et d'analyser les différentes longueurs générées par un logiciel, comme ISEapeaks ([Colette et Six, 2002](#)), qui les présente sous forme de pic. Ainsi, en présence d'une population polyclonale de LyB, des pics régulièrement répartis sous forme de cloche (courbe de Gauss) seront observés, tandis qu'un changement de ce spectre avec la prédominance de certains pics par rapport à d'autres signera une expansion clonale observée lors d'une réponse immunitaire. Ainsi, nous pourrions envisager de faire un comparatif des différentes populations de LyB parmi nos groupes d'étude pour mettre en évidence la signature d'une infection suivant le profil observé. Quant à elles, les nouvelles technologies de séquençage haut débit associées à de bons logiciels d'analyse permettront de connaître l'enchaînement nucléotidique de ces régions ([Robins et al., 2009](#)). Le degré de similarité entre les séquences servira à les regrouper entre elles sous forme de grappes (clusters). Chaque cluster sera représentatif d'une population de clones lymphocytaires qui se ressemblent de par leur homologie de séquence du CDR3 ([Greiff et al., 2015](#)). Le positionnement des clusters les uns par rapport aux autres permettra de dégager au sein d'une population d'individus, les clusters qui sont communs, et reflètent une immunité basale, de ceux qui peuvent être assignables à une réponse spécifique à un pathogène.

Et pour faire un clin d'œil au « Préambule » : voilà de quoi butiner !

PARTIE 7 - REFERENCES DES SOURCES UTILISEES

DOCUMENTS ET OUVRAGES SCIENTIFIQUES SPECIALISES UTILISES POUR LA REDACTION DU CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Batteux F, Garraud O, Prin L, Renaudineau Y, Vallat L. Lymphocytes B : diversité ontogénèse, différenciation et activation. *Immunologie Fondamentale et immunopathologie, Enseignements thématiques et intégré ; le cours QCM corrigés.*, Elsevier Masson, pp.41-52, **2013**.

http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-7.-lymphocytes-b.pdf.

Document utilisé pour la rédaction du chapitre III-les anticorps néonataux, un outil de diagnostic ? (consulté en août 2018)

Collectif. Cours sur le lymphocyte B

Cri-net - Club Rhumatisme et Inflammations www.cri-net.com

http://www.cri-net.com/ckfinder/userfiles/files/formation/fichesImmuno/Chap_3.pdf

(consulté en août 2018)

Lefranc M-P et Lefranc G. Génétique Moléculaire des Immunoglobulines.

Lefranc M-P et Lefranc G. Différenciation des lymphocytes B.

In: IMGT Education. **IMGT**, the international ImMunoGeneTics information system®

<http://www.imgt.org>, Montpellier, France, **2002**.

Documents utilisés pour la rédaction du chapitre III-les anticorps néonataux, un outil de diagnostic ? (consultés en août 2018)

Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. **Abbas A.K et Lichtman A.H.** Campus référence. 4^{ème} édition. ELSEVIER MASSON. **2013**. 290 pages. ISBN : 978-2-294-72488-6.

Chapitre 1 : Introduction au système immunitaire p1-16, chapitre 3 : Captures des antigènes et présentation aux lymphocytes p43-60, chapitre 4 : Reconnaissance des antigènes dans le système immunitaire adaptatif p63-72, chapitre 7 : Réponses immunitaires humorales p117-32.

Médecine des voyages et tropicale. Médecine des migrants. **Bouchaud O, Consigny P.H, Cot M, Le Loup G, Odermatt-Biays S.** ABREGES. 3^{ème} édition. ELSEVIER MASSON. **2013**. 346 pages. ISBN : 978-2-294-72703-0.

Fiches maladies Toxoplasmose p236-9 et Maladie de Chagas p168-70.

Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicales. ANOFEL. Coordonné par **Chabasse D, Danis M, Guiguen C, Richard-Lenoble D, Botterel F, Miegerville M.** 2^{ème} édition. ELSEVIER MASSON. Paru le 08/**2010**. 361 pages. ISBN : 978-2-294-70880-0.

Chapitre 6 : Toxoplasmose p68-82, chapitre 9 : Trypanosome humaine américaine (maladie de Chagas) p101-5.

Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. Ouvrage collectif sous la direction scientifique de François **Denis**. Collection dirigée par Pascale Briand. Edition John Libbey Eurotext. Médecine Science Sélection. Paru en **2002**. 484 pages. ISBN : 2-7420-0427-0.

Chapitre « les différentes infections microbiennes et leurs conséquences pour la mère et l'enfant » p1-9, chapitre « Développement des moyens de défense et du système immunitaire du fœtus » p10-23, chapitre « Antibiothérapie et infections materno-fœtales », chapitre « Toxoplasmose » p317-47, chapitre « Parasitoses et grossesse (à l'exception du paludisme et de la toxoplasmose) » p348-71.

Remington and Klein's Infectious Diseases of fetus and newborn infant. Wilson CB, Victor N, Maldonado YA, Remington JS, Klein JO. 8th Edition. Elsevier. Paru en **2016**. 1272 pages. ISBN : 978-0-323-24147-2.

Chapter 1 : Current concepts of infections of the fetus and newborn infant p3-23, chapter 4 : Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection p81-188, chapter 31 : Toxoplasmosis p949-1042.

SITES INTERNET SPECIALISES

Biomérieux

Pour la rédaction de la technologie VIDAS
<http://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/vidasr-solutions>
(consulté en août 2018)

Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants Parasitologie et Mycologie (**ANOFEL**)

Cours en ligne
Pour la rédaction du chapitre Toxoplasmose
<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/toxoplasmose/site/html/8.html>
(consulté en septembre 2018)

CDC

Pour la rédaction de la toxoplasmose congénitale et des politiques de santé de la maladie de Chagas
<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>
<https://www.cdc.gov/parasites/npi/>
https://www.cdc.gov/parasites/resources/pdf/npi_chagas.pdf
(consultés en août 2018)

Clinical Trials

Pour la rédaction de TOXODIAG
<https://clinicaltrials.gov> ,rubrique History, Policies, and Laws
(consulté en juin 2018)

CNIL

Pour la rédaction de TOXODIAG
<https://cnil.fr/fr/recherches-dans-le-domaine-de-la-sante-le-nouveau-chapitre-ix-est-applicable>
(consulté en juin 2018)

CNR Toxoplasmose - Centre National de Référence Toxoplasmose

Pour la rédaction du chapitre sur la toxoplasmose congénitale
<http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr>
(consulté en juillet 2018)

CRB Toxoplasma - Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma*

Pour la rédaction des différents génotypes de *T. gondii* et la notion de virulence
<http://www.toxocrb.com>
(consulté en septembre 2018)

Haute Autorité de Santé (HAS)

Pour la rédaction du chapitre sur la toxoplasmose congénitale
https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-02/argumentaire_toxoplasmose_me_to.pdf
(consulté en juin 2018)

IMGT® - the international ImMunoGeneTics information system®

Pour la rédaction du chapitre III-les anticorps néonataux, un outil de diagnostic ?
<http://www.imgt.org/IMGTeducation/>
(consulté en juillet 2018)

LDBIO Diagnostics

Pour la rédaction du chapitre II-La gestion de la prise en charge-un délicat consensus

<http://www.ldbiodiagnostics.com>

http://www.ldbiodiagnostics.com/fichiers_site/a1181ldb/contenu_pages/wb_top_vs15_fr_en.pdf

(consulté en septembre 2018)

MABTECH

Pour la rédaction de l'ELISPOT

<https://www.mabtech.com>

(consulté en août 2018)

OMS - Organisation Mondiale de la Santé

Pour la rédaction de la maladie de Chagas

[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

(consulté en juillet 2018)

ORPHANET

Pour la rédaction de la séroprévalence de la toxoplasmose

[https://www.orpha.net/consor/cgi-](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=596&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Toxoplasmo)

[bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=596&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Toxoplasmo](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=596&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Toxoplasmo)

se-

[congenitale&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=To](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=596&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Toxoplasmo)

[xoplasmose-congenitale&title=Toxoplasmose-congenitale&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=596&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Toxoplasmo)

(consulté en juillet 2018 ; dernière mise à jour Wallon 2012)

PAHO - Pan American Health Organization ; OPS - Organisation Panaméricaine de la Santé

Pour la rédaction des politiques de santé de la maladie de Chagas

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14399&Itemid=72315

[&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14399&Itemid=72315)

(consulté en août 2018)

Recherche clinique Paris Centre

Pour la rédaction de TOXODIAG

<https://recherchecliniquepariscentre.fr>

<https://www.recherchecliniquepariscentre.fr/wp-content/uploads/2018/02/DIU-CP-Rôles-et-missions-loi-jardé-02Févr18-MM.pdf>

(consultés en juin 2018)

Scope Santé, site de la HAS

Pour la rédaction de TOXODIAG

<http://scopesante.fr>

(consulté en août 2018)

Société Française de néonatalogie

Pour la rédaction du traitement de la toxoplasmose congénitale

<http://www.societe-francaise-neonatalogie.fr/wp-content/uploads/2017/01/PLM-toxo-CAT-janvier2017.pdf>

(consulté en juillet 2018)

U-CyTech Biosciences

Pour la rédaction de l'ELISPOT

<https://www.ucytech.com>

(consulté en août 2018)

URC Bichat

Pour la rédaction de TOXODIAG
<http://recherche-hupnvs.aphp.fr>
(consulté en juin 2018)

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi M**, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Infectious Diseases*. **2003**;188(4):608-16.
- Abdoli A**, Dalimi A, Soltanghoreae H, Ghaffarifar F. Molecular Detection and Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* in Paraffin-Embedded Fetoplacental Tissues of Women with Recurrent Spontaneous Abortion. *Int J Fertil Steril*. **2017**;10(4):327-336.
- Adkins B**, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. **2004**;4(7):553-64.
- Afssa - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments**. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'Afssa. **2005**. <https://www.anses.fr/fr/content/toxoplasmose> (consulté en août 2018).
- Ajayi GO**, Popoola AT, Dina T, Okorie N. Pre-pregnancy counseling in Lagos: a report on the first 1,000 cases. *Clin Exp Obstet Gynecol*. **2013**;40(3):359-60.
- Ajzenberg D**, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. **2002**;186(5):684-9.
- Ajzenberg D**, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, Aubert D, Franck J, Bessières MH, Quinio D, Pelloux H, Delhaes L, Desbois N, Thulliez P, Robert-Gangneux F, Kauffmann-Lacroix C, Pujol S, Rabodonirina M, Bougnoux ME, Cuisenier B, Duhamel C, Duong TH, Filisetti D, Flori P, Gay-Andrieu F, Pratlong F, Nevez G, Totet A, Carme B, Bonnabau H, Dardé ML, Villena I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. **2009**;199(8):1155-67.
- Altcheh J**, Diaz NS, Pepe CM, Martin V, Nigro M, Freilij H, Angel SO. Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2006**;56(2):161-5.
- Armitage RJ**, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol*. **1995**;154(2):483-90.
- Aubert D**, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. **2000**;38(3):1144-50.
- Ayi I**, Edu SA, Apea-Kubi KA, Boamah D, Bosompem KM, Edoh D. Sero-epidemiology of toxoplasmosis amongst pregnant women in the greater Accra region of Ghana. *Ghana Med J*. **2009**;43(3):107-14.
- Balbín M**, Grubb A, de Lange GG, Grubb R. DNA sequences specific for Caucasian G3m(b) and (g) allotypes: allotyping at the genomic level. *Immunogenetics*. **1994**;39(3):187-93.
- Bamba S**, Some DA, Chemla C, Geers R, Guiguemde TR, Villena I. Serological analysis of toxoplasmosis during pregnancy: risk assessment and perspectives of prenatal screening at the University Hospital of Bobo Dioulasso in Burkina Faso. *Pan Afr Med J*. **2012**;12:43.

Bamba S, Cissé M, Sangaré I, Zida A, Ouattara S, Guiguemdé RT. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *BMC Infect Dis.* **2017**;17(1):482.

Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* **2003**;11(9):426-30.

Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, Seixas J, Van Gool T, Canavate C, Flores-Chavez M, Jackson Y, Chiodini PL, Albajar-Vinas P; Working Group on Chagas Disease. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill.* **2011**;16(37).

Bauer T, Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine.* **2006**;24(5):572-7.

Begeman IJ, Lykins J, Zhou Y, Lai BS, Levigne P, El Bissati K, Boyer K, Withers S, Clouser F, Noble AG, Rabiah P, Swisher CN, Heydemann PT, Contopoulos-Ioannidis DG, Montoya JG, Maldonado Y, Ramirez R, Press C, Stillwaggon E, Peyron F, McLeod R. Point-of-care testing for *Toxoplasma gondii* IgG/IgM using Toxoplasma ICT IgG-IgM test with sera from the United States and implications for developing countries. *PLoS Negl Trop Dis.* **2017**;11(6):e0005670.

Bénard A, Petersen E, Salamon R, Chêne G, Gilbert R, Salmi LR; European Toxo Prevention Study Group (EUROTOXO). Survey of European programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis. *Euro Surveill.* **2008**;13(15).

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science.* **2002**;298(5601):2199-202.

Bessières MH, Chemla C, Cimon B, Marty P, Gay-Andrieu F, Pelloux H, Rabodonirina M. Les difficultés d'interprétation de la sérologie de la toxoplasmose. *Rev Fr Lab.* **2006**;36(383):43-49.

Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol.* **1998**;28(1):3-9.

Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* **2002**;5(4):438-42.

Briand V, Cottrell G, Massougbdji A, Cot M. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malar J.* **2007**;6:160.

Brutus L, Santalla JA, Salas NA, Schneider D, Chippaux JP. Screening for congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in France. *Bull Soc Pathol Exot.* **2009**;102(5):300-9.

Buffolano W, Beghetto E, Del Pezzo M, Spadoni A, Di Cristina M, Petersen E, Gargano N. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* **2005**;43(12):5916-24.

Buisman AM, de Rond CG, Oztürk K, Ten Hulscher HI, van Binnendijk RS. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine.* **2009**;28(1):179-86.

Calamy L, Goudjil F, Godineau N, Bolot P. Severe congenital toxoplasmosis secondary to toxoplasma reactivation in an HIV-infected mother. *Arch Pediatr.* **2015**;22(2):181-4.

Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez Mde L, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez LR, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Figueroa-Damián R, Correa D. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* **2008**;27(5):469-74.

Carlier Y. Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. *Bull Mem Acad R Med Belg.* **2007**;162(7-9):409-16; discussion 416-7.

Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Vinas P. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis.* **2011**;5(10):e1250.

Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop.* **2012**;121(2):55-70.

Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Sánchez G, Valencia Ayala E, Liotta L, Bern C, Luchini A; Working Group on Chagas Disease in Bolivia and Peru. Use of a novel chagas urine nanoparticle test (chunap) for diagnosis of congenital chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* **2014**;8(10):e3211.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Congenital transmission of Chagas disease - Virginia, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2012**;61(26):477-9.

Cevallos AM, **Hernández R.** Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int.* **2014**;2014:401864.

Chapey E, Wallon M, Debize G, Rabilloud M, Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. *J Clin Microbiol.* **2010**;48(1):41-5.

Chapey E, Wallon M, L'Ollivier C, Piarroux R, Peyron F. Place of Interferon- γ Assay for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* **2015**;34(12):1407-9.

Chapey E, Wallon M, Peyron F. Evaluation of the LDBIO point of care test for the combined detection of toxoplasmic IgG and IgM. *Clin Chim Acta.* **2017**;464:200-201.

Carter MJ, Mitchell RM, Meyer Sauter PM, Kelly DF, Trück J. The Antibody-Secreting Cell Response to Infection: Kinetics and Clinical Applications. *Front Immunol.* **2017**;8:630.

CNR Toxoplasmose - Centre National de Référence Toxoplasmose - Protocole placenta, 2011. http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2012/06/Recommandations-placenta-def_13102011.pdf. (consulté en juin 2018).

CNR Toxoplasmose - Centre National de Référence Toxoplasmose - Rapport annuel d'activités 2017, année d'exercice 2016. <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2018/03/Rapport-Act-CNR-Toxoplasmose-2016-DEF.pdf>. (consulté en août 2018).

Collette A, **Six A.** ISEapeaks: an Excel platform for GeneScan and Immunoscope data retrieval, management and analysis. *Bioinformatics.* **2002**;18(2):329-30.

Couvreur G, Sadak A, Fortier B, Dubremetz JF. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* **1988**;97 (Pt 1):1-10.

Crotty S, Aubert RD, Glidewell J, Ahmed R. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods*. **2004**;286(1-2):111-22.

Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. **1983**;65(1-2):109-21.

Dard P, Lefranc MP, Osipova L, Sanchez-Mazas A. DNA sequence variability of IGHG3 alleles associated to the main G3m haplotypes in human populations. *Eur J Hum Genet*. **2001**;9(10):765-72.

Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. **2004**;40(1):57-63.

Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, Levy J, Marchant A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect Dis*. **2012**;12(4):330-40.

Davoust B, Mediannikov O, Roqueplo C, Perret C, Demoncheaux JP, Sambou M, Guillot J, Blaga R. Serological survey of animal toxoplasmosis in Senegal. *Bull Soc Pathol Exot*. **2015**;108(1):73-7.

De Castro Zacche-Tonini A, Fonseca GSF, de Jesus LNNP, Barros GB, Coelho-Dos-Reis JGA, Béla SR, Machado AS, Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Teixeira-Carvalho A, Vitor RWA, Ferro EAV, Mineo JR, Martins-Filho OA, Lemos EM; UFMG Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group - UFMG-CTBG. Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. *J Immunol Methods*. **2017**;451:37-47.

De Paschale M, Ceriani C, Cerulli T, Cagnin D, Cavallari S, Cianflone A, Diombo K, Ndayaké J, Aouanou G, Zaongo D, Priuli G, Viganò P, Clerici P. Antenatal screening for *Toxoplasma gondii*, Cytomegalovirus, rubella and *Treponema pallidum* infections in northern Benin. *Trop Med Int Health*. **2014**;19(6):743-746.

De Sousa A, Rabarijaona LP, Ndiaye JL, Sow D, Ndyiae M, Hassan J, Lambo N, Adovohekpe P, Guidetti F, Recht J, Affo A. Acceptability of coupling intermittent preventive treatment in infants with the expanded programme on immunization in three francophone countries in Africa. *Trop Med Int Health*. **2012**;17(3):308-15.

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

Dechavanne C, Guillonnet F, Chiappetta G, Sago L, Lévy P, Salnot V, Guitard E, Ehrenmann F, Broussard C, Chafey P, Le Port A, Vinh J, Mayeux P, Dugoujon JM, Lefranc MP, Migot-Nabias F. Mass spectrometry detection of G3m and IGHG3 alleles and follow-up of differential mother and neonate IgG3. *PLoS One*. **2012**;7(9):e46097.

Dechavanne C, Cottrell G, Garcia A, Migot-Nabias F. Placental Malaria: Decreased Transfer of Maternal Antibodies Directed to Plasmodium falciparum and Impact on the Incidence of Febrile Infections in Infants. *PLoS One*. **2015**;10(12):e0145464.

Dechavanne C, Dechavanne S, Sadissou I, Lokossou AG, Alvarado F, Dambrun M, Moutairou K, Courtin D, Nuel G, Garcia A, Migot-Nabias F, King CL. Associations between an IgG3 polymorphism in the binding domain for FcRn, transplacental transfer of malaria-specific IgG3, and protection against

Plasmodium falciparum malaria during infancy: A birth cohort study in Benin. *PLoS Med.* **2017**;14(10):e1002403.

Desmots G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet.* **1985**;1(8427):500-4.

Döşkaya M, Caner A, Ajzenberg D, Değirmenci A, Dardé ML, Can H, Erdoğan DD, Korkmaz M, Uner A, Güngör C, Altıntaş K, Gürüz Y. Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol Int.* **2013**;62(5):471-4.

Dowling DJ, Levy O. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol.* **2014**;35(7):299-310.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* **1999**;353(9167):1829-33.

Durandy A. Development of specific immunity in prenatal life. *Arch Pediatr.* **2001**;8(9):979-85.

Dziadek B, **Brzostek A**. Recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 antigen-cocktails as possible tools for immunoprophylaxis of toxoplasmosis: what's next? *Bioengineered.* **2012**;3(6):358-64.

Efunshile AM, Elikwu CJ, Jokelainen P. Toxoplasmosis - Awareness and knowledge among medical doctors in Nigeria. *PLoS One.* **2017**;12(12):e0189709.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* **2009**;199(2):280-5.

Elefant E. Placental immunoglobulin transfer. *Bull Acad Natl Med.* **2012**;196(8):1601-12.

Elwing H, **Nygren H**. Diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (DIG-ELISA): a simple method for quantitation of class-specific antibodies. *J Immunol Methods.* **1979**;31(1-2):101-7.

Fernandes CFC, Pereira SDS, Luiz MB, Zuliani JP, Furtado GP, Stabeli RG. Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. *Front Immunol.* **2017**;8:653.

Fievet N, Ringwald P, Bickii J, Dubois B, Maubert B, Le Hesran JY, Cot M, Deloron P. Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon. *Parasite Immunol.* **1996**;18(10):483-90.

Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, Durieux MF, Dardé ML, Mercier A. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol.* **2018**;34(2):140-154.

Garty BZ, Ludomirsky A, **Danon YL**, Peter JB, Douglas SD. Placental transfer of immunoglobulin G subclasses. *Clin Diagn Lab Immunol.* **1994**;1(6):667-9.

Gbédandé K, Fievet N, Viwami F, Ezinmagnon S, Issifou S, Chippaux JP, Dossou Y, Moutairou K, Massougbodji A, Ndam N, de Jongh WA, Søggaard TMM, Salanti A, Nielsen MA, Esen M, Mordmüller B, Deloron P, Luty AJF; Multi-centre research paper. Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine.* **2017**;35(27):3474-3481.

Ghanem N, Lefranc MP, Lefranc G. Definition of the RFLP alleles in the human immunoglobulin IGHG gene locus. *Eur J Immunol.* **1988**;18(7):1059-65.

Givens MD, Marley MS. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*. **2008**;70(3):270-85.

Golkar M, Azadmanesh K, Khalili G, Khoshkholgh-Sima B, Babaie J, Mercier C, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Cesbron-Delauw MF. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2008**;61(1):31-9.

Greiff V, Miho E, Menzel U, Reddy ST. Bioinformatic and Statistical Analysis of Adaptive Immune Repertoires. *Trends Immunol*. **2015**;36(11):738-749.

Guigue N, Menotti J, Hamane S, Derouin F, Garin YJ. Performance of the BioPlex 2200 flow immunoassay in critical cases of serodiagnosis of toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol*. **2014**;21(4):496-500.

Gupta R, Yan XJ, Barrientos J, Kolitz JE, Allen SL, Rai K, Chiorazzi N, Mongini PKA. Mechanistic Insights into CpG DNA and IL-15 Synergy in Promoting B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Clonal Expansion. *J Immunol*. **2018**. pii: ji1800591. doi: 10.4049/jimmunol.1800591. [Epub ahead of print]

Handman E, Goding JW, Remington JS. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. **1980**;124(6):2578-83.

Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Even J, Rodriguez P, Berthe A, Gonzalez-Merino E, Torrico F, Carlier Y. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood*. **2002**;100(6):2153-8.

Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. A T cell clone's avidity is a function of its activation state. *J Immunol*. **2001**;167(3):1353-61.

Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*. **2000**;55(8):688-97.

Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem*. **2012**;118(4):192-6.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. **1995**;172(6):1561-6.

Huynh BT, Fievet N, Gbaguidi G, Borgella S, Mévo BG, Massougbdji A, Deloron P, Cot M. Malaria associated symptoms in pregnant women followed-up in Benin. *Malar J*. **2011 a**;10:72.

Huynh BT, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guézo-Mévo B, Massougbdji A, Ndam NT, Deloron P, Cot M. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. **2011 b**;85(2):214-20.

Iriemenam NC, Pandey JP, Williamson J, Blackstock AJ, Yesupriya A, Namboodiri AM, Rocca KM, van Eijk AM, Ayisi J, Oteino J, Lal RB, ter Kuile FO, Steketee R, Nahlen B, Slutsker L, Shi YP. Association between immunoglobulin GM and KM genotypes and placental malaria in HIV-1 negative and positive women in western Kenya. *PLoS One*. **2013**;8(1):e53948.

- Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, Ahlberg N.** Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods*. **2013**;391(1-2):50-9.
- Jahnmatz P, Bengtsson T, Zuber B, Färnert A, Ahlberg N.** An antigen-specific, four-color, B-cell FluoroSpot assay utilizing tagged antigens for detection. *J Immunol Methods*. **2016**;433:23-30.
- Jahnmatz P, Ahlberg N.** Detection of Cross-Reactive B Cells Using the FluoroSpot Assay. *Methods Mol Biol*. **2018**;1808:63-72.
- Jefferis R, Lefranc MP.** Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs*. **2009**;1(4):332-8.
- Jerne NK, Nordin AA.** Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. *Science*. **1963**;140(3565):405.
- Kahi S, Cozon GJ, Greenland T, Wallon M, Gay-Andrieu F, Peyron F.** A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. **1998**;5(6):745-8.
- Kahi S, Cozon GJ, Peyron F.** Early detection of cellular immunity in congenitally *Toxoplasma gondii*-infected children. *Pediatr Infect Dis J*. **1999**;18(9):846-7.
- Kapur R, Einarsdottir HK, Vidarsson G.** IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly". *Immunol Lett*. **2014**;160(2):139-44.
- King CL, Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW.** B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *J Immunol*. **1998**;160(7):3578-84.
- King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Wahab SA, Koech D, Zimmerman P, Ouma J, Kazura JW.** Acquired immune responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol*. **2002**;168(1):356-64.
- Kotresha D, Noordin R.** Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*. **2010**;118(8):529-42.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. **1995**;374(6522):546-9.
- Krieg AM.** CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther*. **2012**;22(2):77-89.
- Kwofie KD, Ghansah A, Osei JH, Frempong KK, Obed S, Frimpong EH, Boakye DA, Suzuki T, Ohta N, Ayi I.** Indication of Risk of Mother-to-Child *Toxoplasma gondii* Transmission in the Greater Accra Region of Ghana. *Matern Child Health J*. **2016**;20(12):2581-2588.
- LeBien TW, Tedder TF.** B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. **2008**;112(5):1570-80.
- Lefranc MP, Lefranc G.** Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. *Methods Mol Biol*. **2012**;882:635-80.
- Li S, Maine G, Suzuki Y, Araujo FG, Galvan G, Remington JS, Parmley S.** Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol*. **2000** a;38(1):179-84.

Li S, Galvan G, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*. **2000** b;7(5):781-7.

Li X, Pomares C, Gonfrier G, Koh B, Zhu S, Gong M, Montoya JG, Dai H. Multiplexed Anti-Toxoplasma IgG, IgM, and IgA Assay on Plasmonic Gold Chips: towards Making Mass Screening Possible with Dye Test Precision. *J Clin Microbiol*. **2016**;54(7):1726-1733.

Lima-Junior JDC, Morgado FN, Conceição-Silva F. How Can Elispot Add Information to Improve Knowledge on Tropical Diseases? *Cells*. **2017**;6(4):e31.

Lindner AK, Priotto G. The unknown risk of vertical transmission in sleeping sickness--a literature review. *PLoS Negl Trop Dis*. **2010**;4(12):e783.

Linguissi LS, Nagalo BM, Bisseye C, Kagoné TS, Sanou M, Tao I, Benao V, Simporé J, Koné B. Seroprevalence of toxoplasmosis and rubella in pregnant women attending antenatal private clinic at Ouagadougou, Burkina Faso. *Asian Pac J Trop Med*. **2012**;5(10):810-3.

Loureiro LR, Carrascal MA, Barbas A, Ramalho JS, Novo C, Delannoy P, Videira PA. Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens. *Biomolecules*. **2015** Aug 11;5(3):1783-809.

Mahmoudi S, Mamishi S, Suo X, Keshavarz H. Early detection of *Toxoplasma gondii* infection by using a interferon gamma release assay: A review. *Exp Parasitol*. **2017**;172:39-43.

Malek A. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine*. **2003**;21(24):3362-4.

Martinez DR, Fouda GG, Peng X, Ackerman ME, Permar SR. Noncanonical placental Fc receptors: What is their role in modulating transplacental transfer of maternal IgG? *PLoS Pathog*. **2018**;14(8):e1007161.

McLeod R, Boyer KM, Lee D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Noble AG, Withers S, Swisher CN, Heydemann PT, Sautter M, Babiarz J, Rabiah P, Meier P, Grigg ME; Toxoplasmosis Study Group. Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clin Infect Dis*. **2012**;54(11):1595-605.

Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, Salle B, Ajzenberg D, Dardé ML. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-irulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. **2010**;4(11):e876.

Migot-Nabias F, Noukpo JM, Guitard E, Doritchamou J, Garcia A, Dugoujon JM. Imbalanced distribution of GM immunoglobulin allotypes according to the clinical presentation of Plasmodium falciparum malaria in Beninese children. *J Infect Dis*. **2008**;198(12):1892-5.

Migot-Nabias F, Lokossou AG, Vigan-Womas I, Guitard E, Guillotte M, Noukpo JM, Mercereau-Puijalon O, Dugoujon JM, Garcia A. Combined effects of Gm or Km immunoglobulin allotypes and age on antibody responses to Plasmodium falciparum VarO rosetting variant in Benin. *Microbes Infect*. **2011**;13(8-9):771-5.

Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther*. **2013**;11(9):943-56.

Ndiaye D, Sène PD, Ndiaye M, Faye B, Ndiaye JL, Ndir O. Update on toxoplasmosis prevalence based on serological tests in pregnant women in Dakar, Senegal from 2002 to 2006. *Med Trop (Mars)*. **2011**;71(1):101-2.

Nguyen DC, Sanghvi R, Scinicariello F, Pulit-Penalzoza J, Hill N, Attanasio R. Cynomolgus and pigtail macaque IgG subclasses: characterization of IGHG genes and computational analysis of IgG/Fc receptor binding affinity. *Immunogenetics*. **2014**;66(6):361-77.

Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, Noya O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2015**;110(3):377-86.

Ogouyèmi-Hounto A, Agbayahoun-Chokki F, Sissinto Savi de Tove Y, Biokou Bankole B, Adinsi de Souza V, Assogba M, Kinde-Gazard D, Massougboji A. Evaluation of a rapid diagnostic test in the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women in Cotonou (Bénin). *Bull Soc Pathol Exot*. **2014**;107(2):85-9.

Organisation Mondiale de la Santé - OMS. (2010). Recommandation générale de l'OMS sur le traitement préventif intermittent du nourrisson à la sulfadoxine-pyriméthamine pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en Afrique.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy_recommendation_IPTi_032010/fr/. (consulté en août 2018).

Organisation Mondiale de la Santé - OMS. (2011). Traitement préventif intermittent du nourrisson à la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIN-SP) pour lutter contre le paludisme en Afrique: Guide de la mise en œuvre sur le terrain
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/whoivb11_07/fr/. (consulté en août 2018).

Organisation Mondiale de la Santé - OMS. (2013). Document d'orientation en matière de politiques de l'OMS: Traitement préventif intermittent pour le paludisme lors de la grossesse à la sulfadoxine-pyriméthamine - TPip-SP. (rév. 2014)
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy_brief_iptp_sp_policy_recommendation/fr/
(consulté en août 2018).

Pandey JP. Immunoglobulin GM and KM allotypes and vaccine immunity. *Vaccine*. **2000**;19(6):613-7.

Pangui LJ, Gbati OB, Kamga Waladjo AR, Bakou SN. Point sur la toxoplasmose en Afrique de l'ouest et du centre. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*. **2013**;11(N°s):29-40.

Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today*. **1995**;16(4):176-81.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. **2009**;39(12):1385-94.

Paquet C, Yudin MH; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *J Obstet Gynaecol Can*. **2013**;35(1):78-81.

Pays JF. Le diagnostic biologique de la maladie de Chagas. *Rev Fr Lab*. **2011**;41(430):47-59.

Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Transmission of Chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res*. **2010**;59:63-85.

Pereira-Cunha FG, Duarte AS, Costa FF, Saad ST, Lorand-Metze I, Luzo AC. Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection. *Transfusion*. **2013**;53(9):2034-42.

Peyron F, McLeod R, Ajzenberg D, Contopoulos-Loannidis D, Kieffer F, Mandelbrot L, Sibley LD, Pelloux H, Villena I, Wallon M, Montoya JG. Congenital Toxoplasmosis In France And The United States : One Parasite, Two Diverging Approaches. *Plos Negl Trop Dis*. **2017**;11(2):E0005222.

Pfreppe KI, Enders G, Gohl M, Krczal D, Hlobil H, Wassenberg D, Soutschek E. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. **2005**;12(8):977-82.

Pomares C, **Montoya** JG. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. **2016**;54(10):2448-54.

Pomares C, Zhang B, Arulkumar S, Gonfrier G, Marty P, Zhao S, Cheng S, Tang M, Dai H, Montoya JG. Validation of IgG, IgM multiplex plasmonic gold platform in French clinical cohorts for the serodiagnosis and follow-up of *Toxoplasma gondii* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2017**;87(3):213-218.

Potasman I, Araujo FG, Desmonts G, Remington JS. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J Infect Dis*. **1986 a**;154(4):650-7.

Potasman I, Araujo FG, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J Clin Microbiol*. **1986 b**;24(6):1050-4.

Potasman I, Araujo FG, Thulliez P, Desmonts G, Remington JS. *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential samples of serum obtained from congenitally infected infants. *J Clin Microbiol*. **1987**;25(10):1926-31.

Rastogi D, Wang C, Mao X, Lendor C, Rothman PB, Miller RL. Antigen-specific immune responses to influenza vaccine in utero. *J Clin Invest*. **2007**;117(6):1637-46.

Remington JS, Araujo FG, Desmonts G. Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. *J Infect Dis*. **1985**;152(5):1020-4.

Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DA, Gascon J, Muñoz J. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. **2015**;9(2):e0003540.

Rico-Torres CP, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2016**;35(7):1079-88.

Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. **2012**;80(1):418-28.

Robert-Gangneux F, Murat JB, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Gangneux JP, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol*. **2011**;27(12):530-6.

Robert-Gangneux F, **Dardé** ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. **2012**;25(2):264-96. Erratum in: *Clin Microbiol Rev*. **2012**;25(3):583.

Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, Riddell SR, Warren EH, Carlson CS. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood*. **2009**;114(19):4099-107.

Rodari P, Angheben A, Gennati G, Trezzi L, Bargiggia G, Maino M, Ruggeri M, Rampello S, Soavi L, Rizzi M. Congenital Chagas disease in a non-endemic area: Results from a control programme in Bergamo province, Northern Italy. *Travel Med Infect Dis*. **2018**. pii: S1477-8939(18)30083-8. doi: 10.1016/j.tmaid.2018.04.011.

Rodier MH, Berthonneau J, Bourgoïn A, Giraudeau G, Agius G, Burucoa C, Hekpazo A, Jacquemin JL. Seroprevalences of Toxoplasma, malaria, rubella, cytomegalovirus, HIV and treponemal infections among pregnant women in Cotonou, Republic of Benin. *Acta Trop*. **1995**;59(4):271-7.

Rodriguez-Guerineau L, Posfay-Barbe KM, Monsonis-Cabedo M, Juncosa-Morros T, Diana A, Wyler-Lazarevic CA, de Tejada BM, Chappuis F, Fumadó-Pérez V, Jackson Y. Pediatric Chagas disease in Europe: 45 cases from Spain and Switzerland. *Pediatr Infect Dis J*. **2014**;33(5):458-62.

Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. **2007**;7(9):715-25.

Roth DB. Restraining the V(D)J recombinase. *Nat Rev Immunol*. **2003**;3(8):656-66.

Ru H, Chambers MG, Fu TM, Tong AB, Liao M, Wu H. Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures. *Cell*. **2015**;163(5):1138-1152.

Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. **2005**;21(10):476-81.

Saletti G, Çuburu N, Yang JS, Dey A, Czerkinsky C. Enzyme-linked immunospot assays for direct ex vivo measurement of vaccine-induced human humoral immune responses in blood. *Nat Protoc*. **2013**;8(6):1073-87.

Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology*. **2011**;133(2):143-64.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. **2010**;115(1-2):14-21.

Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. **2010**;125(2 Suppl 2):S41-52.

Sedgwick JD, Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. **1983**;57(1-3):301-9.

Seventh Framework Programme. FP7-HEALTH-2010. Evaluation de l'impact de la suppression de paiement des frais de soins de santé maternelle en Afrique de l'Ouest et au Maroc : nouveaux outils, Nouvelles connaissances.

https://www.abdn.ac.uk/femhealth/documents/FEMHealth_Protocol_Benin_version_corrige_e_clean_17_fevrier_2012.pdf (consulté en août 2018)

- Shwab** EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. **2014**;141(4):453-61.
- Sibley** LD, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. **1991**;7(12):327-8.
- Sicuri** E, Muñoz J, Pinazo MJ, Posada E, Sanchez J, Alonso PL, Gascon J. Economic evaluation of Chagas disease screening of pregnant Latin American women and of their infants in a non endemic area. *Acta Trop*. **2011**;118(2):110-7.
- Simister** NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. **2003**;21(24):3365-9.
- Sissinto-Savi de Tové** Y, Ogouyemi Hounto A, Vinadou Vodouh M, d'Oliveira A, Affolabi D, Georgia Barikissou D, Houessou B, Koupkoliyi A, Winor G, Anagonou S, Massougbdji A, Kinde-Gazard D. Seroprevalence and factors associated with toxoplasmosis in pregnant women living in rural areas in Benin. *Pan African Medical Journal*. **2018**;29:112.
- Smets** A, Fauchier T, Michel G, Marty P, Pomares C. Comparison of *Toxoplasma gondii* IgG avidity Architect and Vidas assays with the estimated date of infection in pregnant women. *Parasite*. **2016**;23:45.
- Solomon** M, Wofford J, Johnson C, Regan D, Creer MH. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion*. **2010**;50(4):820-30.
- Stillwaggon** E, Carrier CS, Sautter M, McLeod R. Maternal serologic screening to prevent congenital toxoplasmosis: a decision-analytic economic model. *PLoS Negl Trop Dis*. **2011**;5(9):e1333. doi: 10.1371/journal.pntd.0001333.
- Su** C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2012**;109(15):5844-9.
- Suzuki** Y, Ramirez R, Press C, Li S, Parmley S, Thulliez P, Remington JS. Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. *J Clin Microbiol*. **2000**;38(11):3967-70.
- Torgerson** PR, **Mastroiacovo** P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ*. **2013**;91(7):501-8.
- Velmurugan** GV, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol*. **2008**;155(3-4):314-8.
- Vendrell** JP, Pratlong F, Decoster A, Boulot P, Conge AM, Darcy F, Segondy M, Huguet MF, Serre A. Secretion of *Toxoplasma gondii*-specific antibody in vitro by peripheral blood mononuclear cells as a new marker of acute toxoplasmosis. *Clin Exp Immunol*. **1992**;89(1):126-30.
- Villard** O, Jung-Etienne J, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E, et le réseau du Centre National de Référence de la Toxoplasmose. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par méthodes de dépistage. *Feuillets de biologie*. **2010**;298:43-9.

Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2016 a**;84(1):22-33.

Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E. Help in the Choice of Automated or Semiautomated Immunoassays for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis: Evaluation of Nine Immunoassays by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. **2016 b**;54(12):3034-3042.

Wallon M, Peyron F. Effect of Antenatal Treatment on the Severity of Congenital Toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. **2016**;62(6):811-2.

Wallon M, Peyron F. Congenital Toxoplasmosis: A Plea for a Neglected Disease. *Pathogens*. **2018**;7(1).

Woodhall D, Jones JL, Cantey PT, Wilkins PP, Montgomery SP. Neglected parasitic infections: what every family physician needs to know. *Am Fam Physician*. **2014**;89(10):803-11.

World Health Organization - WHO. (2010 a). Control and prevention of chagas disease in Europe: report of a WHO informal consultation (jointly organized by WHO headquarters and the WHO Regional Office for Europe), Geneva, Switzerland 17-18 December 2009. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/95586>

World Health Organization - WHO. (2010 b). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases: summary. Geneva : World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70503>

PARTIE 8- ANNEXES

[Annexe n°1.](#) Poster présenté lors de la 7^{ème} édition des Jeunes Chercheurs en Sciences de la Vie. 2016.

[Annexe n°2.](#) Poster présenté lors du 2^{ème} après-midi des jeunes chercheurs. 2015.

[Annexe n°3.](#) Principe ELISPOT U-CyTech Biosciences

[Annexe n°4.](#) Technologie BioPlex®2200 - Bio-Rad

[Annexe n°5.](#) Avis éthique pour le projet CoaLa

[Annexe n°6.](#) Projet CoaLa : documents de travail

[Annexe n°7.](#) Avis éthique pour le projet TOXODIAG

Annexe n°1

Poster présenté lors de la 7^{ème} édition des Jeunes Chercheurs en Sciences de la Vie. 2016.



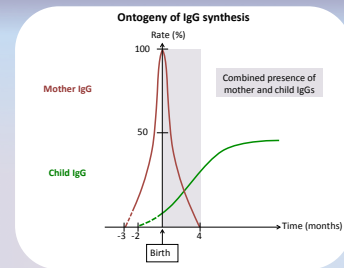
Detection of newborn's IgGs: molecular validation of a proteomic proof of concept

Magalie DAMBRUN¹, Célia DECHAVANNE², Alexandra EMMANUEL¹, François GUILLONNEAU³, Florence MIGOT-NABIAS¹

¹ UMR 216 "Mère et enfant face aux infections tropicales" Institut de Recherche pour le Développement/Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris, France. ² Global Health and Infectious Diseases, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA. ³ Plate-forme protéomique de l'Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris France.

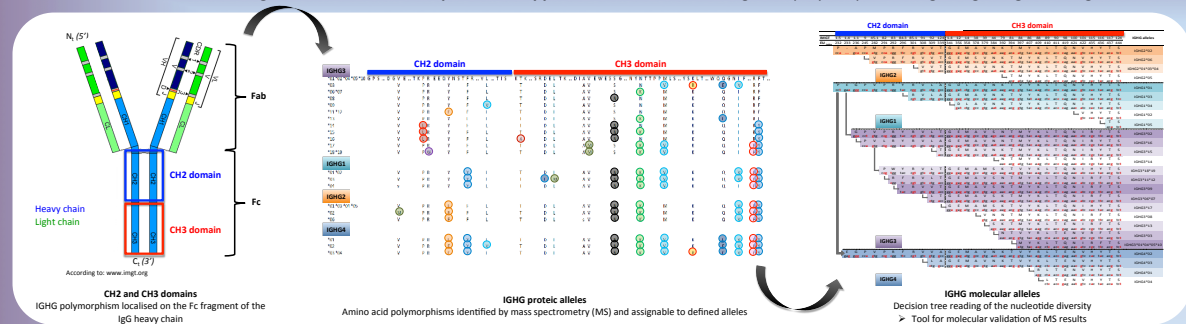
CONTEXT

- In countries where prenatal care is rare and infections often undiagnosed in pregnant women
 - the neonatal diagnosis of parasitic congenital infections is crucial for avoiding acute disease and increasing the effectiveness of treatments administered early
- To overcome implementation and/or interpretation difficulties of current techniques
 - a proteomic approach has been patented in our laboratory, which
 - exploits the individual amino acid polymorphism of the Fc fragment from the heavy chain of the immunoglobulin G (IgG)
 - aims at distinguishing maternal from fetal IgGs in newborns' serum samples



PURPOSE OF THE STUDY

IGHG1, IGHG2, IGHG3 and IGHG4 genomic validation of a proteomic approach based on the Fc fragment polymorphism of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 subclasses



MATERIALS AND METHODS

- Sampling**
- 10 sera (proteomics) and DNAs (genomics) from Beninese individuals selected on the basis of the diversity of their Gm allotypes (Gamma marker) determined by serology
- Primers design**
- alignment of a total of 34 alleles for the 4 IGHG genes localised on chromosome 14 (IMGT® database)
 - 4 pairs of amplification primers on either side of the CH2/CH3 domains of each IGHG gene were designed, despite strong sequence homology
 - 14 additional primers were identified to perform subsequent sequencing
- PCR validation**
- the nucleotide sequences obtained were checked for their assignment to a specific IGHG gene
- Sequence reading and allele deduction**
- IGHG alleles were deduced using a home-made decision tree reading

RESULTS AND DISCUSSION

Samples	Proteic alleles (codominant expression)	Molecular alleles (genotypes)
AS50	IGHG3*03/IGHG3*13	IGHG3*03/IGHG3*13
NP49	IGHG3*03/IGHG3*17*18*19	IGHG3*03/IGHG3*01*04*05*10
PA01	IGHG3*01*02*04 to *12/IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*01*04*05*10/IGHG3*01*04*05*10
PA07	IGHG3*13/IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*13/IGHG3*01*04*05*10
PA09	IGHG3*03/IGHG3*01*02*04 to *12	IGHG3*03/IGHG3*01*04*05*10
PA16	IGHG3*03/IGHG3*13	IGHG3*03/IGHG3*13
PA31	IGHG3*03/IGHG3*17*18*19	IGHG3*03/IGHG3*17
PA42	IGHG3*01*02*04 to *12/all IGHG3	IGHG3*01*04*05*10/IGHG3*01*04*05*10
PA45	IGHG3*01*02*04 to *12/all IGHG3	IGHG3*01*04*05*10/IGHG3*01*04*05*10
PA48	IGHG3*03/all IGHG3	IGHG3*03/IGHG3*03

Proteic and molecular IGHG3 alleles

- ✓ IGHG3 gene: results 95% identical
- ✓ NP49: the discordance between proteic and molecular alleles may be explained by a clinical context of cerebral malaria
 - where this individual had been polytransfused
 - high probability of a presence of heterologous IgG harboring different IGHG proteic alleles
- ✓ IGHG1, IGHG2 and IGHG4 proteic and molecular results were concordant
- ✓ Molecular results validate the proteomic approach: Bottom-up mass spectrometry

CONCLUSION

- The proteomic approach could be used for a mother-and-child differential IGHG detection in a context of suspicion of congenital infection
- Proteomics: improvement of the method by Middle-down mass spectrometry
- Genomics: ongoing study for the identification of new IGHG alleles by proteogenomics

Annexe n°2

Poster présenté lors du 2^{ème} après-midi des jeunes chercheurs. 2015.



Capacité des lymphocytes B néonataux à produire des immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasitaires dans le cadre d'infections congénitales

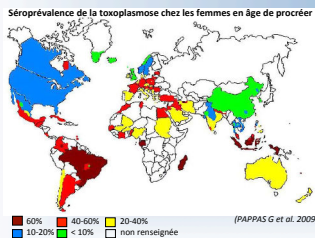
travail de thèse réalisé par Magalie Dambrun sous la direction de Florence Migot-Nabias

CONTEXTE

- Les diagnostics d'infections congénitales nécessitent de combiner plusieurs techniques permettant de rendre un résultat interprétable chez le nouveau-né
 - Le diagnostic des infections congénitales chez le nouveau-né est crucial afin d'éviter une maladie aigüe et d'augmenter l'efficacité des traitements administrés de façon précoce chez le nourrisson.
- La politique de prévention d'infections congénitales est absente dans les pays où les soins prénataux sont rares et les infections souvent non diagnostiquées chez les femmes enceintes.

OBJECTIF

- Rechercher de nouvelles techniques de diagnostic pour mettre en évidence les immunoglobulines (Ig) / anticorps (Ac) spécifiques de pathogène néosynthétisé(e)s par le nouveau-né en cas d'infection parasitaire congénitale.
 - Travailler dans le cadre de la toxoplasmose congénitale sur du sang de cordon



La toxoplasmose est due à *Toxoplasma gondii*.

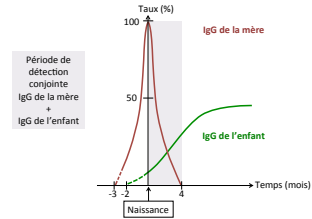
Importance épidémiologique

- cosmopolite
- prévalence de transmission *in utero* = 20%
- populations vulnérables : immunodéprimés, femmes enceintes, populations migrantes

Intérêt immunologique

Etude des Ig produites par le nouveau-né suite à une stimulation antigénique du système immunitaire fœtal

IgG plasmatiques présentes au cours du développement de l'enfant



Intérêt de la partie variable du fragment Fab (Fragment antigen binding) de l'immunoglobuline

Approche cellulaire
Mise en évidence d'Ac spécifiques par la technique ELISPOT

- Stimulation et maturation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes, cellules sécrétrices d'Ac
- Mise en contact des cellules avec l'Ag parasitaire adsorbé sur la membrane d'une plaque ELISPOT
- Liaison spécifique Ag-Ac sécrétés autour du LB via leur Fab

1 spot = 1 cellule sécrétrice d'Ac

Partie variable : reconnaissance et liaison à l'antigène (Ag)

CDR 3 Complementarity Determining Region 3

Chaîne lourde

Chaîne légère

D'après : www.imgt.org

Approche moléculaire
Etude du répertoire CDR3 par la technique Immunoscope

Durant la maturation des lymphocytes B (LB), les gènes de la partie variable du Fab subissent plusieurs étapes de modifications génétiques → ADN réarrangé donnant naissance à 1 Ig.

Début du locus de la chaîne lourde

ADN : V_H1 V_H2 V_H3 D_H1 D_H2 D_H3 J_H1 J_H2 J_H3 IGHC-3'

réarrangements D-J puis V-DJ

mutations somatiques

Région CDR3

ADN réarrangé : 5' V_H D_H J_H IGHC-3'

Régions hypervariables

Particularité de la région CDR3 de l'ADN réarrangé : insertion de nucléotides (n = 1 à 15) → la variation de longueur du CDR3 signe la spécificité d'1 LB pour 1 Ag

- Mise en évidence des longueurs différentes par PCR multiplex à l'aide d'amorces marquées par un fluorophore
- Analyse bioinformatique des données

Population LB oligoclonale

Population LB polyclonale

Résultats préliminaires

ELISPOT B – IgG sur cellules d'adultes (sérologie positive à *T. gondii*)

	SAG1 5µg/ml	SAG1 20µg/ml
E1		
E2		
E1		
E2		

pas de coating

IgG totales

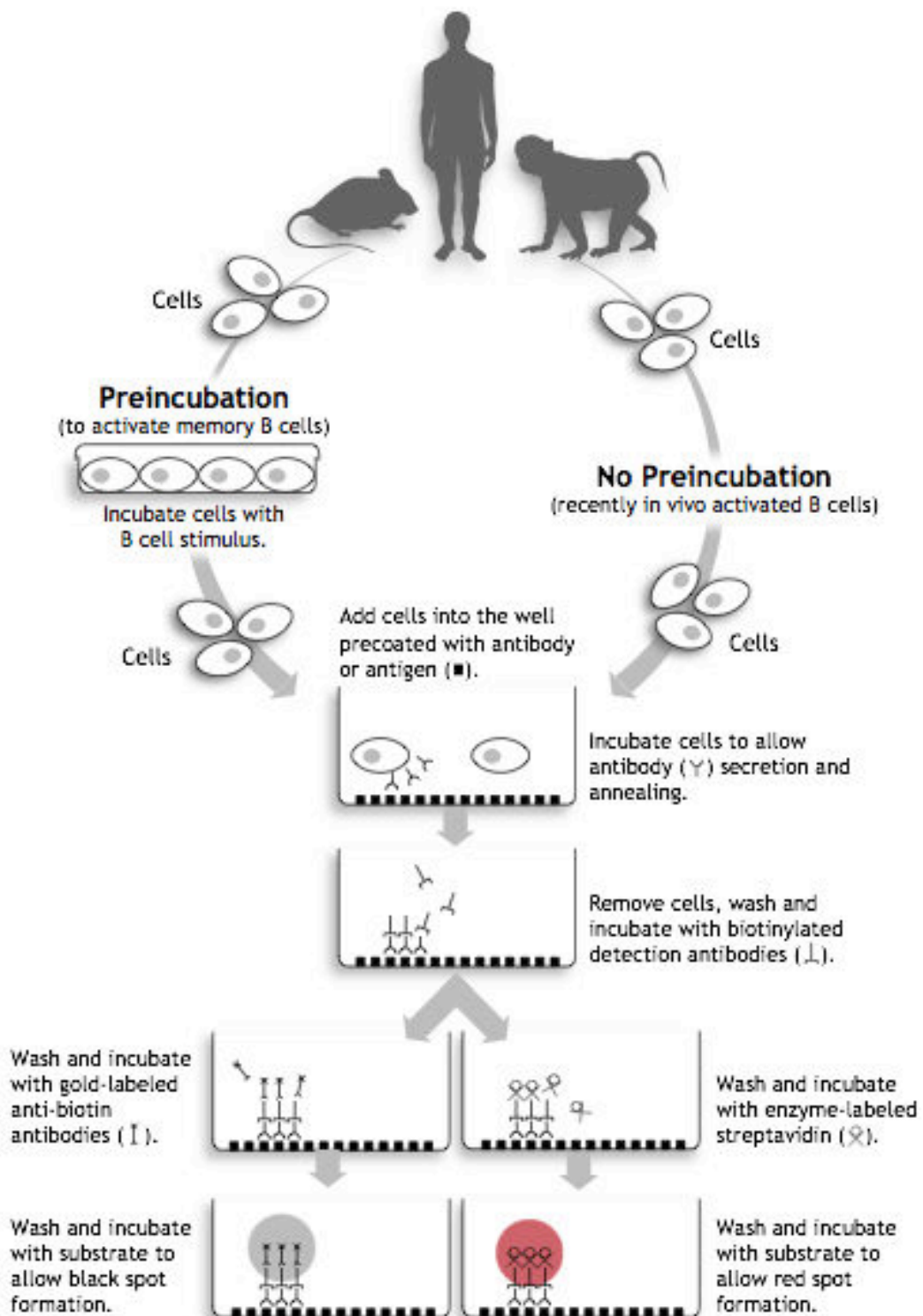
E1/E2	échantillons en quadruplicat	
SAG1	Ag de surface de <i>T. gondii</i>	2.10 ⁶ cellules/puits
T-	milieu tamponné	2.10 ⁶ cellules/puits
T+	IgG totales à 5µg/ml	10 ⁶ cellules/puits

PERSPECTIVES

- ELISPOT : élargir la détection des LB en utilisant du lysat parasitaire
- TECHNIQUES : étudier les cellules du sang de cordon
- CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE : étendre à la maladie de Chagas
- FUTUR : utiliser cette technologie dans les pays du Sud

Annexe n°3

Principe ELISPOT U-CyTech Biosciences



Annexe n°4 Technologie BioPlex®2200 - Bio-Rad

Le principe de cette technique, schématisé ci-dessous, est proche de la technique ELISA en sandwich. Il s'agit d'un système de billes revêtues avec les antigènes d'intérêt. Après l'ajout du plasma ou du sérum, les anticorps reconnaissant l'antigène se fixent aux billes. Un anticorps secondaire, conjugué, couplé au système biotine-streptavidine est ensuite ajouté pour se fixer aux anticorps recherchés et finaliser la réaction.

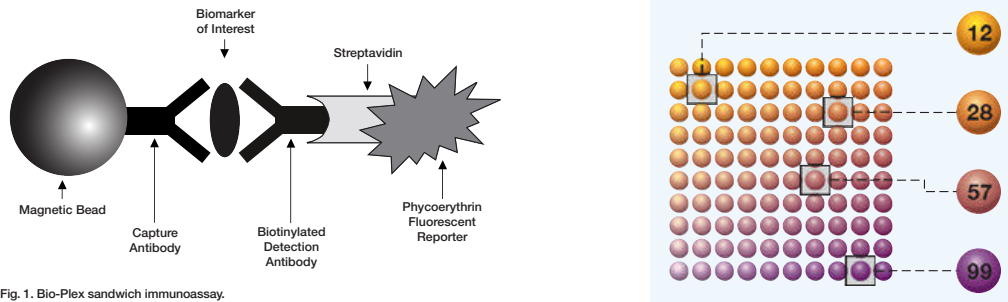
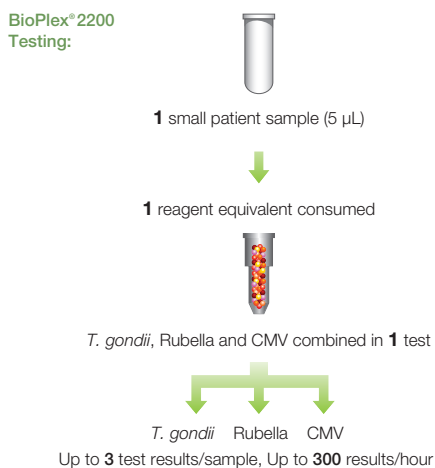


Fig. 1. Bio-Plex sandwich immunoassay.

Le système Bio-Plex utilise une sélection de billes avec différentes adresses spectrales, chacune couplée à des antigènes distincts.

Ainsi, dans le kit ToRC IgG il y a pour chaque échantillon :

- 3 populations différentes de billes colorées revêtues de lysats de *T. gondii*, rubéole et Cytomégalovirus.
- une bille de standardisation interne (BSI)
- une bille de confirmation de présence de sérum (BCS)
- une bille de réactif à blanc (BRB)



L'automate identifie les billes grâce au signal fluorescent interne qui leur est propre. Il « classe » les billes puis lit la fluorescence associée à la biotine-spectravidine pour quantifier les anticorps accrochés à la bille.

L'annexe a été réalisée en compilant les informations techniques disponibles sur le site <http://www.bio-rad.com>.

Annexe n°5

Avis éthique pour le projet CoaLa



DRFMT/
Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé

MINISTÈRE DE LA SANTÉ

REPUBLIQUE DU BENIN

MS : IORG0005695; CNER5 : IRB00006860 (expire le 20/1/18)

BP 01-882 BENIN
Tél. +229 21 33 2178/
21 33 21 63
info@sante.gouv.bj
www.sante.gouv.bj

N° 43 /MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA Cotonou, le 30 octobre 2017

La présidente

A

Mesdames

- Florence MIGOT-NABIAS
- Magalie DAMBRUN

COTONOU

**Objet : Avis éthique favorable n° 40 du 28 /09/2017
et autorisant la mise en œuvre de votre recherche**

Mesdames

Le Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé (CNER5) du Bénin, a l'honneur de vous adresser l'avis éthique concernant votre protocole de recherche :

- dont le titre actuel est : **Caractérisation de la production d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasitaires par les lymphocytes B néonataux dans le cadre d'infections congénitales**

- étudié le **28 septembre 2017**, par ses membres dont les noms suivent :

Mesdames	1) GANGBO	Flore	Messieur	2) GUEDOU	Fernand
	3) OLODO INOUSSA	Sarafatou		4) HOUNSA	Assomption
	5) AKINSHOLA	Amélie		6) LIGALI	Isiaka
	7) ADJIBABI	Chérifatou		8) KENDE DAHOUE	Antoine E.
Messieurs	9) AFFODJI	Jules		10) AMADOU SANNI	Allassance
	11) ZOMONTO	Olivier			

- sur la base des documents soumis, revus et approuvés :

- Protocole de recherche
- Résumé du protocole
- Note d'information
- Formulaire de consentement
- Questionnaire
- Cahier d'observation – Case Report Form (CRF)
- Fiche conseils pour les personnes à risque
- Extrait du tableau réservé au CHUMEL : liste des participants
- Extrait du tableau réservé au laboratoire : liste des prélèvements des participantes
- Chronogramme
- Budget
- Accord de la structure d'accueil

- m) Accord pour le transfert des données biologiques et pour l'accès aux données de l'étude (MTA et DSA)
- n) Curriculum vitae : * Florence MIGOT-NABIAS
* Magalie DAMBRUN

- **ainsi que sur la base des avis scientifiques fournis par les experts :**
 - Professeur Carine TRUYENS
 - Professeur Mireille PRINCE-DAVID
 - madame LATAPIE-MARTINEZ Séverine

Aucun conflit d'intérêt n'a été évoqué, ni par les membres du CNERS, ni par les chercheurs.

Après avoir validé globalement les aspects scientifiques et évalué les aspects éthiques centrés sur : les bénéfices attendus pour la santé des participants à la recherche et ainsi que sur la qualité des informations transmises en vue de l'obtention d'un consentement libre et éclairé, le CNERS a émis un **Avis éthique favorable n° 41 du 28 /09/2017.**

Le présent avis éthique favorable est exécutoire et vous autorise à mettre en œuvre la recherche ci-dessus intitulée.

Il est valable pour une durée d'un (01) an à compter de sa date de signature. Passé ce délai, vous êtes tenu de soumettre votre protocole à une nouvelle ré-évaluation du CNERS.

Par ailleurs, le CNERS vous demande de :

- 1) **l'informer de toute nouvelle information/ modification, qui surviendrait à une date ultérieure à cette approbation-ci et qui impliqueraient des changements dans le choix des participants à la recherche, dans la manière d'obtenir leur consentement, dans les risques encourus ou tout évènement indésirable survenant dans le cadre du déroulement de cette recherche.**

Le CNERS doit, en effet, dans ces cas, ré-évaluer et donner une nouvelle approbation avant l'entrée en vigueur desdites modifications

- 2) **utiliser les documents qu'il a validé;**
- 3) **faire signer au participant, le formulaire de consentement, en deux exemplaires, dont l'un lui sera remis et l'autre, conservé dans vos dossiers ;**
- 4) **lui adresser un rapport, au terme de la validité de cet avis éthique.**

Tout en vous souhaitant plein succès dans la réalisation de votre recherche, le CNERS vous prie de recevoir Mesdames, ses salutations les meilleures

La présidente

Comité National d'Ethique
pour la Recherche en Santé
Le Président

Florence GANGBO

Professeur Flore GANGBO

Page 2 sur 2

Avis éthique favorable N° 40 du 28 septembre 2017

Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé

site web : www.ethique-sante.org

courriel : contact@ethique-sante.org

Annexe n°6

Projet CoaLa : documents de travail

- Note d'informations**
- Formulaire de consentement**
- Questionnaire à remplir**
- Fiche conseils**



Ce projet est mené par Florence Migot-Nabias (investigatrice principale) et Magalie Dambrun (co-investigatrice principale) - UMR 216 « Mère et enfant face aux infections tropicales » - Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Université Paris Descartes (UPD) - Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Il vise les femmes enceintes et leur(s) nouveau-né(s).

NOTE D'INFORMATION POUR LES FEMMES ENCEINTES

Bonjour,

Nous vous proposons de participer à une étude.

Il est important de lire ou de vous faire lire cette note d'information, qui vous permettra de comprendre cette étude, avant de vous décider à y prendre part.

Si vous avez des questions, n'hésitez pas à demander des explications à la personne qui est en charge de votre consultation ou aux personnes travaillant pour le projet COALA.

Si vous décidez de participer à cette étude, votre accord vous sera demandé en signant un consentement écrit.

BUT DE LA RECHERCHE

Nous sommes des chercheurs qui souhaitons améliorer nos connaissances sur l'immunité des nouveau-nés, dans le cadre d'infections durant la grossesse. Nous étudions les cellules de l'immunité qui produisent des anticorps pour nous protéger des infections, les lymphocytes B.

Chaque lymphocyte B est spécialiste d'une infection particulière. Nous nous intéressons à la population de lymphocytes B spécialistes d'une infection appelée la toxoplasmose. Ainsi, nous voulons savoir si votre bébé est capable, comme vous, de fabriquer ses propres lymphocytes B spécialistes de la toxoplasmose.

L'étude de ces cellules, chez vous et chez votre futur enfant, va nous permettre de mieux connaître leur fonctionnement et d'améliorer une technique de diagnostic de laboratoire pour apporter un nouvel outil pour un dépistage précoce d'infections chez le nouveau-né.

INFORMATION SUR LA TOXOPLASMOSE

La toxoplasmose est une infection parasitaire qui passe le plus souvent inaperçue et qui n'est pas grave si vous n'êtes pas déjà fragilisée par une autre maladie.

Cependant, si vous vous infectez durant la grossesse, votre bébé risque également de s'infecter et dans ce cas cela s'appelle la toxoplasmose congénitale.

A Cotonou, la fréquence de cette infection chez les femmes enceintes était de 49% en 2012, avec un taux de séroconversion de l'ordre de 1% au cours de la grossesse. C'est à dire que sur un peu plus de la moitié des femmes enceintes qui n'ont pas eu la toxoplasmose, certaines d'entre elles peuvent contracter cette infection et la transmettre à leur futur enfant.

Le risque de transmission mère-enfant dépend du stade de la grossesse ; il est moins important en début qu'en fin de grossesse. Par contre, les conséquences cliniques sont plus graves en début (comme un risque de mort *in utero* ou de malformations congénitales) qu'en fin de grossesse (généralement des risques d'atteintes oculaires).

CONSTITUTION DES GROUPES

Pour pouvoir mener à bien cette étude, nous allons constituer 3 groupes suivant le profil sérologique vis à vis de la toxoplasmose. C'est à dire que nous allons analyser votre sang pour savoir s'il contient ou non les anticorps contre la toxoplasmose.

Dans un premier temps, pour pouvoir déterminer votre profil sérologique vis à vis de la toxoplasmose, nous souhaitons réaliser une prise de sang au pli de votre coude (9 à 12ml). En complément de ce prélèvement un questionnaire anonyme vous sera remis. Il nous permettra d'avoir des informations générales sur votre mode de vie afin de les relier ou non à la toxoplasmose.

Ensuite, nous allons effectuer un test sérologique dont le résultat nous permettra de vous inclure dans l'un des 3 groupes.

Cependant, le nombre de femmes dans chaque groupe est prédéfini par l'équipe scientifique, donc si ce nombre est atteint vous ne serez pas sollicitée pour la suite de l'étude.

Voici les différents groupes que nous allons constituer :

Groupe Toxo Pos ou Groupe Contrôle Pos (N=10) : les résultats sérologiques indiquent que vous êtes une femme enceinte déjà immunisée contre la toxoplasmose.

Groupe Toxo Neg ou Groupe Contrôle Neg (N=10) : les résultats sérologiques indiquent que vous n'êtes pas immunisée, donc pas protégée, contre la toxoplasmose. Vous recevrez une feuille avec quelques conseils d'hygiène et de nutrition afin d'éviter d'attraper l'infection jusqu'au moment de l'accouchement.

Groupe Séroco (N=5) : les résultats sérologiques indiquent qu'une infection toxoplasmique est en cours. Vous serez reconvoquée dans 2 semaines pour une prise de sang de contrôle, au pli du coude, afin de confirmer le résultat.

RECUEIL DES PRELEVEMENTS

Quelque soit le groupe auquel vous appartiendrez, au moment de l'accouchement, nous demanderons aux sages-femmes de bien vouloir réaliser :

- Un prélèvement sanguin au pli de votre coude (9 à 12ml)
- Un prélèvement de sang de cordon (30ml) : ce sang nous évite de prélever votre bébé.

Effectivement lors de la naissance de votre enfant, la sage femme ou le médecin posent deux pinces au niveau du cordon entre votre enfant et le placenta. Le cordon est coupé entre les 2 pinces. Ce système permet d'une part aux sages-femmes de couper le cordon

comme d'habitude pour continuer de s'occuper de votre enfant, et d'autre part de réaliser le prélèvement de sang de cordon sans intervenir sur votre enfant.

Nous aurons également besoin d'un prélèvement supplémentaire pour les femmes appartenant au « Groupe Toxo Pos » ou au « Groupe Séroco » **et uniquement après votre accord** : un petit bout du placenta afin de mettre en évidence le parasite responsable de la toxoplasmose et de savoir si votre bébé a été infecté ou non. Ce prélèvement ne se réalisera pas sur vous ni sur votre bébé. Bien entendu, nous vous remettrons le placenta décemment prélevé.

Récapitulatif des prélèvements demandés

	Consultation prénatale (CPN)	+ 2 semaines après CPN	Accouchement
Prélèvement au pli du coude (9 à 12ml)	X	X pour le « Groupe Séroco »	X
Prélèvement de sang de cordon (30ml)			X
Biopsie de placenta			X Pour les groupes « Toxo Pos » et « Séroco » Uniquement après votre accord

BENEFICES ET AVANTAGES LIES A VOTRE PARTICIPATION

Votre précieuse participation :

- vous permettra de connaître votre statut sérologique vis à vis de la toxoplasmose.
- contribuera à optimiser et à améliorer une technique immunologique cellulaire de diagnostic qui pourra être proposée aux couples mère-enfant, réalisable dès la naissance et sans traumatisme pour le nouveau-né, pour la détection de la toxoplasmose congénitale, avec d'éventuelles perspectives de prise en main par des laboratoires de Recherche et Développement.

Les résultats de votre participation permettront :

- de sensibiliser ou de re-sensibiliser nos partenaires scientifiques et médicaux au Bénin sur l'importance de la toxoplasmose durant la grossesse : instauration d'une politique d'information auprès des femmes enceintes (recommandations alimentaires, hygiène de vie) à défaut d'analyses coûteuses.
- de contribuer à la mise à jour des données sur la séroprévalence toxoplasmique à Cotonou.
- d'apporter des éléments de connaissance sur le développement du système immunitaire fœtal.
- de nous aider à mieux comprendre le fonctionnement cellulaire des lymphocytes B, en particulier ceux des nouveau-nés lors d'infection durant la grossesse.

RISQUES ET INCONVENIENTS

Le matériel utilisé pour réaliser le prélèvement sanguin est à usage unique afin d'éviter toute infection. Néanmoins, le prélèvement sanguin au pli du coude peut entraîner une sensation désagréable transitoire au moment de la piqûre ainsi qu'un hématome au point de piqûre.

TEMPS DE REFLEXION

Pour les prélèvements qui vous concernent, avant de nous donner votre consentement éclairé, nous vous laissons le temps de votre consultation du jour pour réfléchir à votre

décision et pour vous permettre de nous poser toutes les questions nécessaires à une meilleure compréhension du projet

Suite aux résultats sérologiques et dans le cas où vous seriez incluse dans l'un des 3 groupes, vous serez recontactée et nous vous demanderons une confirmation de votre accord, complétée par celui du futur père concernant le sang de cordon et le placenta (voir le chapitre « Recueil des prélèvements »).

PARTICIPATION - ANONYMAT

Votre participation à cette recherche est entièrement libre et volontaire : vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Vous pouvez changer d'avis sur une partie ou sur la totalité du projet à tout moment après avoir accepté de participer. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui vous seront prodigués.

Votre démarche n'entraînera pas de participation financière de votre part.

Vous pourrez tout au long de la recherche demander des informations ou des explications sur le déroulement du projet au médecin qui vous suit ou aux personnes travaillant sur le projet COALA.

Vos résultats vous seront communiqués.

Nous vous informons que toutes les informations vous concernant sont strictement confidentielles et resteront anonymes. Seuls Florence Migot-Nabias et le personnel habilité à travailler avec elle sur le projet, soumis au secret professionnel, pourront avoir accès aux données pour leur permettre de faire leurs études.

Les prélèvements recueillis et anonymes seront analysés et traités de manière confidentielle. Ils pourront également faire l'objet d'un transfert hors du territoire vers l'implantation principale de notre laboratoire (UMR 216-France) afin d'être utilisés dans la continuité du projet COALA et uniquement à cette fin.

La publication des résultats de l'étude ne comportera aucun résultat individuel, votre anonymat sera préservé.

ETHIQUE

Le projet COALA, étude de faisabilité, a été soumis et approuvé par le Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé.

Nous espérons vous avoir éclairé sur nos intentions et nous serons très heureux de pouvoir compter sur votre participation.

Nous vous remercions d'avoir pris le temps de lire ou de vous faire lire cette note d'information. Si vous êtes d'accord pour participer à ce projet, nous vous demandons de bien vouloir lire et signer le formulaire de consentement, pour valider votre accord à la participation du projet, et de répondre au questionnaire.

Nous nous rendons disponibles durant tout ce projet pour répondre à vos interrogations.

Merci à vous

L'équipe COALA



FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Je soussignée

(nom, prénom)

avoir été informée du projet COALA « Caractérisation de la production d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasitaires par les lymphocytes B néonataux dans le cadre de la toxoplasmose congénitale » par

(nom, prénom)

La lecture de la note d'information, les objectifs et modalités de l'étude m'ont été clairement expliqués.

J'ai disposé d'un temps nécessaire pour poser toutes les questions qui me paraissaient utiles et pour recevoir des réponses claires et précises avant de prendre ma décision pour participer au projet.

J'ai compris les informations décrivant le projet.

J'ai bien compris que ma participation à l'étude est volontaire.

Je suis libre d'accepter ou de refuser de participer. Je suis libre d'arrêter à tout moment ma participation en cours d'étude. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui me seront prodigués.

J'ai compris que les résultats me seront communiqués.

J'ai compris et j'accepte que les données qui me concernent soient gardées de manière entièrement anonyme.

J'ai compris et j'accepte que seules les personnes habilitées à travailler sur le projet aient accès aux données qui me concernent dans le respect de la plus stricte confidentialité.

J'ai compris et j'accepte que les prélèvements réalisés et anonymisés qui me concernent soient à la disposition de l'investigateur principal ainsi qu'aux personnes habilitées à travailler sur le projet.

J'ai compris et j'accepte que les données collectées et les prélèvements réalisés qui me concernent puissent être potentiellement transférés dans le respect de la plus stricte confidentialité pour être analysés et traités en dehors du Bénin.

J'accepte que les informations collectées puissent être publiées, sous anonymat, dans des revues scientifiques.

Les dossiers de recherche pourront être inspectés par le Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé du Bénin pour s'assurer du bon déroulement de l'étude.

De façon libre et éclairée :

En ce qui concerne le premier prélèvement sanguin au pli du coude

j'accepte je n'accepte pas

En ce qui concerne le deuxième prélèvement sanguin au pli du coude, si je fais partie du groupe « Séroco »

j'accepte je n'accepte pas

En ce qui concerne le prélèvement sanguin au pli du coude à l'accouchement

j'accepte je n'accepte pas

En ce qui concerne le prélèvement de sang de cordon à l'accouchement

j'accepte je n'accepte pas

(*) le futur papa accepte n'accepte pas

En ce qui concerne le prélèvement de placenta à l'accouchement, si je fais partie du groupe « Toxo Pos » ou du groupe « Séroco »

j'accepte je n'accepte pas

(*) le futur papa accepte n'accepte pas

Fait à

Le.....

Nom et signature de l'investigateur

Nom et signature (ou empreinte) de la participante

(*) Fait à

(*) Le.....

(*) Nom et signature (ou empreinte) du futur père

(*) : l'accord du futur père sera recueilli ultérieurement s'il n'est pas présent lors de la consultation de la mère. Effectivement, lors du signalement à la mère de son inclusion dans l'un des 3 groupes, l'équipe COALA lui demande confirmation du consentement pour la suite de l'étude complété de la réponse du futur père.

Projet COALA : Etude de faisabilité

Caractérisation de la production d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasitaires par les lymphocytes B néonataux dans le cadre de la toxoplasmose congénitale



QUESTIONNAIRE A REMPLIR

Bonjour,

Nous vous remercions de bien vouloir répondre aux différentes questions afin que nous puissions recueillir les informations nécessaires à notre projet.

Nous vous rappelons que ce questionnaire restera anonyme.

Nous vous remercions de votre participation qui nous sera d'une grande utilité.

L'équipe COALA

Date (jour/mois/année) :

|_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Nom de la personne remplissant le questionnaire :

.....

PARTIE 1 : POUR LE CHUMEL

PARTIE 2 : POUR LE LABO

Projet COALA : Etude de faisabilité

Caractérisation de la production d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasitaires par les lymphocytes B néonataux dans le cadre de la toxoplasmose congénitale



PARTIE 1

AVANT DE COMMENCER

Documents/Informations remis	OUI	NON
Explication orale du projet	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fiche d'information sur le projet	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Consentement éclairé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Questionnaire à remplir	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fiche de recommandations hygiéno-diététique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

IDENTITE DE LA MERE

Quel est votre nom :
(les 3 premières lettres sont à reporter dans l'encadré ci-dessous + CRF)

Quel est votre prénom :
(les 3 premières lettres sont à reporter dans l'encadré ci-dessous + CRF)

Quelle est votre date de naissance (jour/mois/année) : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|
Ou

Quel est votre âge (année + mois) :ans et mois

Quelles sont vos coordonnées (pour nous permettre de vous contacter pour la suite du projet) :
Adresse :

Tel :

NOM (3 premières lettres)	_ _	PRENOM (3 premières lettres)	_ _
NUMERO DE LA PARTICIPANTE	C O A _ _ _ _		

Projet COALA : Etude de faisabilité

Caractérisation de la production d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes parasitaires par les lymphocytes B néonataux dans le cadre de la toxoplasmose congénitale



NOM |__||__||__| PRENOM |__||__||__| |C|O|A|__||__||__|

PARTIE 2

INFORMATIONS GENERALES SUR LA MERE

Quelle est votre ethnie :

Quelle(s) langue(s) parlez-vous ? :

Dans quel quartier habitez-vous ? :

INFORMATIONS GENERALES SUR LE MODE DE VIE

Environnement	OUI	NON	Si OUI le(s) quel(s) ?
Y-a-t-il des animaux dans l'habitation?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Y-a-t-il des animaux à proximité de l'habitation ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Faites-vous du jardinage et/ou de la culture ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>ne rien préciser</i>
Habitudes alimentaires			
Mangez vous des légumes crus ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>ne rien préciser</i>
Mangez vous de la viande crue ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>ne rien préciser</i>
Séjour hors du lieu de résidence			
Avez-vous voyagé durant les 6 derniers mois ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Si OUI indiquez le lieu

INFORMATIONS MEDICALES

Historique médical de la mère

Avez-vous eu les maladies infectieuses suivantes ?

	OUI	NON	Ne souhaite pas répondre Ne connaît pas la réponse	Avant grossesse	Pendant grossesse	Commentaires (réservé à l'investigateur)
Hépatite(s)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
VIH (SIDA)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Autres	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Suivez-vous un traitement contre ces maladies infectieuses ? oui non ne sait pas

Si oui, contre laquelle ?

Précisez le traitement :

Grossesse

	OUI	NON	ne sait pas	Si OUI, précisez le nombre
Avez-vous suivi le TPI durant votre grossesse ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

S'agit-il de votre 1^{ère} grossesse 2^{ème} grossesse >2 grossesses

Quelle est la date de votre grossesse (mois/année) |__|__| / |__|__|__|__|
ou depuis combien de temps êtes-vous enceinte (mois) ? mois



PREVENTION DE LA TOXOPLASMOSE : GESTES A ADOPTER AU QUOTIDIEN FICHE CONSEILS POUR LES PERSONNES A RISQUE

MESURES D'HYGIENE

Lavez-vous bien les mains avec du savon en vous brossant les ongles, surtout après avoir manipulé de la viande crue ou des légumes souillés par de la terre.

Nettoyez bien les fruits et légumes souillés de terre.

Lavez les surfaces et les ustensiles de cuisine après chaque utilisation, surtout lorsque vous avez découpé de la viande crue.

Portez des gants pour tout contact avec la terre.

PRECAUTIONS ALIMENTAIRES

Cuisez la viande assez longtemps, à plus de 68 °C.

Congelez la viande pendant au moins trois jours à une température inférieure à -18 °C, si vous en avez la possibilité.

Evitez de consommer de la charcuterie ainsi que du lait cru de vache ou de chèvre, y compris sous forme de fromage.

Evitez de consommer des crustacés crus.

SI VOUS AVEZ UN CHAT

Utilisez des gants pour laver son bac à litière.

Demandez à une autre personne de le faire si vous êtes enceinte.

Annexe n°7

Avis éthique pour le projet TOXODIAG



Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée II

Pierre Henri ROLLAND *Président*
Jean Pierre VIDAL *Vice-président*
Bertrand DUSSOL *Secrétaire Général*

AVIS

Membres titulaires & suppléants

Collège technique

- Personnes qualifiées en recherche
 - Bertrand DUSSOL
 - Pierre-Henri ROLLAND
 - Vincent PRADEL (méthodologiste)
 - Houlin BAGHDADI
 - Laurent POTER (méthodologiste)
 - Camel POPOTICI
 - Claude BAGNIS
 - Clement ANMOUCHE
- Médecins généralistes
 - Claude SICHEL
 - Pierre REYES
- Pharmaciens hospitaliers
 - Diane BRAGUER
 - Stéphane HONORE
- Infirmières
 - Marie RAFFRAY
 - Patrick BOUYICHE

Collège social

- Personnes qualifiées en éthique
 - Dominique TAILLEFER
 - Michel CAILLOL
- Psychologues
 - Jeanne RICOEUR
 - Fredérique VICENT
- Travailleurs sociaux
 - Gilbert NAURAYE
- Juristes
 - Jean-Pierre VIDAL
 - Marine GABORIAU TABARY
- Représentants d'associations et usagers
 - Patrick D'ANGIO
 - Patrick BLIER
 - Renaud HULLIN

Le Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée II, agréé par arrêté ministériel en date du 31 mai 2012, constitué selon l'arrêté du Directeur Général de l'Agence Régionale de Santé de la région Provence Alpes Côte d'Azur en date du 20 avril 2016,

➤ en application des dispositions du Code de la Santé Publique et de la réglementation en vigueur applicables sur un projet de recherche mentionnée au 1° ou au 2° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique ne portant pas sur un produit mentionné à l'article L. 5311-1 du même code

➤ ayant été saisi par l'AP-HP, promoteur d'un dossier de recherche impliquant la personne humaine intitulée :

Nouvelle approche diagnostique de la toxoplasmose congénitale

Référencée chez le promoteur : **TOXODIAG**
identifiée sous le numéro ID RCB : **2017-A02208-45**
et dont l'investigateur coordonnateur est le **Mme MIGOT NABIAS Florence** ;

➤ ayant, après vérification de la conformité réglementaire, enregistré ce dossier le **25/08/2017** sous la référence interne **217 R52**,

➤ ayant examiné ce dossier de recherche lors de sa séance plénière du **08/09/2017** au cours de laquelle

L. BOYER, PH. ROLLAND, V. PRADEL, H. BAGHDADI, C. SICHEL, D. BRAGUER, M. RAFFRAY, D. TAILLEFER, J. RICOEUR, G. NAURAYE, J.P VIDAL, P. D'ANGIO,

le quorum général étant constaté,

après avoir entendu le rapporteur du collège technique, le rapporteur du collège social et l'avis du méthodologiste ont délibéré,

a retenu le principe d'un avis favorable à réception de compléments et de révisions mineures.

Le Comité,

➤ ayant reçu le **22/09/2017** les compléments et documents révisés,

➤ ayant vérifié la conformité de ces pièces à ses attentes,

➤ sur la base du dossier de recherche ainsi constitué :

- Lettre de saisine du 13/07/2017
- Lettre de réponse du 21/09/2017
- Formulaire de demande d'avis initial du 13/07/2017



Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée II

Pierre Henri ROLLAND *Président*
Jean Pierre VIDAL *Vice-président*
Bertrand DUSSOL *Secrétaire Général*

- Document additionnel du 13/07/2017
- Protocole de la recherche version n°1.1 du 20/09/2017
- Résumé du protocole version n°1.1 du 20/09/2017
- Note d'information et le formulaire de recueil du consentement destiné aux personnes qui se prêtent à la recherche, version n°1.1 du 20/09/2017
- Attestation d'assurance du 18/07/2017
- Justification de l'adéquation des moyens humains, matériels et technique au projet de recherche du 13/07/2017
- •Liste des investigateurs version v1-0 du 06/07/2017
- Engagement de conformité à la méthodologie de référence MR 001 du 23/03/2017

a émis le **03/10/2017** un

AVIS FAVORABLE

à la mise en oeuvre de cette recherche impliquant la personne humaine, considérant que les conditions de validité de la recherche, notamment celles définies dans l'article L. 1123-7 du code de la santé publique, étaient réunies.

Le Président
M. Pierre Henri ROLLAND

Il appartient au promoteur ou à son mandataire d'informer le Comité de "la date effective de commencement de la recherche correspondant à la date de la signature du consentement par la première personne qui se prête à la recherche en France" (Art. R. Art R1123-40 du Code de la Santé Publique) et « si, dans le délai de deux ans suivant l'avis du comité de protection des personnes, la recherche biomédicale n'a pas débuté, cet avis devient caduc. Toutefois, sur justification produite avant l'expiration dudit délai, celui-ci peut être prorogé par le comité concerné ». (Art R1123-26).

RESUME - ABSTRACT

Lymphocytes B et immunoglobulines néonatales dans un contexte d'infection parasitaire congénitale: stratégies méthodologiques de caractérisation

Durant ses premiers mois de vie, le nouveau-né a la particularité d'être protégé par les immunoglobulines (Ig)G de sa mère, qui sont transférées au cours de la grossesse, et sont présentes dans son sérum conjointement aux IgG qu'il néo-synthétise. La distinction dans un sérum de nouveau-né, entre les IgG d'origine maternelle et fœtale, est difficile à mettre en œuvre, mais peut s'avérer très utile pour contribuer à diagnostiquer de façon précoce certaines infections congénitales, notamment dans le cas d'infections parasitaires. A ces fins, notre groupe de travail a mis en place une méthodologie reposant sur la spectrométrie de masse et qui exploite des polymorphismes peptidiques individuels localisés sur les domaines constants CH2 et CH3-CHS de la chaîne lourde des IgG. Nous proposons dans ce travail de valider cette approche par biologie moléculaire. L'amplification et le séquençage spécifiques des domaines constants CH2 et CH3-CHS des 4 sous-classes d'IgG totales ont permis i/de valider l'approche par spectrométrie de masse bottom-up et ii/de mettre en évidence de nouveaux polymorphismes nucléotidiques entraînant ou non un changement en acide aminé. Cette approche exige une purification exclusive des IgG spécifiques de pathogène, qui peut être contournée en utilisant une autre approche, cellulaire, reposant sur les IgG spécifiques sécrétées par les lymphocytes (Ly) B du nouveau-né. Ainsi, les spécificités individuelle et antigénique de l'Ig sont conciliées. Pour ce faire, un autre développement de mon travail a consisté dans l'adaptation de la technique ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot), dans le cadre de la toxoplasmose, causée par le parasite *Toxoplasma gondii*, et responsable avec la maladie de Chagas de la plupart des cas d'infections congénitales d'origine parasitaire. Les mises au point ont été faites avec des cellules mononucléées d'adultes volontaires séronégatifs et séropositifs pour la toxoplasmose, qui nous ont conduits à faire le choix d'un lysat parasitaire de *T. gondii* de type I comme candidat antigénique multi-épitopes par rapport à la protéine recombinante spécifique SAG1 (Surface Antigen 1), protéine membranaire représentative du parasite. L'exploration d'autres paramètres est nécessaire pour compléter l'adaptation de l'ELISPOT dans le cadre précis d'une infection parasitaire congénitale. Il s'agit notamment d'évaluer i/la pertinence du test lors d'une infection récente avec *T. gondii*, en utilisant des LyB d'adultes en séroconversion et/ou de nouveau-nés ayant contracté une toxoplasmose congénitale, et ii/ l'ubiquité du test, en étudiant sa capacité à révéler avec une même efficacité les IgG sécrétées par des LyB d'individus infectés par des souches de toxoplasme circulant dans des zones géographiques différentes. Pour rendre possible cette dernière phase d'adaptation de l'ELISPOT, la mise en place d'études de terrain s'est imposée afin de constituer une bio-banque dans le cadre de suivis de la toxoplasmose chez des femmes enceintes et leurs nouveau-nés à l'accouchement : une première étude a été réalisée pendant 3 mois en 2018 dans la maternité d'un CHU à Cotonou au Bénin ; parallèlement un essai clinique est en cours pour 18 mois depuis juin 2018 dans 3 maternités d'hôpitaux de l'AP-HP en Ile de France. En supplément, une étude séro-épidémiologique rétrospective de la toxoplasmose chez environ 1000 femmes enceintes au sud du Bénin, à partir de plasmas collectés dans un projet mené en 2008-2010 dans notre UMR, permettra de documenter pour la première fois sur un aussi large effectif, la séroprévalence de la toxoplasmose chez des femmes enceintes au Bénin (53%) ainsi que le taux de séroconversion toxoplasmique pendant la grossesse (en cours). En plus des objectifs énoncés, l'ensemble de ces travaux contribue à mieux documenter l'exploration du système immunitaire fœtal.

Mots clés : Nouveau-né, toxoplasmose congénitale, immunoglobuline G, allèle IGHG, lymphocyte B, ELISPOT

B cells and neonatal immunoglobulins in a context of parasitic congenital infection: methodological strategies of characterization

In the first months of life, the newborn is protected from infections by the maternal immunoglobulins (Ig) G, which are transferred during pregnancy, and are present in his serum together with his neo-synthesized IgG. The distinction in neonatal serum between maternal and fetal IgG is difficult to implement, but could be very useful for diagnosing congenital infections early, particularly in the case of parasitic infections. For this purpose, our team has established a methodology based on mass spectrometry that exploits individual peptide polymorphisms located on the CH2 and CH3-CHS domains from the constant IgG heavy chain. In this work, we propose to validate this approach by molecular biology. The specific amplification and sequencing of the CH2 and CH3-CHS constant domains of the 4 total IgG subclasses allowed i/to validate the bottom-up mass spectrometry approach and ii/to highlight new nucleotide polymorphisms causing or not an amino acid change. This approach requires an exclusive purification of pathogen-specific IgG, which can be circumvented using another cell-based approach, based on the specific IgG secreted by the newborn B lymphocytes (Ly). Thus, the individual and antigenic specificities of Ig are reconciled. To do this, another development of my work consisted in the adaptation of the ELISPOT technique (Enzyme-Linked ImmunoSpot), in the context of the toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii* parasite, and responsible with the Chagas disease of the most cases of congenital infections of parasitic origin. Developments were made with mononuclear cells from adult volunteers seronegative and seropositive for toxoplasmosis, which led us to select a parasitic *T. gondii* type I lysate as multi-epitopes antigenic candidate compared to the specific recombinant protein SAG1 (Surface Antigen 1), a membrane protein representative of the parasite. The investigation of other parameters is necessary to complete the ELISPOT adaptation in the specific context of congenital parasitic infection. These include assessing i/the suitability of the test in the case of a recent infection with *T. gondii*, using B Ly from seroconverting adults and/or neonates with congenital toxoplasmosis, and ii/the test ubiquity, by studying its ability to reveal with the same efficiency the IgG secreted by B Ly from individuals infected with toxoplasma strains circulating in different geographical areas. To make this last ELISPOT adaptation phase possible, the implementation of field studies was essential in order to constitute a bio-bank resulting from toxoplasmosis follow-ups of pregnant women and their newborns at childbirth: a first study was conducted for 3 months in 2018 in the CHU maternity in Cotonou, Benin; also, a clinical trial has been in progress for 18 months since June 2018 in 3 AP-HP hospitals maternities, in Ile de France. In addition, a retrospective sero-epidemiological study of toxoplasmosis in about 1000 pregnant women in southern Benin, was conducted, using plasma samples collected 2008-2010 in our unit. This will document for the first time toxoplasmosis seroprevalence on a wide effective of pregnant women in Benin (53%) as well as the rate of toxoplasmic seroconversion during pregnancy (ongoing). In addition to the stated objectives, all of this work contributes to better documenting the exploration of the fetal immune system.

Key words: Newborn, congenital toxoplasmosis, immunoglobulin G, IGHG allele, B lymphocyte, ELISPOT