



**HAL**  
open science

# Développement clinique d'un vaccin contre le paludisme associé à la grossesse : étude de la mémoire immunologique spécifique du candidat vaccin VAR2CSA

Komi Gbedande

► **To cite this version:**

Komi Gbedande. Développement clinique d'un vaccin contre le paludisme associé à la grossesse : étude de la mémoire immunologique spécifique du candidat vaccin VAR2CSA. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2016. Français. NNT : 2016USPCB163 . tel-04483405

**HAL Id: tel-04483405**

**<https://theses.hal.science/tel-04483405>**

Submitted on 29 Feb 2024

**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



UNIVERSITE PARIS DESCARTE / FRANCE  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
INSTITUT DE FORMATION DOCTORALE (IFD)  
ECOLE DOCTORALE MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE ET IMAGERIE  
En cotutelle avec  
L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI / BENIN  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE

Année : 2016 N°:

**THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Et

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI**

Mention : **Science du vivant**

Discipline : **Immunologie**

Par :

***Komi GBEDANDE***

**Titre : Développement clinique d'un vaccin contre le paludisme associé à la grossesse:  
étude de la mémoire immunologique spécifique du candidat vaccin VAR2CSA**

Soutenu le 28/11/2016

**Jury**

M. Pierre Tissières	Professeur	Université Paris Sud	Rapporteur
M. Emmanuel Hermann	MCU/HDR	Université Lille 2	Rapporteur
M. Benjamin Mordmueller	Professeur	Université Tübingen	Examinateur
M. Kabirou Moutairou	Professeur	UAC	Directeur de thèse
Mme Nadine Fievet	HDR	UPD/IRD	Directrice de thèse





UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DESCARTES**



UNIVERSITE PARIS DESCARTE / FRANCE  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
INSTITUT DE FORMATION DOCTORALE (IFD)  
ECOLE DOCTORALE MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE ET IMAGERIE  
En cotutelle avec  
L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI / BENIN  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE

Année : 2016 N°:

**THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Et

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI**

Mention : **Science du vivant**

Discipline : **Immunologie**

Par :

***Komi GBEDANDE***

**Titre : Développement clinique d'un vaccin contre le paludisme associé à la grossesse:  
étude de la mémoire immunologique spécifique du candidat vaccin VAR2CSA**

Soutenue le 28/11/2016

**Jury**

M. Pierre Tissières	Professeur	Université Paris Sud	Rapporteur
M. Emmanuel Hermann	MCU/HDR	Université Lille 2	Rapporteur
M. Benjamin Mordmueller	Professeur	Université Tübingen	Examinateur
M. Kabirou Moutairou	Professeur	UAC	Directeur de thèse
Mme Nadine Fievet	HDR	UPD/IRD	Directrice de thèse



**MERIT** UMR 216  
Mère et enfant face aux infections tropicales



erpage  
Centre d'étude et de recherche  
sur le paludisme associé à la grossesse et à la fertilité

## Tables des matières

Remerciements .....	v
Liste des abréviations .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Résumé .....	x
Abstract.....	xii
INTRODUCTION .....	1
PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
Chapitre 1: Généralité sur le paludisme .....	6
I- Paludisme.....	6
1.1- Etiologie et épidémiologie.....	6
1.2- Cycle évolutif du parasite .....	7
1.3- Immunité et physiopathologie .....	9
1.4. Diagnostic biologique et stratégies de lutte contre le paludisme.....	11
1.4.1. Diagnostic biologique .....	11
1.4.2. Stratégies de lutte contre le paludisme.....	12
Chapitre 2: Immunité, Paludisme associé à la grossesse et ses conséquences .....	17
2.1. Immunité et cellules médiatrices de l'immunité .....	17
2.1.1. Les cellules de l'immunité innée .....	18
2.1.1.1. Les cellules dendritiques : professionnelles de la présentation d'antigènes.....	18
2.1.1.2. Les monocytes et les macrophages.....	18
2.1.1.3. Les cellules NK et lymphocytes NKT .....	19
2.1.2. Les cellules de l'immunité adaptative .....	20
2.1.2.1. Les lymphocytes T.....	21
2.1.2.2. Les lymphocytes B .....	21
2.1.2. Les récepteurs TLR (Toll-like receptor) .....	22
2.1.3. Immunité pendant la grossesse.....	27
2.1.4. Immunité du fœtus et du nouveau-né.....	29



2.1.4.1. Le développement du système immunitaire in utero.....	29
2.1.4.2. L'immunité du nouveau-né .....	32
2.2. Aspects épidémiologiques du PAG .....	33
2.3. Mécanismes de séquestration des parasites et Immunité spécifique du PAG .....	34
2.4. Immunité du nouveau-né et paludisme .....	34
2.5. Les Effets du PAG sur la santé de la mère et du nouveau-né.....	35
2.5.1. Effet mutuel paludisme-grossesse.....	36
2.5.2. Les conséquences du paludisme gestationnel .....	36
2.5.2.1. Les conséquences chez la future mère.....	36
2.5.2.2. Les conséquences chez le fœtus et le nouveau-né.....	37
Chapitre 3: Mémoires immunologiques et développement du vaccin à base du VAR2CSA pour prévenir le PAG.....	37
3.1. Immunité contre le paludisme et mémoires immunologiques anti-VAR2CSA spécifique du PAG .....	38
3.2. Développement du vaccin spécifique du PAG .....	39
PARTIE II: PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....	42
PARTIE III: CADRE ET METHODES D'ETUDE .....	46
Organisation de la thèse en alternance .....	47
Chapitre 1: Projet STOPPAM: suivi longitudinal d'une cohorte de femmes enceintes et de leurs nouveau-nés .....	47
1.1. Description de l'étude STOPPAM .....	48
1.2. Etudes de l'impact du PAG sur les réponses immunologiques du nouveau-né dans le cadre du projet STOPPAM .....	49
1.2.1. Etude de la réponse innée via la stimulation des récepteurs TLR (STOPPAM).....	49
1.2.2. Etude de la réponse adaptative via la caractérisation des cellules T (STOPPAM).51	
1.3. Etude de la réponse mémoire spécifique au VAR2CSA-DBL5 chez les femmes enceintes (STOPPAM) .....	52
Chapitre 2: Etude PLACMALVAC, le développement clinique d'un vaccin contre le PAG ..	54
2.1. Description de l'étude PlacMalVac .....	54

2.2. Méthodes d'étude.....	54
2.2.1. Echantillonnage.....	54
2.2.2. Isolement, congélation et décongélation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC).....	55
2.2.3. Quantification des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène.....	56
2.2.4. Mesure des cytokines dans les surnageants de culture après stimulation avec l'antigène vaccinal .....	57
Chapitre 3: Analyse statistique .....	58
PARTIE IV: RESULTATS .....	59
ARTICLE 1: Malaria modifies neonatal and early-life Toll-like receptor cytokine responses	60
ARTICLE 2: Infants' Peripheral Blood Lymphocyte composition reflects both maternal and post-natal infection with <i>Plasmodium falciparum</i> .....	62
ARTICLE 3: Infections with <i>Plasmodium falciparum</i> during pregnancy affect VAR2CSA DBL5 domain-specific T cell cytokine responses .....	64
ARTICLE 4: Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PlacMalVac: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae.....	66
DISCUSSION GENERALE .....	68
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	80

## Remerciements

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du savoir, du bonheur; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries ». Ainsi, au terme de ce travail, il m'est agréable de rendre hommage à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation.

Je voudrais rendre grâce à Dieu et exprimer mes remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont soutenu et œuvré à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie les membres du jury de l'honneur pour juger ce travail:

Merci au Professeur **Pierre Tissières** en tant que rapporteur et pour ses conseils sur les perspectives de recherche sur l'immunité des nouveau-nés

Merci au Docteur **Emmanuel Hermann** en tant que rapporteur

Merci au Professeur **Benjamin Mordmueller**, en tant qu'examineur.

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur **Nadine Fievet**, pour avoir conduit ce travail.

Merci pour ton soutien, tes conseils toujours très pertinents ainsi que pour ta disponibilité et les discussions scientifiques très enrichissantes qui m'ont permis d'approfondir mes réflexions scientifiques.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au Professeur **Kabirou A. Moutairou** pour sa disponibilité à conduire ce travail. Merci pour votre soutien, votre appui et vos conseils.

Merci au Professeur **Adrian JF Luty** pour avoir dirigé en partie cette thèse, sa disponibilité et son encadrement scientifique. Reçois ici ma profonde gratitude.

Je remercie les Professeurs **Achille Massougboji**, et **Philippe Deloron**, pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes et laboratoires à Cotonou et à Paris pour cette thèse en cotutelle ainsi que pour leurs précieux conseils.

Merci à **Florence Migot-Nabias**, **Gwladys Bertin**, **Magalie Dambrun** et **Guillaume Escriou** pour la disponibilité, l'aide et les conseils pendant mes séjours à Paris.

Merci au Professeur **Peter Kremsner** et son équipe à **Tübingen**. Thank you for the opportunity you gave me in your lab and for your scientific assistance.

Je remercie chaleureusement le Professeur **Akadiri Yessoufou** pour son soutien et ses conseils.

A toute l'équipe de MERIT-UMR216 IRD, merci pour votre accueil chaleureux:

Aux docteurs **Jean-Philippe Chippaux**, **Michel Cot**, **André Garcia**, **Jean-Yves LeHesran**, **Rachida Tahar**, **Sayeh Guemouri**, **Carine Baxerre**, **Gilles Cottrell**, **Valérie Briand**, **Audrey Sabbagh**, **Anaïs Mercks**, **Jérôme Clain**, **Romain Duval** et **Jean-Gérard Gobert** et à **Jacqueline Milet** pour leur appui et leurs précieux conseils.

*A mes collègues de Paris: **Pascale, Carmen, Murielle, Isabelle, Brigitte, Kossiwa, Violetta, Nicolas, Laure, Alexandra, Jemila, Florentin, Tania, Edwige, Jessica, Claire, Margaux, Sissoko**, merci pour les bons moments et pour la sympathie.*

*A mes collègues du CERPAGE à Cotonou, **Rafiou, Justin, Ibrahim, Léonidas, Aurax, Rodolphe, Atika, Pépin, Charles, Aticatou-lai, Carine, Bertin, Nadia, Bienvenu, Darius, Manfred, Gino, Yannelle, Honoré, Sylvestre, Alexandre, Erasme, Silvain, Justine, Azizath, Paulin, Private, Grâce, Roméo, Euripide, Emmanuel, Emilienne, Stéphanie, Inès, Anani, Moïse, Erik, Jacqueline, Gbetognon, Gildas** merci pour les bons moments.*

*Merci à **Parfait Houngbegnou et Gilles Cottrell** pour vos conseils et les analyses statistiques  
Merci à **Sévérin, Joseph, Jacques, Ginette, Sophie, et Soazic** pour votre disponibilité.*

*Merci au **Docteur Issifou Saadou, au docteur Smaila Ouedraogo et au doyen Jean Claude Sagbo** pour vos sages conseils.*

*A **Odilon, Firmine, Sem, Samad, Tatiana**, merci pour le travail en équipe.*

*Merci au Professeur **Pierre Tissières** et à son équipe, aux Docteurs **Louis Augusto et Bella Chourouk**, pour la nouvelle collaboration sur les transcrits du complexe MD2-TLR4.*

*Mes sincères remerciements à toute l'équipe de l'IRD/CERPAGE au Bénin et aux partenaires des projets STOPPAM, PlacMalVac/PAMVAC.*

*Aux amis, **Grâce, Léonce, Armand, Florentin, Jean Jacques, Frédy, Charles, Rufin, Zaki, Cyrience, Aubierge**, merci pour votre soutien et votre amitié.*

*Mes sincères remerciements aux enquêtrices, aux sages femmes pour l'immense travail accompli et aux mères et enfants ayant accepté de participer à l'étude STOPPAM et PLACMALVAC.*

*Je remercie l'Institut de Recherche pour le Développement et le Gouvernement Français pour m'avoir accordé ce financement de thèse.*

*A toute ma famille, je dis un grand merci de veiller sur moi.*

*Mes très chers parents, **Gbédandé Amavi et Donou Justine**, pour tout ce qu'ils m'ont apporté, pour leur amour, leur soutien. C'est grâce à vous que j'en suis arrivé là.*

*A mes frères et sœurs, **Cécile, Viviane, Happy, Richard, Jules, Alphonsine, Christine, Epiphanie, Cédric**, merci pour tout l'amour que vous m'apportez malgré la distance. Merci pour tous les sentiments forts qui nous lient.*

*A **Stalette Adodo**, merci pour ton affection et ton soutien.*

*A mes **oncles et tantes et leurs familles** respectives, merci pour vos conseils.*

*A mes **cousins et cousines**, merci pour le soutien fraternel et bon courage à vous.*

*A tous ceux qui de près ou de loin ont participé à sa réalisation!*

## Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique  
AIRD : Agence inter-établissements de recherche pour le développement  
AMA-1 : Apical membrane protein-1  
BCR: B Cell Receptor  
CBA: Cytometric Bead Array  
CD: Classe de différenciation  
CERPAGE : Centre d'étude et de recherche sur le paludisme associé à la grossesse et à l'enfance  
CIDR: inter-domaines riches en cystéines  
CLR: C-type lectin receptors  
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA: Cellule présentatrice d'antigène  
CpG ODN: Cytosine triphosphate guanine triphosphate deoxynucleotide  
CPN: Consultation prénatale  
CSA: Chondroïtine Sulfate A  
CSP: Circum Sporozoite Protein  
CTA: combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine  
DBL: Duffy Binding Like  
DC: cellules dendritiques  
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ELISPOT: Enzyme-Linked ImmunoSpot  
EPCR: Endothelial Protein C Receptor  
GALT: Gut-associated lymphoid tissue  
GE: Goutte épaisse  
GLURP: Glutamate rich protein  
GSK: GlaxoSmithKline  
HLA: Human Leucocyte Antigen  
HRP-2: (Histidine-Rich Protein-2)  
ID: Inter domaine  
IFN- $\gamma$ : Interferon gamma  
Ig: immunoglobuline  
IL: interleukine  
ILC: Innate Lymphoid cell  
LAMP: Loop Mediated Isothermal Amplification  
LB: Lymphocyte B  
LPS: Lipopolysaccharide  
LT: Lymphocyte T  
MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue  
MERIT : Mère et enfant face aux infections tropicales  
MIILD: moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée  
MSP: Merozoite surface protein  
NK: Natural killer  
OMS: Organisation mondiale de la santé

PAG: Paludisme associé à la grossesse  
PAMP: Pathogen-associated molecular patterns  
PAMVAC: Pregnancy associated malaria vaccine  
PBMC: Peripheral blood mononuclear cell  
PCR: Réaction de polymérisation en chaîne)  
PfEMP: *P. falciparum*-Erythrocyte Membrane Protein-1  
PHA: Phytohemagglutinin  
PID: pulvérisation intra-domiciliaire  
PlacMalVac : Placental malaria vaccine  
pLDH: *Plasmodium* lactate déshydrogénase  
PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme  
Poly I.C: Polyribonucleosinic-polyribocytidylic  
PPD: Purified protein derivative  
PRR: Pattern Recognition Receptor  
QBC: Quantitative Buffy-Coat  
R848: Résiquimod  
SP: Sulfadoxine-pyriméthamine  
STOPPAM: Strategies To Prevent Pregnancy Associated Malaria  
TCR (T Cell Receptor)  
TDR: Tests de diagnostic rapide  
Teff: T effecteur  
TLR: Toll Like-Receptors  
TNF: Tumor necrosis factor  
TPIg: Traitement préventif intermittent au cours de la grossesse  
Treg: T régulateur  
TT: Toxine tétanique  
uNK: uterine natural killer



## Liste des figures

Figure 1: Répartition géographique du paludisme dans le monde [30].....	7
Figure 2: Cycle évolutif du <i>Plasmodium falciparum</i> [36].....	9
Figure 3: activation du TLR (interface moléculaire entre immunité innée et acquise) [126] ..	24
Figure 4: Structure des récepteurs TLR [135] .....	25
Figure 5: Expression en surface et intracellulaire des TLR [137].....	25
Figure 6: immunologie de la grossesse [142].....	28
Figure 7: Développement du système immunitaire <i>in utero</i> [162].....	31
Figure 8: Structure schématique de la protéine VAR2CSA [224] .....	38
Figure 9: Localisation des 2 sites d'étude STOPPAM et PlacMalVac et du laboratoire à Cotonou .....	47
Figure 10: Suivi longitudinal des femmes enceintes et des nouveau-nés dans le cadre du projet STOPPAM Bénin .....	49
Figure 11: Protocole expérimental de la stimulation des CPA via les TLR.....	50
Figure 12: Principe du dosage des cytokines par la technique CBA.....	51
Figure 13: Caractérisation des différentes populations T lymphocytaires .....	52
Figure 14: Marquage intracellulaire des cellules T sécrétrices de l'IFN- $\gamma$ .....	53
Figure 15: Suivi longitudinal des primigestes de PlacMalVac au Bénin .....	55
Figure 16: Quantification des cellules B par la technique ELISPOT.....	57

## Liste des tableaux

Tableau 1: Distribution cellulaire et agonistes des récepteurs TLR.....	27
Tableau 2: Les études sur l'acquisition de l'immunité au VAR2CSA avec les différents domaines indiquant la relation entre les niveaux d'anticorps et la parité. Les moments du prélèvement pendant la grossesse ou à l'accouchement sont indiqués [217]. .....	41

## Résumé

L'objectif général de ce travail était d'étudier certains mécanismes immunologiques de la mise en place d'une mémoire spécifique et protectrice au candidat vaccin contre le paludisme associé à la grossesse (PAG). Deux projets complémentaires (STOPPAM et PlacMalVac) ont été mis en place par des consortiums européens et africains en vue du développement d'un vaccin contre le PAG. Le projet STOPPAM est fondé sur un suivi de cohortes de 1037 femmes enceintes et de 222 nouveau-nés avec comme objectif de caractériser les parasites de *P. falciparum* pour identifier un candidat vaccin contre le PAG et aussi d'étudier les conséquences du PAG sur la santé de la mère et du nouveau-né. L'objectif du projet PlacMalVac est de réaliser un essai clinique de phase I chez des femmes volontaires saines et en parallèle préparer un essai clinique de phase II par une étude de faisabilité avec un suivi de cohorte de 50 femmes enceintes primigestes.

Dans une première partie, nous avons étudié les conséquences du PAG sur les profils de réponses immunologiques des nouveau-nés de la naissance à 12 mois. Deux études ont été ainsi réalisées chez les enfants issus des mères présentant différentes histoires palustres au cours de la grossesse et donc des contacts *in utero* avec des antigènes palustres à différents moments de la grossesse. Nous avons étudié l'évolution des réponses cytokiniques à des ligands de TLR ainsi que les fréquences des lymphocytes CD4, CD8, Treg, NK et NKT. Nos résultats montrent que ce sont les infections à l'accouchement qui pourraient modifier et altérer l'activation du système immunitaire inné et adaptatif. Cette altération influencerait la mise en place d'une immunité protectrice chez les nouveau-nés pendant leurs premières années de vie.

La deuxième partie de notre travail s'est intéressée à l'évaluation des réponses immunologiques des cellules T et B mémoires spécifiques du candidat vaccin VAR2CSA. Deux études ont été réalisées pour évaluer:

- i) Les réponses des cellules T mémoires chez deux sous groupes de femmes enceintes du projet STOPPAM prélevées au début de la grossesse et à l'accouchement. Nous avons caractérisé des réponses des cellules T mémoires spécifiques de VAR2CSA-DBL5 via la fréquence des cellules T sécrétrices de l'IFN- $\gamma$  et la mesure de 5 cytokines dans les surnageants de culture après stimulation des cellules mononucléées. Nos résultats montrent que l'infection palustre au cours de la grossesse est associée à une plus forte production d'IFN- $\gamma$  à l'accouchement en réponse à la stimulation *in vitro* avec VAR2CSA-DBL5 et la PHA.

ii) Les réponses des cellules T et B mémoires chez les primigestes du projet PlacMalVac afin d'étudier la construction naturelle de la mémoire spécifique à la protéine VAR2CSA durant la première grossesse. Les cellules mononucléées ont été isolées et congelées à partir des prélèvements du sang veineux collectés à 4 différents moments au cours du suivi (premier et cinquième mois de grossesse, à l'accouchement et 6 mois après accouchement). Nous avons quantifié les cellules B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal PAMVAC (ID1-DBL2-ID2a) ainsi que les cytokines dans les surnageants de culture après stimulation des cellules. L'infection palustre au cours de la grossesse est associée à une augmentation de la fréquence des cellules B mémoires.

Ces résultats suggèrent, l'acquisition via des infections naturelles au cours de la première grossesse, d'une mémoire anti-VAR2CSA protectrice pour la prévention du PAG.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans la plus grande susceptibilité des nouveau-nés aux infections liées au PAG pendant l'enfance et aussi l'acquisition naturelle d'une mémoire immunologique contre le PAG spécifique du candidat vaccin VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a) qui est en cours d'essai clinique de phase I au Bénin et en Allemagne.

**Mots clés:** vaccin, VAR2CSA, immunité, cellules T, cellules B, réponses mémoires, *P. falciparum*, grossesse, nouveau-né, TLR, Lymphocytes Treg

## Abstract

The aim of this work was to investigate the development of cellular immunological memory with specificity for a vaccine candidate targeting malaria during pregnancy. Two complementary studies (STOPPAM and PlacMalVac) were implemented by different European and African consortia and the end result is the clinical development of a pregnancy-associated malaria (PAM) vaccine. The STOPPAM project comprised a follow-up study of 1037 pregnant women and 222 of their children. We evaluated immunological and parasitological parameters during pregnancy in order to facilitate the identification of a PAM vaccine candidate. The PlacMalVac project aimed to prepare the future clinical trial Phase II through a follow-up study conducted in a cohort of 50 primigravid women and also to perform a Phase I clinical trial with healthy adult volunteers.

We started by investigating the impacts of PAM on the immunological responses of newborns of mothers in the STOPPAM cohort. Cytokine production in response to TLR stimulation was evaluated and *ex vivo* phenotyping of different subsets of lymphocytes and immune cells was performed. Our findings suggest that placental infection at delivery altered the neonatal innate and adaptive immune responses that may have consequences for the development of immune responses in infancy.

Next we focused on the immunological memory aspects related to the VAR2CSA vaccine candidate for malaria during pregnancy. Two different studies were performed to evaluate:

- i) VAR2CSA-DBL5 domain-specific IFN- $\gamma$ -secreting T-cell frequencies and five cytokine responses quantified using flow cytometric techniques. The study was carried out in two subgroups of pregnant women early in pregnancy and at delivery. Our data showed that PBMC at delivery of mothers with a history of infection during pregnancy but who were uninfected at delivery displayed significantly increased production of IFN- $\gamma$  in response to both PHA and DBL5 stimulation compared to uninfected women.
- ii) Memory B and T cell responses to the VAR2CSA sub-unit vaccine candidate PAMVAC (ID1-DBL2-ID2a) in a cohort of pregnant primigravid Beninese who were followed up throughout pregnancy. Mononuclear cells from peripheral blood collected on 4 occasions (first and fifth month of pregnancy, at delivery and 6 months post-delivery) were isolated and cryopreserved under liquid nitrogen. The concentrations of 6 cytokines produced in response to the vaccine antigen were quantified in supernatants of stimulated cells using cytometric bead array. The frequencies of vaccine antigen-specific antibody-secreting memory B cells were evaluated in the same cell samples using standard ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) assays.

We observed that the frequencies of memory B cells with specificity for the vaccine candidate increased as a function of gestational age (from the first month of pregnancy to delivery) and of infection with *P. falciparum* during pregnancy.

The results suggest that the induction of the cellular immunological memory responses to VAR2CSA required for protection against PAM may occur during first pregnancies and requires contact with antigen arising from naturally-acquired infections during those pregnancies.

All the work done in this thesis provides an understanding of the immunological mechanisms involved an increased susceptibility during childhood due to PAM and also the progressive induction of immune memory to the candidate VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a) vaccine for prevention of malaria during pregnancy.

Keys words: Vaccine, VAR2CSA, immunity, T cell, B cell, memory response, *P. falciparum*, pregnancy, newborn, TLR, Treg cells

# **INTRODUCTION**



Près de la moitié de la population mondiale vit en zone d'endémie palustre. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé en 2015 que le paludisme engendrait 214 millions d'infections cliniques et 438 000 décès [1]. Les données statistiques actuelles montrent une diminution du nombre de cas de paludisme estimée à 18% par rapport aux années 2000 pendant lesquelles on observait 262 millions d'infections cliniques. Ces données résultent des efforts considérables réalisés dans les domaines de la lutte anti-vectorielle, de la prévention et de la prise en charge du paludisme. L'OMS a récemment élaboré des stratégies de lutte contre le paludisme à l'horizon 2030, visant à réduire d'au moins 90% l'incidence et la mortalité du paludisme au plan mondial par rapport aux statistiques de l'année 2015, ainsi que l'élimination de cette infection dans une trentaine de pays [2]. Si certains pays (Émirats arabes unis, Maroc, Turkménistan, Arménie, Maldives et Sri Lanka) ont été certifiés par l'OMS comme ayant éliminé le paludisme au cours des 10 dernières années, d'autres pays doivent continuer à mobiliser des ressources financières et humaines pour lutter contre le paludisme.

Les programmes nationaux de lutte contre le paludisme, avec l'appui de bailleurs de fonds notamment le Fonds Mondial, ont amélioré le contrôle de l'infection à *Plasmodium falciparum* avec des distributions de moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action (MILD), des tests de diagnostic rapide, des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et le traitement préventif intermittent des femmes enceintes [1]. Malgré ces avancées, le paludisme à *P. falciparum* reste un problème de santé publique majeur en zone d'endémie. Les populations à risque sont les sujets immunodéprimés, les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans. La majorité des décès surviennent chez les enfants de moins de 5 ans, avec près de 90% des décès en Afrique Subsaharienne [1]. Deux pays, le Nigéria et la République démocratique du Congo, ont totalisé plus de 35 % des décès mondiaux dus au paludisme en 2015 [1].

Parmi les 5 espèces de parasites, seules 2 espèces ont des conséquences sur la grossesse: *P. falciparum* et *P. vivax*. Ce dernier n'étant que très peu présent en Afrique de l'Ouest, nous ne décrirons que les conséquences de la forme à *P. falciparum*, la plus virulente, responsable des formes cliniques graves et de la mortalité attribuée au paludisme.

Le paludisme gestationnel est responsable d'une morbidité importante chez la femme enceinte et le nouveau-né avec, chez ce dernier une mortalité importante. Malgré des stratégies de contrôle, il subsiste une charge morbide qui nécessite de poursuivre les recherches. L'impact du paludisme associé à la grossesse (PAG) est plus important à la première grossesse et diminue progressivement lors des grossesses ultérieures [3, 4]. Dans les zones de transmission

stable du parasite, c'est lors de leur première grossesse que les femmes enceintes (primipares) sont les plus susceptibles au PAG [5] car elles n'ont pas encore acquis de mémoire immunologique protectrice contre les parasites placentaires.

En zone d'endémie palustre, la prévalence du paludisme est plus élevée chez les femmes enceintes, notamment chez les primipares, que chez les autres sujets [6]. Le PAG a pour conséquence d'accroître le risque d'anémie maternelle, d'avortement précoce et de retard de croissance *in utero* [7], engendrant une réduction du poids de naissance avec de graves conséquences sur la morbidité et la mortalité infantiles [8, 9]. Le contact *in utero* avec des antigènes solubles du paludisme est associé à une altération des réponses immunologiques dans le sang du cordon du nouveau-né [10, 11] et à une plus grande susceptibilité de l'enfant au paludisme et à d'autres infections pendant sa première année de vie [12, 13]. Au total, la prévention du PAG est essentielle pour assurer la bonne santé de la mère et de son enfant.

La gravité de l'infection palustre à *P. falciparum* au cours de la grossesse est attribuée à :

- i) des interactions entre un antigène parasitaire exprimé à la surface des hématies parasitées et un récepteur cellulaire placentaire, la chondroïtine sulfate A (CSA), facilitant l'adhésion des hématies infectées par *P. falciparum* au tissu placentaire [14];
- ii) une immunomodulation qui inhibe les réponses inflammatoires délétères au bon déroulement de la grossesse mais nécessaires à l'élimination des parasites.

Les parasites du PAG sont donc différents des autres parasites et expriment un phénotype spécifique qui va leur permettre de cyto-adhérer aux récepteurs placentaires. Au moment d'une infection transmise par un anophèle au cours de la grossesse, les parasites du phénotype placentaire vont être sélectionnés alors que les autres phénotypes parasitaires seront éliminés par le système immunitaire.

L'étiologie physiopathologique et immunopathologique des effets du PAG n'est pas totalement élucidée mais des études suggèrent qu'une seule infection pendant la grossesse et plus particulièrement celles du premier trimestre de gestation peuvent être associées à une anémie et à un faible poids de naissance [15, 16].

Les problèmes d'accès à un diagnostic fiable et à une prise en charge rapide des cas, du développement de nouvelles résistances médicamenteuses ou aux insecticides, d'accessibilité aux nouvelles molécules efficaces ainsi que des choix politiques et financiers à l'échelle de chaque pays, rendent le contrôle du paludisme imparfait. Un vaccin pourrait donc représenter une alternative essentielle pour prévenir le PAG et ses conséquences sur la santé de la mère et du nouveau-né.

Depuis une quinzaine d'années, une approche plus fondamentale de la compréhension des mécanismes de séquestration du *P. falciparum* dans le placenta et des réponses immunologiques au paludisme chez la mère a permis l'identification de candidats vaccins (VAR2CSA) spécifiques du PAG [14, 17-23].

Le projet STOPPAM, réalisé par un consortium de 6 pays (France, Danemark, Pays-Bas, Suède, Tanzanie et Bénin) et financé par l'Union Européenne a permis des études de cohortes de femmes enceintes destinées à quantifier les effets du PAG sur la santé de la mère et du nouveau-né. Deux études similaires ont été menées en Afrique de l'Est (Tanzanie) et de l'Ouest (Bénin) afin de comparer les résultats provenant de zones de transmission différentes. Les résultats immuno-pathologiques et parasitologiques en relation avec le moment et la durée de l'infection palustre au cours de la grossesse ont procuré une base structurelle pour le développement d'une stratégie vaccinale contre le PAG [15, 17, 24]. Des épitopes de VAR2CSA cross-réactifs capables d'induire une réponse immunitaire protectrice contre divers variants parasitaires ont été identifiés et sont intégrés dans la composition d'un nouveau vaccin contre le PAG.

Le projet PlacMalVac, suite du projet STOPPAM, également financé par l'Union Européenne a pour principal objectif le développement clinique d'un vaccin contre le paludisme associé à la grossesse. Un nouveau consortium (Bénin, Allemagne, Danemark et France) a sélectionné une partie de l'antigène VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a) pour la formulation du vaccin contre le PAG. Ce vaccin, produit par génie génétique, a servi à l'étude de toxicologie chez l'animal et fait l'objet d'un essai clinique de Phase I chez l'homme. Cette protéine vaccinale (ID1-DBL2-ID2a) a été utilisée pour l'étude de la mémoire immunologique contre le PAG, qui fait l'objet de mon travail de thèse.

Les objectifs du projet PlacMalVac étaient de réaliser un essai clinique de Phase Ia en Allemagne et Phase Ib au Bénin et, en parallèle, de faire une étude de faisabilité de l'essai clinique de Phase II chez des femmes béninoises non enceintes ainsi qu'une étude d'acceptabilité du vaccin contre le PAG au Bénin. En s'inscrivant dans ce cadre, mes travaux de thèse s'articulent autour de l'étude des réponses immunologiques cellulaires chez les femmes enceintes (multigestes et primigestes) et les nouveau-nés à partir des différents suivis de cohortes des projets STOPPAM et PlacMalVac.

**PARTIE I:**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre 1: Généralité sur le paludisme

### I- Paludisme

Le paludisme ou *malaria* est une parasitose due à la multiplication dans les cellules hépatiques et érythrocytaires d'un hématozoaire du nom de *plasmodium*, transmis par un moustique, du genre anophèle.

Le paludisme sévit dans les régions tropicales et subtropicales. Selon le rapport de l'OMS en 2015, plus de trois milliards d'individus sont exposés au risque du paludisme [1]. D'après ce même rapport, depuis 2001, 663 millions de cas de paludisme ont été évités en Afrique subsaharienne. Ceci est le résultat direct de l'extension des trois principales interventions de lutte contre le paludisme : les moustiquaires imprégnées d'insecticide, la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations et combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Les moustiquaires ont eu le plus fort impact, représentant environ 68% des cas évités grâce à ces interventions [1]. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, introduites à grande échelle au cours de la dernière décennie, ont été très efficaces contre *P. falciparum*, le parasite responsable des conséquences graves du paludisme.

#### 1.1- Etiologie et épidémiologie

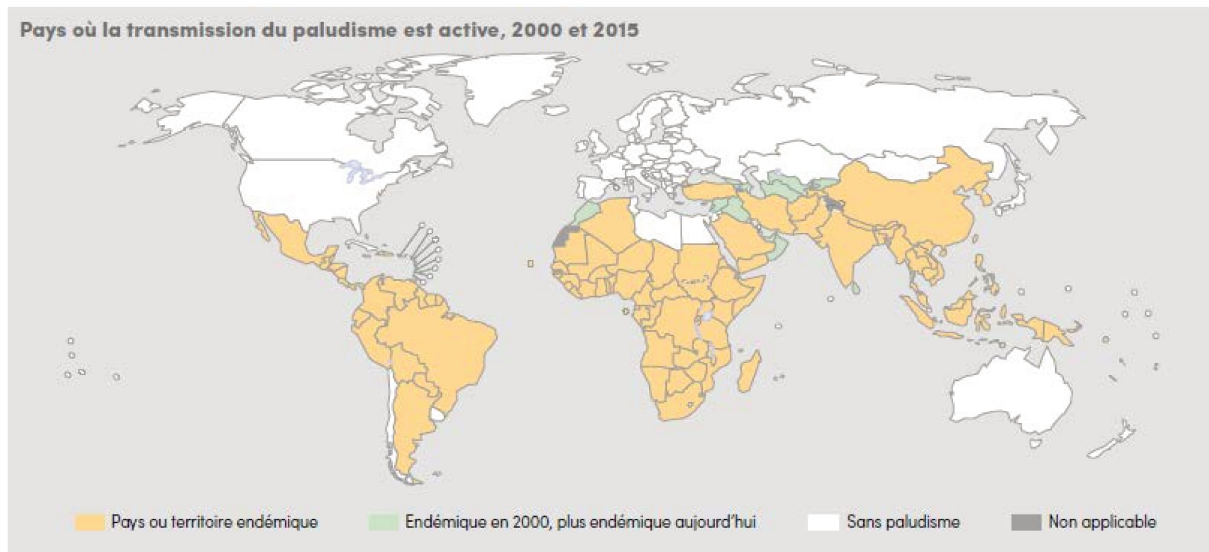
Le *plasmodium* est un hématozoaire dont cinq espèces sont responsables de l'infection palustre chez l'homme :

- *Plasmodium falciparum*: est l'espèce la plus fréquente, responsable d'accès fébriles simples susceptibles de se transformer en accès graves et mortels (pernicieux) en l'absence d'un traitement adapté et d'une prise en charge [25].
- *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* [26, 27] sont responsables des accès palustres simples.

L'agent pathogène est un parasite du genre *Plasmodium* dont l'homme est le seul réservoir. La transmission se fait par la piqûre infectante de l'anophèle femelle (vecteur du parasite). Le paludisme congénital est possible mais rare [28].

Selon les statistiques actuelles, le paludisme reste une maladie très répandue. Près de la moitié de la population mondiale vit de nos jours dans des zones d'endémie palustre (**Figure 1**). Ainsi il reste d'importants défis à relever pour l'éradication du paludisme malgré les progrès considérables pour la lutte contre cette infection. Quinze pays, en Afrique essentiellement, totalisent la majeure partie des cas du paludisme [29] et des décès (78 %) au niveau mondial. La faiblesse des systèmes de santé dans plusieurs pays continue à entraver les progrès dans la lutte contre le paludisme. Des millions de personnes ne reçoivent toujours pas les soins dont ils ont besoin pour prévenir et traiter la maladie. En 2014, l'OMS dénombrait qu'un tiers des

populations exposées au risque du paludisme en Afrique subsaharienne vivaient sans moustiquaires imprégnées d'insecticide ou sans pulvérisation d'insecticide à l'effet durable [30].



**Figure 1: Répartition géographique du paludisme dans le monde [30]**

Au Bénin, selon l'annuaire des statistiques sanitaires national de 2014, le paludisme était la première cause d'hospitalisation avec 29,2% des cas enregistrés et 26% des décès. Parmi les principales causes d'hospitalisation chez les enfants de moins de 5 ans, le paludisme représentait 56,1% des cas recours aux soins [31].

La prise en charge du paludisme est en principe gratuite pour les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans, mais elle engendre néanmoins pour les populations déjà vulnérables des dépenses financières, les plongeant davantage dans l'extrême pauvreté [31]. Cette prise en charge concerne uniquement le dépistage par TDR (test de diagnostic rapide) et le traitement. La lecture d'une goutte épaisse et l'hospitalisation ne sont pas prises en charge par le programme national.

## 1.2- Cycle évolutif du parasite

Le parasite effectue deux multiplications asexuées ou schizogonie chez l'homme et une multiplication sexuée ou sporogonie chez l'anophèle femelle (**Figure 2**).

### ● Chez l'homme

En piquant l'homme, l'anophèle lui inocule des milliers de sporozoïtes. En une demi-heure, ces sporozoïtes atteignent les cellules hépatiques où s'effectue la schizogonie exo-érythrocytaire puis la schizogonie érythrocytaire.



### **a - Schizogonie exo-érythrocytaire**

Dans le foie, le sporozoïte pénètre dans un hépatocyte et se transforme en cryptozoïte dont le noyau se divise plusieurs fois pour donner un schizonte géant ou « corps bleu ». Après une maturation de 7 à 15 jours, la membrane du corps bleu se perforé libérant des milliers de mérozoïtes (10 000 à 30 000 selon les espèces). Certains schizontes, appelés hypnozoïtes, restent à l'état latent dans les cellules hépatiques et sont responsables des rechutes tardives. Ces hypnozoïtes n'existent pas au sein des espèces *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. knowlesi*.

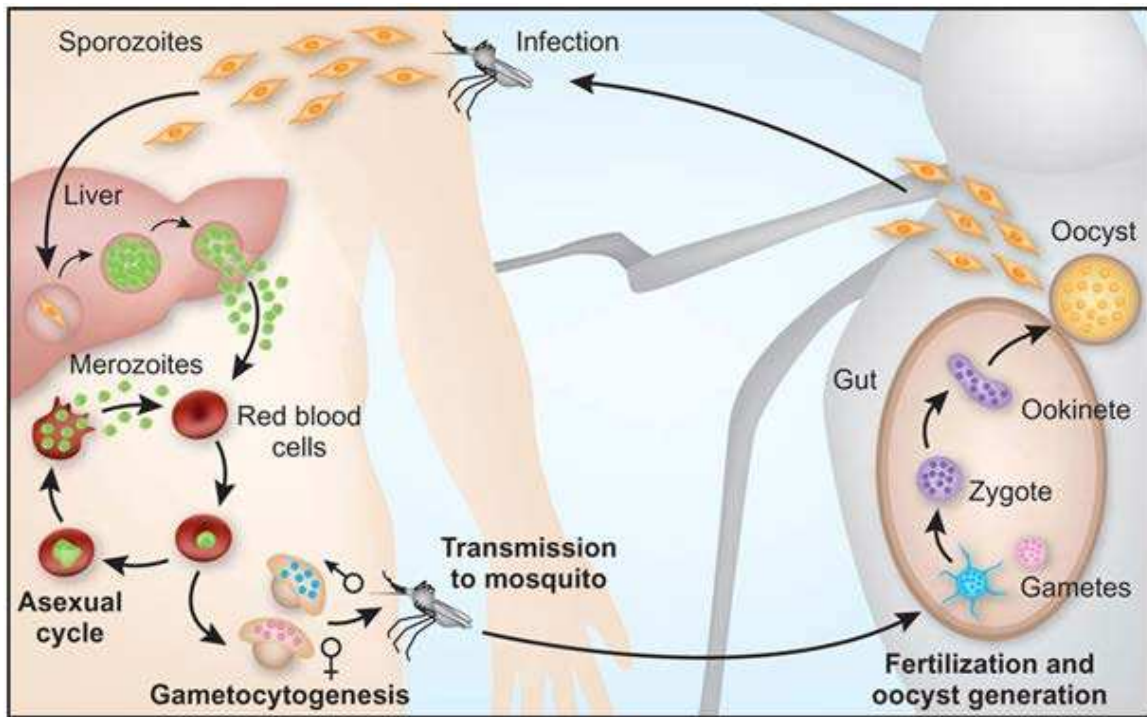
### **b - Schizogonie érythrocytaire**

Cette phase s'accompagne des signes cliniques et des symptômes du paludisme à savoir la fièvre et les maux de tête. La durée d'un cycle de multiplication du parasite varie en fonction de l'espèce: de l'ordre de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*; de 72 heures pour *P. malariae* [32] et de 24 heures pour *P. knowlesi* [33-35]. Chaque mérozoïte infecte une hématie et devient un trophozoïte qui mature et se développe en forme d'une « bague à chaton ». Son noyau se divise, le trophozoïte devient un schizonte multinucléé ou « corps en rosace ». La membrane de ce dernier se perforé libérant des mérozoïtes qui vont perpétuer le cycle érythrocytaire.

Après plusieurs cycles schizogoniques érythrocytaire ou suite au stress provoqué par un traitement antipaludique, certains trophozoïtes mûrs se transforment et se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Ces derniers restent dans le sang périphérique de l'homme (hôte intermédiaire) et seront ingérés par un anophèle femelle lors d'un repas sanguin perpétuant ainsi le cycle du parasite.

### **• Chez l'anophèle : sporogonie**

En piquant l'homme infecté, l'anophèle aspire du sang contenant les gamétocytes mâles et femelles. Ces derniers gagnent son estomac et se développent en gamètes. La fécondation des gamètes donne un œuf mobile diploïde appelé ookinète qui se transforme en oocyste. A l'intérieur de l'oocyste les cellules parasitaires se multiplient par division cellulaire dont la première est une méiose donnant des cellules haploïdes. Après plusieurs jours de maturation, chaque oocyste libère des milliers de sporozoïtes haploïdes. Ces sporozoïtes gagnent les glandes salivaires de l'anophèle et sont transmis à un nouvel hôte intermédiaire (homme) à l'occasion d'une nouvelle piqûre.



**Figure 2: Cycle évolutif du *Plasmodium falciparum* [36]**

### 1.3- Immunité et physiopathologie

Chez l'homme, l'acquisition de l'immunité anti-palustre effective à *P. falciparum* se développe très lentement et nécessite des expositions répétées dans le temps aux antigènes palustres [37, 38]. Cette immunité disparaît en absence d'expositions continues aux antigènes palustres [39-41]. Les mécanismes immunologiques responsables de l'échec de la mise en place ou du maintien d'une immunité efficace et protectrice contre le paludisme (maladie ou vaccin) ne sont que partiellement connus. Si la diversité antigénique des parasites joue un rôle important; il est de plus en plus évident que les parasites interagissent avec le système immunitaire de l'hôte et induisent des changements qualitatifs et fonctionnels des lymphocytes T et B mémoires qui pourraient expliquer en partie le phénomène d'évasion immunitaire. La plupart des études sur l'immunité anti-palustre se concentrent sur la réponse humorale via les anticorps sécrétés par les lymphocytes B [42-44]. Néanmoins les lymphocytes T ainsi que les cellules de l'immunité innée participent à la mise en place de cette immunité avec l'initiation des réponses inflammatoires nécessaires à l'élimination des parasites [38, 45].

En zone d'endémie, à la suite d'infections répétées, le sujet acquiert une immunité appelée "prémunition". Cette immunité limite l'impact de la gravité du paludisme et le risque des complications. Cette immunité disparaît après 1 à 2 ans, en absence d'exposition du sujet au parasite, suite à la sortie de l'individu de la zone d'endémie ou à une prise de

chimioprophylaxie antipaludéenne. Les personnes développant une immunité naturelle au paludisme peuvent aussi héberger des parasites, sans pour autant révéler de signes cliniques de la maladie; ce sont des infections asymptomatiques.

Les manifestations cliniques du paludisme sont principalement liées au déroulement du cycle:

- L'incubation silencieuse correspond à la phase hépatique.
- Le cycle érythrocytaire détermine les signes cliniques. Leurs gravités dépendent de l'espèce plasmodiale, de la parasitémie et du niveau d'immunité de l'hôte.
- La fièvre est associée à la libération de substances pyrogènes lors de la perforation de la membrane des hématies parasitées comme le pigment malarique appelé hémozoïne.
- L'anémie résulte de l'hémolyse massive.
- La splénomégalie et l'hépatomégalie sont liées à une activité immunitaire, phagocytaire et humorale importante.

L'anémie grave est l'une des conséquences du paludisme chez l'enfant (taux d'hémoglobine <5 g/dl) et chez les adultes (taux d'hémoglobine < 7 g/dl). Plusieurs autres signes graves ont été rapportés, dont les plus fréquents sont des troubles de la conscience, des détresses respiratoires, une insuffisance rénale, des œdèmes pulmonaires [46].

Le neuropaludisme est associé à une forte fièvre (allant de 39°C à 42°C), à un coma (score de blantyre < 3), à des convulsions et parfois à des manifestations psychiatriques [47, 48]. La physiopathologie du neuropaludisme est caractérisée par la séquestration des hématies parasitées dans les micro-vaisseaux cérébraux, des troubles métaboliques et immunitaires. Cependant les changements morphologiques des hématies infectées par *Plasmodium* les rendent plus susceptibles de se faire éliminer par la rate.

La capacité des hématies parasitées par *P. falciparum* à adhérer à certains récepteurs membranaires des cellules endothéliales ou placentaires de l'hôte comme CD36, ICAM1 (Inter Cellular Adhesion Molecule), CSA (chondroitin sulfate A) ou EPCR (endothelial protein C receptor) [49], favorise leurs séquestrations dans les organes profonds (cerveau, reins, poumons, placenta) [50, 51]. Ce phénomène de séquestration est responsable de la virulence et de la gravité du paludisme à *P. falciparum*. La cytoadhérence résulte de l'interaction entre les protéines parasitaires exprimées à la surface des hématies infectées et des récepteurs cellulaires. Parmi les différentes protéines exprimées à la surface des hématies parasitées, les protéines PfEMP1 (*P. falciparum*-Erythrocyte Membrane Protein-1) [52] sont les plus connues. D'autres protéines parasitaires comme RIFIN (repetitive interspersed family) [53], STEVOR (subtelomeric variable open reading frame) [54] et SURFIN (surface associated interspersed gene family) [55] pourraient favoriser la cytoadhérence.

## **1.4. Diagnostic biologique et stratégies de lutte contre le paludisme**

### **1.4.1. Diagnostic biologique**

Les techniques de diagnostic du paludisme reposent sur la mise en évidence directe ou indirecte de la présence du *Plasmodium*.

#### **Diagnostic direct**

- **Les techniques de la microscopie conventionnelle**

Elles sont basées sur la lecture de la goutte épaisse et du frottis sanguin réalisés à partir d'une goutte de sang périphérique déposée sur une lame. La sensibilité de la goutte épaisse est de 20 à 30 fois plus élevée que celle du frottis mince. Par contre le frottis permet de faire le diagnostic différentiel des différentes espèces plasmodiales. La technique de la microscopie via la goutte épaisse demeure l'examen de référence de l'OMS et est largement utilisée pour le diagnostic de routine.

- **Les techniques d'immunochromatographie**

Les Tests de Diagnostic Rapides (TDR) consistent en une détection rapide de 5 à 15 min, de la présence ou de l'absence d'un antigène de *Plasmodium* : la protéine HRP-2 (histidine-rich protein-2) spécifique du *P. falciparum* ou la pLDH (*Plasmodium* lactate déshydrogénase) spécifique de chaque espèce, dans le sang du patient à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques. Le principe des TDR repose sur un test d'immunochromatographie sur bandelette [29]. Il existe de nombreuses marques de TDR en fonction des fabricants. Cependant les TDR présentent certaines limites dues à la mauvaise détection en cas de faible parasitémie, en présence d'auto-anticorps ou de facteurs rhumatoïde à des taux élevés. Par ailleurs, la persistance pendant environ 15 jours de l'antigène HRP-2 dans la circulation sanguine, après disparition des parasites vivants (négativité par la lecture microscopique) induit des faux positifs à la lecture du TDR posant ainsi un problème de diagnostic.

- **La PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne)**

Elle consiste en la détection d'ADN parasite par l'amplification de ce dernier avec des amorces spécifiques afin de détecter les infections occultes avec des parasitémies très faibles. Cette technique est plus sensible et plus performante que la microscopie mais sa mise en place nécessite une plateforme de biologie moléculaire coûteuse et une compétence technique [56]. Par ailleurs, l'avantage de cette approche permet une détection des infections sub-microscopiques qui ont aussi des conséquences importantes sur la physiopathologie et sur le portage des parasites. La PCR est souvent utilisée en recherche pour la caractérisation des parasites, le génotypage et le phénotypage de ceux-ci afin d'étudier la pathogénicité et les

gènes de résistance aux antipaludiques. La PCR est une technique quantitative et qualitative permettant la différenciation des espèces plasmodiales.

- **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

La technique de la mise en évidence des antigènes parasitaires par ELISA (pLDH, HRP-2) est utilisée majoritairement en milieu hospitalier.

- **La technique de la microscopie à fluorescence**

Cette méthode est basée sur le marquage des acides nucléiques par l'acridine orange (fluorescente) qui est un intercalant de l'ADN: le « malaria test QBC » (Quantitative Buffy-Coat). La sensibilité de cette technique est de cinq hématies parasitées par microlites et elle nécessite un équipement particulier.

### **Diagnostic indirect**

Les techniques de diagnostic indirect permettent de détecter une infection palustre passée via la détection des anticorps spécifiques du *Plasmodium* dans le sérum ou dans le plasma par la technique ELISA.

### **Les méthodes de diagnostic en expérimentation**

- De nouvelles méthodes de diagnostic encore à l'état expérimental pourraient permettre d'optimiser l'identification des cas de paludisme. Il s'agit de l'utilisation des automates d'hématologie, de cytométrie ou des smartphones associés à des logiciels et des colorants spécifiques permettant une lecture automatisée pour la détection des parasites et l'estimation des parasitémies [57, 58].
- Une nouvelle technique de biologie, LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) basée sur l'amplification d'ADN parasitaire, vient d'être mise en place. Il s'agit d'une amplification sans extraction de l'ADN. LAMP est une méthode très sensible équivalente aux techniques de PCR, capable de détecter les faibles concentrations de parasites dans l'organisme [59, 60]. La méthode du LAMP est basée sur la mise en contact d'un échantillon de sang dans un flacon contenant des amorces dont la positivité est révélée par la fluorescence. Cette technique ne nécessitant pas un spécialiste pourrait apporter une avancée majeure dans le diagnostic rapide des infections palustres même avec une faible parasitémie (10 parasites par microlite) et permettre ainsi une prise en charge rapide de la maladie.

### **1.4.2. Stratégies de lutte contre le paludisme**

Les moyens de lutte contre le paludisme reposent actuellement sur des mesures de prévention (moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée (MIILD), assainissement de l'environnement domestique, la chimioprophylaxie) et le traitement médicamenteux (les

antimalariques, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine CTA). Cependant, l'émergence de résistance des vecteurs aux insecticides et des parasites aux antimalariques nécessite la recherche de nouvelles stratégies de contrôle du paludisme.

Le développement d'un vaccin antipaludique efficace est une priorité essentielle pour la prévention du paludisme et ses conséquences graves. Des progrès récents dans ce domaine permettent d'envisager avec optimisme la possibilité de mise au point de vaccins antipaludiques et c'est le cas du premier vaccin contre le paludisme, RTS,S/AS01 de GSK (GlaxoSmithKline).

### **La lutte anti-vectorielle**

La lutte contre les vecteurs du paludisme consiste à tuer les moustiques afin de réduire considérablement la transmission. Les insecticides ou les produits chimiques de la famille des organochlorés, pyréthrinoïdes, carbamates et organophosphorés sont les plus utilisés pour imprégner les moustiquaires, les gîtes larvaires des moustiques et aussi pour la pulvérisation intra-domiciliaire (PID). Des études menées par l'OMS confirment que les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD) peuvent réduire la mortalité infantile jusqu'à un tiers dans les régions impaludées d'Afrique [30]. Les nouvelles MIILD (traitées directement en usine pour une efficacité de plus de 5 ans) dégagent continuellement de l'insecticide, éloignant et tuant les moustiques. A ces méthodes, il est nécessaire d'ajouter la lutte contre l'insalubrité et l'assainissement des points d'eaux stagnantes. Ces méthodes sont simples, sûres et rentables mais semblent entraîner l'apparition de résistance des vecteurs aux insecticides, notamment à la Permethrine [61]. Les premiers cas de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes et aux carbamates ont été observés au Bénin [62, 63]. Aujourd'hui, la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes s'est généralisée en Afrique subsaharienne au point d'inquiéter les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Ce phénomène peut influencer l'efficacité des outils imprégnés de pyréthrinoïdes. Cette hypothèse a déjà été testée au laboratoire et dans les conditions semi-naturelles où il a été démontré que la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes a un impact sur l'efficacité des moustiquaires et PID [64, 65].

Le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du ministère de la santé du Bénin a focalisé la lutte anti-vectorielle sur la distribution massive des MIILD et la mise en œuvre des campagnes de pulvérisation intra-domiciliaire (PID) à base d'insecticides à effet rémanent [31].



Il existe d'autres méthodes de lutte comme les piégeages des moustiques, l'utilisation des serpentins, la lutte biologique avec des produits non insecticides et l'utilisation des techniques dites des mâles stériles.

Actuellement, des techniques de génie génétique permettent des modifications de gènes chez des populations de moustiques. Par exemple, des mâles modifiés qui sont capables de transmettre à leur progéniture un gène qui bloque leur développement et tue les larves avant leur maturité. D'autres approches seraient de modifier le génome du moustique en y insérant un gène de stérilité [66] ou de résistance [67] au *Plasmodium*.

### **La chimioprophylaxie et les traitements curatifs**

Les médicaments antipaludiques sont utilisés pour la prévention des infections surtout chez les voyageurs, la femme pendant la grossesse et aussi pour le traitement des infections.

L'émergence des résistances à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine, très largement utilisées en zone d'endémie, a entraîné une augmentation considérable de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme.

L'utilisation, depuis une dizaine d'année en Afrique et depuis plus longtemps en Asie, des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine (CTA) pour traiter les infections à *P. falciparum* a permis, en association avec les moustiquaires imprégnées, de réduire la morbidité du paludisme. Cependant, des résistances aux CTA sont décrites en Asie du Sud-Est [68] et la communauté scientifique redoute le scénario d'une migration intercontinentale de parasites résistants de l'Asie vers l'Afrique. Les nouveaux défis de la lutte contre le paludisme sont l'apparition de la résistance du parasite *P. falciparum* à l'artémisinine détectée dans cinq pays de la sous-région du Grand Mékong. Malgré les changements observés en termes de sensibilité des parasites, les patients continuent de répondre aux combinaisons thérapeutiques, dans la mesure où le médicament associé conserve son efficacité.

Selon les recommandations de l'OMS depuis 2012, les stratégies de prévention du paludisme au cours de la grossesse reposent sur l'administration de trois doses d'un traitement préventif intermittent au cours de la grossesse (TPIg) à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) [69]. Actuellement, les nouvelles recommandations pour le traitement du paludisme en général se focalisent sur le diagnostic et la prise en charge rapide des cas.

### **Les vaccins antipaludiques**

Le *Plasmodium* est un organisme unicellulaire complexe, capable d'esquiver et d'échapper aux réponses immunitaires. Cependant avec plus de 5000 protéines prédites à partir de la

séquence du génome du *Plasmodium falciparum*, il existe des milliers de protéines susceptibles d'être identifiées comme des cibles pour le développement d'un vaccin [70].

- **Les vaccins anti-stade exo-érythrocytaire ou pré-érythrocytaire**

Ces vaccins visent à induire une réponse immunitaire capable d'empêcher la pénétration et le développement des sporozoïtes dans les cellules hépatiques et ainsi prévenir les infections subséquentes. Des essais cliniques pour ce type de vaccin ont été réalisés chez l'homme avec les protéines sporozoïtaires tel que la CSP (Circum Sporozoite Protein). C'est le cas du premier vaccin antipaludique par RTS,S/AS01 (Mosquirix) des laboratoires GlaxoSmithKline (GSK) qui a reçu un avis scientifique favorable de l'Agence européenne des médicaments en juin 2015 au titre de l'article 58,12 [71]. Le groupe stratégique consultatif d'experts (SAGE) sur la vaccination et le comité de pilotage de la politique de lutte antipaludique (MPAC) de l'OMS ont donc recommandé la mise en œuvre de projets pilotes autour de ce premier vaccin antipaludique afin de valider les conditions d'utilisation de ce vaccin sur le terrain, son coût et le bénéfice par rapport aux moyens de lutte actuels et de décider de recommander ou non la vaccination au Mosquirix dans les zone d'endémies [1].

Néanmoins ce vaccin a montré une protection de 34,8 % contre la forme sévère du paludisme chez les jeunes enfants tous âges confondus après la Phase III de l'essai clinique [72, 73].

- **Les vaccins contre les stades érythrocytaires**

Les vaccins anti-stade érythrocytaire, contre l'invasion des hématies et la complication de la maladie, contrôlèrent les signes cliniques de l'infection palustre. Ils auraient la capacité d'empêcher la pénétration et le développement des mérozoïtes dans les hématies. Les candidats pour ce type de vaccin en cours d'essai, ciblent les protéines de surface des mérozoïtes comme MSP1, MSP2, MSP3, GLURP; sur l'organelle apicale telle qu'AMA-1 (apical membrane antigen 1) [74] et certaines parties conservées de la protéine PfEMP1.

- **Les vaccins bloquant la transmission**

C'est une catégorie de vaccin qui ciblent les antigènes localisés à la surface des gamétocytes (PfSPZ, *Plasmodium falciparum* sporozoïte) avec pour objectif d'induire la production d'anticorps empêchant la maturation vers les stades sexués du parasite chez l'homme et la fécondation chez le moustique.

- **Le vaccin spécifique du PAG**

Ce vaccin basé sur l'antigène de surface, VAR2CSA, est une protéine de la famille des PfEMP1, qui vise à prévenir les conséquences du paludisme chez la femme enceinte, le fœtus

et le nouveau-né. L'objectif de ce vaccin est d'induire les anticorps pouvant inhiber la séquestration des hématies parasitées dans le placenta. Ce vaccin fait l'objet de cette thèse et sera développé plus en détail dans le chapitre suivant.

- **Des nouveaux candidats**

De nouveaux antigènes exprimés à la surface des mérozoïtes ou dans les organelles ont été identifiés récemment comme candidats vaccins [75]. Certains de ces antigènes seraient plus prometteurs en terme de réponses immunes spécifiques et protectrices par rapport aux candidats vaccins actuels. L'identification de ces nouvelles protéines a ouvert de nouveaux axes d'investigation et de recherche pour le développement d'un vaccin efficace mais aussi comme marqueurs de protection.

## **Chapitre 2: Immunité, Paludisme associé à la grossesse et ses conséquences**

### **2.1. Immunité et cellules médiatrices de l'immunité**

L'immunité est la capacité de l'organisme à se défendre contre un agent infectieux (bactéries, virus, ou parasites), ou une maladie donnée. Le système immunitaire est l'ensemble des organes et des cellules intervenant dans les réactions immunitaires en préservant l'organisme des agressions par des agents infectieux.

Bien que l'immunité spécifique contre le paludisme se réfère essentiellement aux fonctionnalités des anticorps produits par les cellules B, l'infection à *Plasmodium*, comme la plupart des infections, fait intervenir les différentes cellules du système immunitaire inné et adaptatif.

Le système immunitaire inné inhibe le développement des agents infectieux qui arrivent à traverser les premières barrières de défense de l'organisme (peau, muqueuses, barrière épithéliale) . Ainsi les cellules de l'immunité innée interviennent d'une part pour éliminer l'agent infectieux et d'autre part pour activer le système immunitaire adaptatif via les cellules présentatrices d'antigènes. Les protéines du complément ainsi que les défensines sont aussi les composants du système immunitaire inné.

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de protection contre l'infection palustre. Ce système utilise les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules tueuses naturelles (NK) [76, 77] qui produisent des cytokines et chimiokines pour limiter la phase initiale de la réplication du parasite et permettent le développement des réponses adaptatives spécifiques [78].

Ainsi le système immunitaire inné intervient dans la défense immunitaire pour orienter, réguler, activer ou inhiber les réponses adaptatives.

Le système immunitaire adaptatif intervient quand l'immunité innée est dépassée avec une réponse plus spécifique à l'infection via l'intervention des cellules T et B et la mise en place d'une mémoire immunologique. L'ampleur et l'efficacité des réponses sont déterminées par des interactions complexes entre les populations de cellules effectrices et régulatrices.

Ainsi quelques uns de ces types cellulaires intervenant dans les différents mécanismes immunitaires antipalustres et qui ont été étudiés pendant cette thèse sont décrits dans les paragraphes suivants.

## **2.1.1. Les cellules de l'immunité innée**

### **2.1.1.1. Les cellules dendritiques : professionnelles de la présentation d'antigènes**

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et interviennent à différents niveaux au cours des réponses immunes incluant :

- l'établissement de mécanismes de tolérance centrale dans le thymus,
  - l'entretien de mécanismes de tolérance périphérique,
  - l'initiation et la régulation de réponse immune innée et adaptative.
- Les cellules dendritiques folliculaires des ganglions lymphatiques et de la rate possèdent des récepteurs pour le fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines G (IgG) ou pour le fragment C3 du complément. Grâce à ces récepteurs, elles peuvent fixer les complexes antigène-anticorps et présenter les antigènes aux lymphocytes B, renforçant ainsi la production d'anticorps et la pérennisant car ces antigènes peuvent persister plusieurs mois à la surface des cellules dendritiques folliculaires.
  - Les cellules dendritiques présentes dans les zones T des tissus lymphoïdes: les cellules de Langerhans de la peau captent l'antigène et le transportent par voie lymphatique vers les zones T des tissus lymphoïdes où elles se différencient en cellules dendritiques.

Il y a deux grandes familles de DC chez l'homme: les DC myéloïdes (mDC) d'origine myéloïde et les DC plasmacytoïdes (pDC) pour lesquelles une origine lymphoïde est souvent évoquée [79]. Les DC sont uniques dans l'organisme pour induire une réponse immune primaire: ce sont des CPA professionnelles, c'est-à-dire qu'elles sont capables de présenter des antigènes à des lymphocytes T naïfs permettant ensuite l'établissement d'une mémoire immunologique.

### **2.1.1.2. Les monocytes et les macrophages**

Les monocytes et les macrophages constituent un groupe important de cellules hétérogènes du système immunitaire inné. Le mécanisme d'action de ces deux types cellulaires est la phagocytose. Les monocytes représentent la forme circulante des phagocytes et les macrophages la forme tissulaire. Ce sont des CPA car elles sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes, sous forme de complexes associant le CMH de classe II et un épitope T. Comme les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages expriment les récepteurs de reconnaissance des pathogènes spécifiques comme les TLR (Toll-like receptor). Les monocytes se transforment en macrophages ou en cellules dendritiques en présence des facteurs solubles comme M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et IL-4 *in vitro* ou *in vivo*. Ainsi ils sont considérés dans la circulation comme les précurseurs des macrophages

et des cellules dendritiques [80, 81]. Constituant environ 10% des leucocytes de l'organisme, les monocytes sont générés au niveau de la moelle osseuse par les myéloblastes. Ils sont libérés dans la circulation sanguine et participent à l'homéostasie tissulaire de l'organisme [82].

Selon l'expression des marqueurs CD14 (récepteur du LPS) et CD16 (récepteur du Fc $\gamma$  III); les monocytes sont classés en trois groupes [83] en fonction de leurs phénotypes à savoir: les classiques (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), les intermédiaires (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) et les non classiques (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) [84]. Bien qu'ils expriment les récepteurs de chimiokines pour l'adhésion et la migration vers les organes lymphoïdes (MALT, GALT, thymus), les monocytes peuvent induire la production de plusieurs cytokines et chimiokines nécessaires à l'élimination des pathogènes après activation.

Les macrophages participent activement au processus de l'élimination des pathogènes via le mécanisme de phagocytose induite à travers les récepteurs du complément (CR) et d'opsonine (FcR). Les macrophages se caractérisent par l'identification des marqueurs de phagocytes comme le CD14, CMH2, et CD68 [85].

### **2.1.1.3. Les cellules NK et lymphocytes NKT**

Les cellules NK (Natural Killer) et lymphocytes NKT appartiennent aux cellules de l'immunité innée en raison de leurs récepteurs invariants et sont communément appelées "cellules tueuses naturelles". Les cellules NK et NKT sont maintenant intégrées dans une nouvelle famille, les cellules lymphoïdes innées (ILC, innate lymphoid cells). Ces cellules lymphoïdes sont issues d'un progéniteur lymphoïde commun avec les lymphocytes B et T. Elles n'expriment pas de récepteurs spécifiques aux antigènes et sont activées via leurs récepteurs aux cytokines. On distingue 3 groupes d'ILC : les ILC-1, qui sont les NK; les ILC-2, qui sécrètent de l'IL-13, de l'IL-5 et de l'IL-4, comme les cellules TH2 et qui sont impliquées dans les réponses innées aux parasites intestinaux et les ILC-3, qui sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22, comme les cellules Th17 et qui sont impliquées i) dans la formation des ganglions périphériques et des tissus lymphoïdes associés à l'intestin pendant la vie fœtale et ii) dans la protection de la muqueuse contre les entérobactéries pathogènes, et le maintien de la flore commensale [86, 87].

Les cellules NK et NKT interviennent dans les mécanismes de réactions non spécifiques de l'organisme via leur capacité à lyser les cellules infectées en absence d'une immunisation préalable. Les NKT sont de grands lymphocytes granuleux comparés aux lymphocytes T et B de petites tailles, représentant environ 5 à 16% des lymphocytes humains. Les deux types cellulaires se différencient grâce à leurs récepteurs membranaires: NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) et

NKT ( $CD3^+CD56^+CD16^+$ ) [88]. Faisant partie des cellules de premières lignes de défense de l'organisme, les cellules NK ont non seulement la capacité de tuer sélectivement les cellules infectées par des microbes ou les cellules tumorales mais aussi secrètent des cytokines pour stimuler et orienter les réponses adaptatives des lymphocytes T et B.

Les lymphocytes NKT, constituant environ 0,2 % des lymphocytes T du sang périphérique, reconnaissent et se lient aux glycoprotéines comme l'agalactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer), présentées par une molécule non-polymorphique CD1d, une molécule analogue aux protéines du CMH1 [89-91].

Les cellules NK représentent l'une des premières sources des cellules productrices de l'INF- $\gamma$  pour l'initiation des réponses inflammatoires nécessaires à l'élimination des parasites lors d'une infection palustre [92, 93].

Des travaux récents évoquent la découverte des cellules NK mémoires spécifiques chez les primates, notamment les singes [94, 95], mais cette découverte reste encore spéculative pour l'homme.

Les cellules NK sont également présentes dans la muqueuse utérine avec une forte accumulation au début de la grossesse dans l'espace utérin, représentant environ 70% des cellules lymphoïdes de la decidua basalis. La proportion des cellules NK utérines (uNK) diminue à partir de la vingtième semaine de gestation pour disparaître avant le terme de la grossesse. Elles sont essentielles à l'invasion de l'endomètre maternel par les cellules trophoblastiques fœtales aboutissant à la vascularisation de la decidua [96, 97]. Les uNK diffèrent phénotypiquement et fonctionnellement des cellules NK du sang périphérique par une forte expression de  $CD16^-/CD56^{bright}$  correspondant à un phénotype non cytotoxique. Ainsi le potentiel cytotoxique des uNK est très limité [98, 99] et il a été montré que les cellules trophoblastiques sont résistantes à la lyse sous l'effet des cellules NK utérines et périphériques [100, 101]. Les interactions entre les récepteurs des uNK et les molécules HLA-C exprimées par les cellules trophoblastiques sont généralement sans effet néfastes pour la majorité des grossesses et aussi bénéfiques pour le remodelage vasculaire utérin [102, 103].

### **2.1.2. Les cellules de l'immunité adaptative**

Les lymphocytes T et B représentent les deux types cellulaires de l'immunité adaptative. Ils sont les seules cellules de l'immunité capables d'induire la mémoire immunologique. Ils se caractérisent par leurs récepteurs dans la reconnaissance des fragments antigéniques: les BCR (B Cell Receptor) sur les lymphocytes B pouvant reconnaître directement les fragments antigéniques et les TCR (T Cell Receptor) sur les lymphocytes T pouvant reconnaître que les fragments antigéniques liés aux molécules du CMH.

### **2.1.2.1. Les lymphocytes T**

Le développement et la différenciation des lymphocytes T (LT) se réalisent dans le thymus. En fonction des chaînes constituant les TCR, on distingue les lymphocytes T $\alpha\beta$  conventionnels et les lymphocytes T $\gamma\delta$ . Les TCR $\gamma\delta$  ne sont pas restreints au CMH et reconnaissent plutôt les épitopes conservés au sein des pathogènes. Ainsi les lymphocytes T $\gamma\delta$  sont considérés comme des cellules appartenant à l'immunité innée.

Le TCR des lymphocytes T CD4 reconnaît essentiellement les peptides antigéniques présentés par les cellules présentatrices d'antigènes via le CMH de classe II alors que celui des lymphocytes T CD8 reconnaît les peptides liés aux CMH de classe I, présents sur toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les lymphocytes T CD8 évoluent en cellules cytotoxiques participant à la destruction des cellules infectées ou tumorales. Les lymphocytes T CD4 représentent les lymphocytes T helper qui ont une fonction régulatrice de la réponse adaptative par l'activation d'autres cellules immunitaires. Les lymphocytes T se caractérisent par des clusters de différenciation et des protéines membranaires comme les intégrines, les récepteurs de cytokines. Ainsi on distingue plusieurs types de lymphocytes T en fonction de leurs stades de maturation et activité dans la réponse immunitaire. Il y a entre autres les lymphocytes T naïfs, les LT cytotoxiques, les LT régulateurs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>), les LT effecteurs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) [104] et les LT mémoires qui se différencient par l'expression des marqueurs de surface ou des récepteurs de chémokines comme CD45RA ou CD45RO et CD27, CCR7, CD62L [105-108]. Ainsi deux sous populations de lymphocytes T mémoires, centrales et effecteurs, pourraient être définies par l'expression du marqueur CD27 [109, 110]. Les Treg sont non seulement des médiateurs clés du maintien de l'homéostasie de l'organisme mais participent activement au contrôle de la tolérance des antigènes du soi [111]. Ils sécrètent principalement d'IL-10 et du TGF- $\beta$  comme médiateurs solubles pour leurs mécanismes de régulations immunologiques [112, 113]. Plusieurs études ont montré une augmentation de la fréquence des Treg suite à une infection palustre [114-116]. L'augmentation des Treg au cours d'une infection palustre à *P. falciparum* est positivement corrélée avec la charge parasitaire [115, 117]. Les LT effecteurs contribuent aussi à cette immuno-régulation au cours d'une infection palustre [118].

### **2.1.2.2. Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B (LB) sont responsables de l'immunité humorale basée sur la production d'immunoglobuline ou anticorps. Ces derniers, constituant le récepteur membranaire des cellules B, confèrent une spécificité antigénique unique à chaque LB. On distingue les LB



dépendant des LT et les LB indépendant des LT selon le type d'antigène activateur aboutissant à la différenciation des LB activés en plasmocytes [119].

Les réponses des LB indépendant des LT souvent appelé "cellules B1" sont assurées par les cellules B de la zone marginale splénique et concernent souvent les antigènes non protéiques. Ce type de réponse ne nécessite pas la présentation de l'antigène par les cellules B via le CMH II. Cette réponse est plus rapide avec la production des anticorps non mutés avec une faible affinité.

Les réponses des LB dépendant des LT nécessitent une collaboration entre les lymphocytes T helper et B spécifiques du même antigène. Ce type de réponse implique la formation de centres germinatifs au sein desquels les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique se réalisent pour une réponse plus spécifique à l'antigène [120]. Ces LB présentent l'antigène sous forme de peptide liée au CMH II aux lymphocytes T helper avec l'engagement du CD40 pour une différenciation spécifique de la réponse humorale. Après la différenciation, ces lymphocytes B aboutissent à la formation des plasmocytes de longue durée de vie et aussi des cellules B mémoires productrices des anticorps de forte affinité à l'antigène.

En plus de ses récepteurs de surface, le LB est aussi caractérisé par un dimère  $Ig\alpha-Ig\beta$  qui est associé au BCR (B cell receptor) (IgM), des récepteurs de cytokines, des protéines membranaires telles que des intégrines, des sélectines, des immunoglobulines-like, les récepteurs membranaires B7 et des clusters de différenciation CD19, CD21, CD35, CD45, CD80, CD81 et CD86.

Ainsi en fonction de la présence des marqueurs phénotypiques et fonctionnels à la surface des cellules B, on distingue: les LB naïves ( $CD19^+CD27^-CD21^+CD10^-$ ), les LB immatures ( $CD19^+CD27^+$ ), les plasmocytes ( $CD19^+CD27^+CD21^-CD10^-$ ); les LB mémoires classiques ( $CD19^+CD27^+CD21^+CD10^-$ ), les LB mémoires atypiques ( $CD19^+CD27^-CD21^-CD10^-$ ), les LB mémoires activées ( $CD19^+CD27^+CD21^-CD20^+CD10^-$ ) et les LB régulatrices productrices d'IL-10 et TGF- $\beta$  ( $CD19^+CD25^+$ ) [39]

### **2.1.2. Les récepteurs TLR (Toll-like receptor)**

Certains récepteurs de l'immunité appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes, PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) [121] et des signaux de danger, DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) [122]. Cette discrimination de reconnaissance des PAMP, non exprimés par les organismes supérieurs, permet aux PRR de reconnaître sélectivement les différents motifs microbiens.

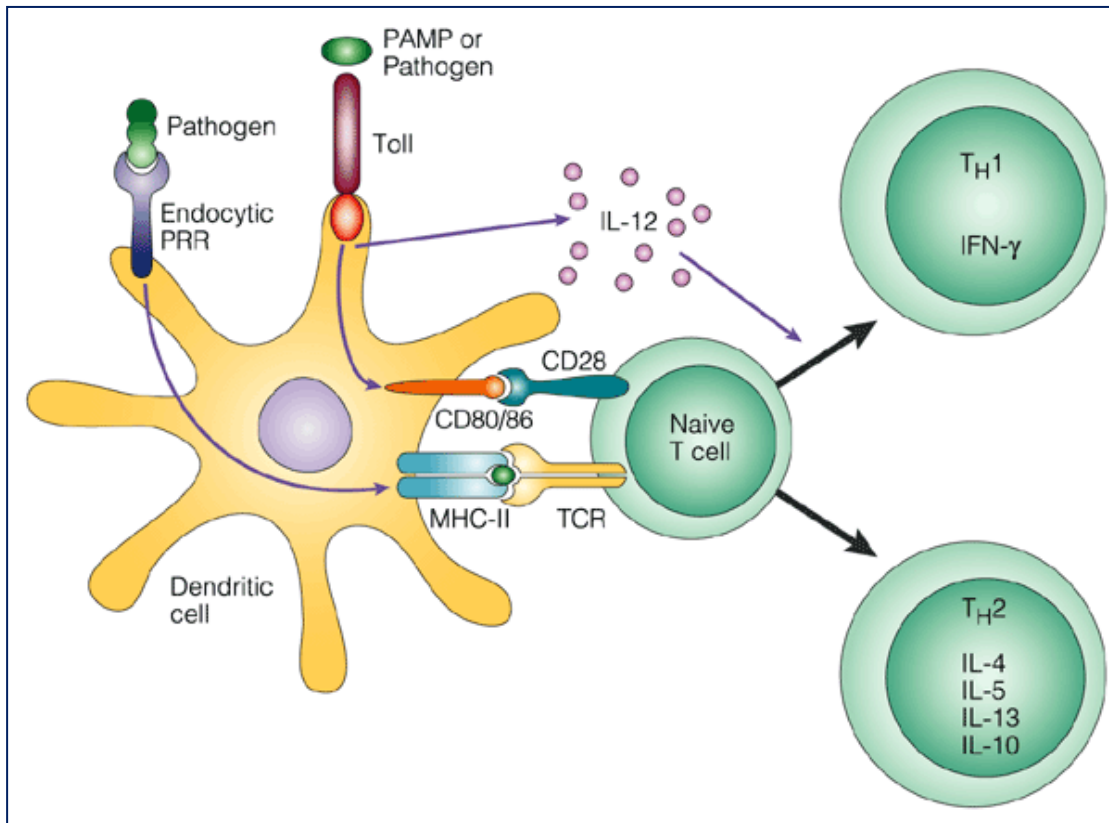
Ces récepteurs sont impliqués soit dans l'internalisation des micro-organismes pour leur destruction, soit dans l'activation des cellules immunitaires.

Des familles de PRR ont été décrites: les récepteurs Toll (TLR: Toll Like-Receptors), les récepteurs de type lectine (CLR: C-type lectin receptors) et les récepteurs intracytoplasmiques de type NLR (nucleotide oligomerization domain (NOD)-like domain) et de type RLR (Rig-I-like receptor). Les TLR et les CLR surveillent le milieu extracellulaire et les compartiments endosomaux alors que les NLR et les RLR sont impliqués dans la reconnaissance de motifs microbiens ou de signaux de «danger» endogènes, non microbiens, les DAMP dans le cytoplasme. Ces deux derniers sont impliqués dans l'activation des inflammasomes qui sont des complexes tripartites composés d'un récepteur PRR (NLR ou RLR), d'une protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like containing a CARD domain) et d'une protéine effectrice de la famille des caspases [123]. La formation du complexe inflammasome induit le clivage protéolytique de procytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, permettant leur maturation et leur sécrétion, ainsi que le déclenchement d'une mort cellulaire hyper-inflammatoire, la pyroptose [124].

Parmi les PRR, les récepteurs TLR sont les plus étudiés et nous nous sommes intéressés à l'étude de ce type de récepteurs dans le cadre de cette thèse.

Les Récepteurs Toll-like receptor (TLR) jouent un rôle primordial car leur recrutement est nécessaire pour induire des réponses immunes protectrices [125]. Ils sont exprimés par de nombreux types cellulaires et sont donc impliqués dans de nombreux processus d'activation. Les récepteurs TLR se comportent donc comme des interfaces moléculaires entre l'immunité innée (la phase de reconnaissance des agents pathogènes) et l'immunité adaptative (la phase d'une réponse immune spécifique) (**Figure 3**) [126-128].

Une activation excessive des récepteurs TLR est suspectée dans des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé. Chez les patients lupiques, la présence de complexes histone-ADN circulants provenant de cellules mortes par apoptose aboutit à l'activation des DC *via* TLR9 [129].



**Figure 3: activation du TLR (interface moléculaire entre immunité innée et acquise) [126]**

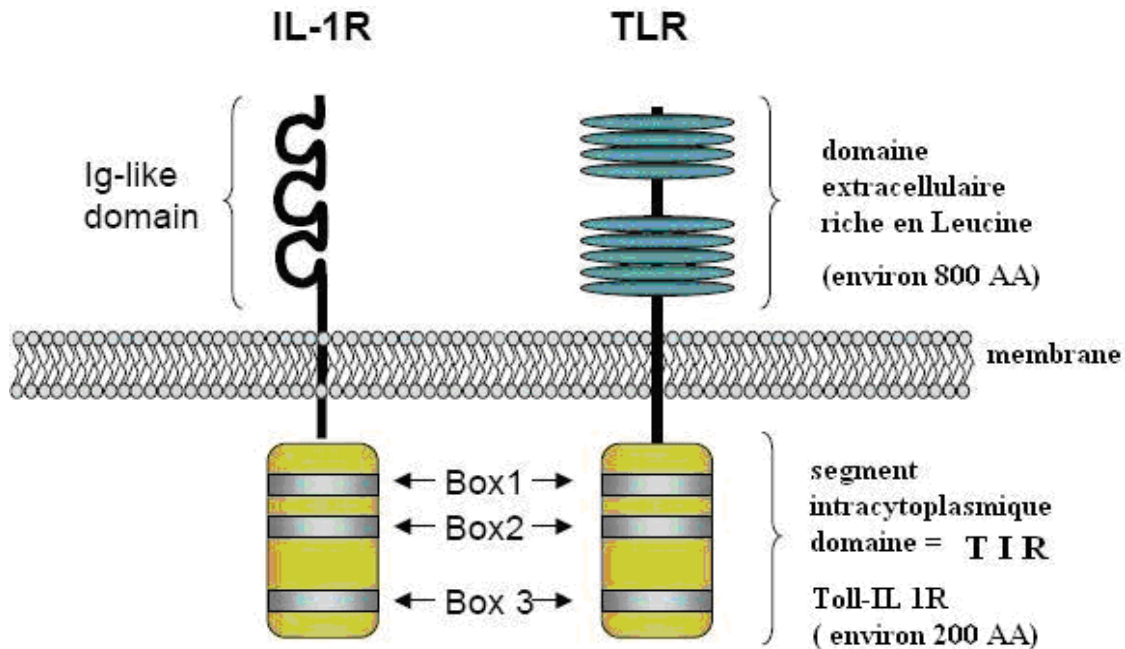
- **Immuno-intervention**

Du fait de leur rôle dans l'initiation d'une réponse immune effectrice, les molécules TLR constituent des cibles de choix en termes d'immunomodulation. Des stratégies d'inhibition des molécules TLR, à l'aide d'anticorps neutralisants ou de molécules antagonistes, sont actuellement évaluées lors d'une activation excessive des cellules immunes par des agents pathogènes, comme lors des septicémies. Au contraire, des agonistes des molécules TLR sont recherchés en tant qu'adjuvants dans les vaccins [130] et les cibles TLR sont utilisés pour le développement de produits thérapeutiques [131, 132].

- **Structure des récepteurs TLR**

La mise en évidence du rôle critique du récepteur Toll chez la drosophile a permis l'identification d'une famille de 13 récepteurs apparentés à Toll, les Toll-like receptors dont 10 ont été identifiés chez l'homme (TLR1 - 10) et 12 chez la souris (TLR1 - TLR9 et TLR11 - TLR13) [133]. Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine intracytoplasmique de 150 à 200 acides aminés, qu'ils partagent avec les membres de la famille du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R). Ce domaine est également présent dans les produits de plusieurs gènes de résistance à l'infection chez les plantes (gènes R) et a été baptisé domaine TIR

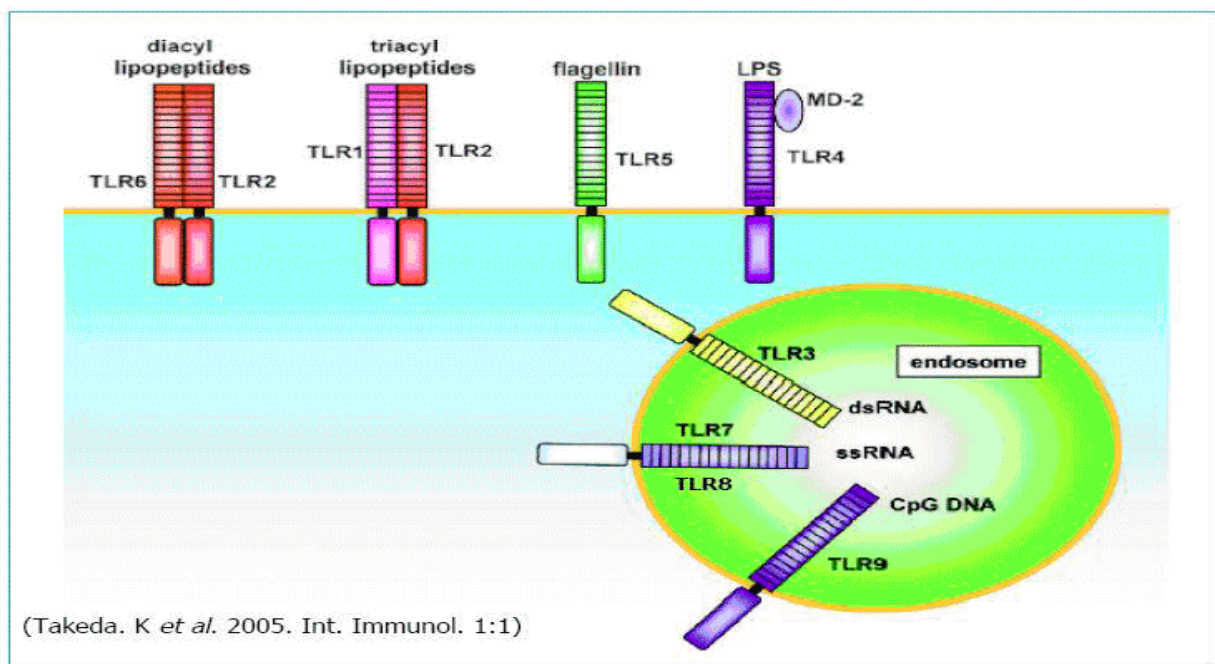
(Toll/IL-1R/R). La partie extracellulaire des récepteurs Toll est constituée de répétitions riches en leucines (motifs LRR) alors que celui des membres de la famille de l'IL-1R est constitué de trois domaines immunoglobulines [134, 135] (**Figure 4**). L'activation des TLR nécessite des ligands lipopeptidiques.



**Figure 4: Structure des récepteurs TLR [135]**

● **Localisation et activation des TLR**

Certains sont exprimés en surface sur la membrane cellulaire et d'autres en position intracellulaire sur la membrane de l'endosome (**Figure 5**) [136, 137].



**Figure 5: Expression en surface et intracellulaire des TLR [137]**

Chaque type de TLR peut se lier sélectivement à un type de molécule (agoniste) microbienne (Tableau 2). Ces agonistes microbiens peuvent être endogènes ou exogènes. La localisation cellulaire des molécules TLR est associée à la nature des ligands qu'elles reconnaissent:

- Les récepteurs TLR 1, 2, 4, 5 et 6, exprimés à la surface de la membrane cytoplasmique des cellules, reconnaissent des composés microbiens protéiques ou lipidiques qui sont donc exogènes.

- Les molécules TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques [138] et sont localisés dans les endosomes/lysosomes des cellules hôtes. Leurs agonistes microbiens sont donc endogènes. Les acides nucléiques de l'hôte ne sont jamais présents dans l'endosome et ne peuvent donc pas activer les PRR (Pattern Recognition Receptors) de sa propre cellule.

Les cellules dendritiques possèdent un très large répertoire de TLR en relation avec leur fonction de cellules sentinelles.

**Tableau 1: Distribution cellulaire et agonistes des récepteurs TLR**

Récepteurs TLR	Type cellulaire	Ligands lipidiques ou protéiques	Exemples Agonistes chimiques
TLR1	Monocytes Macrophages mDC, pDC	triacyl lipopeptides (bactérie)	Pam3CSK4
TLR2	mDC, Monocytes Macrophages	Peptidoglycane (champignons, Bactéries Gram +)	Hémozoïne FSL1
TLR3	mDC, lymphocyte T	ARN double brin (virus)	Poly I:C
TLR4	Macrophages, Monocytes	Lipopolysaccharide (LPS), protéine virale (bactérie Gram -, protéine virale)	LPS
TLR5	mDC, Monocytes	flagelline (bactérie flagellée)	Flagellin-ST
TLR6	pDC, Monocytes	diacyl lipopeptide (mycobactérie, champignons)	FSL1
TLR7	pDC	ARN simple brin (virus)	R837
TLR8	mDC, Monocytes		ssRNA40
TLR9	pDC, Monocytes, Cellule B	ADN hypométhylé motif CpG): (virus, protozoaire)	R848, CL075
TLR10	mDC, pDC		CpG-ODN
TLR11	Macrophages	protéine de bactérie uropathogènes protéine profiline ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	

### 2.1.3. Immunité pendant la grossesse

La grossesse a longtemps constitué une énigme immunologique pour comprendre comment l'embryon exprimant des protéines pour 50% d'origine paternelle n'était pas rejeté par le système immunitaire de la mère.

Depuis les hypothèses de Medawar en 1953 sur l'acceptation de l'allogreffe foeto-placentaire [139, 140], les concepts sur l'immunologie de la grossesse ont évolué.

Medawar proposait 4 hypothèses :

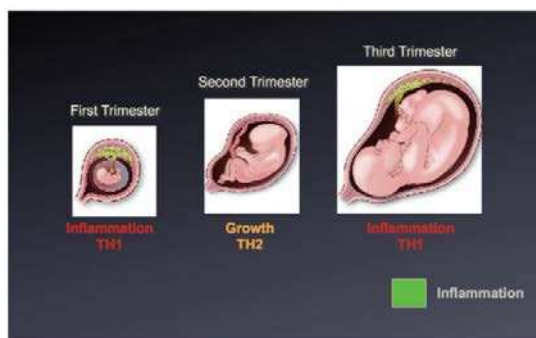
- Le placenta constituerait une barrière physique qui isolerait le fœtus du système immunitaire de la mère.
- Le fœtus se développerait dans un lieu immunologiquement privilégié. Les antigènes du fœtus et de ses annexes seraient immatures et formeraient une entité immunologiquement neutre non reconnue par le système immunitaire de la mère.
- Le système immunitaire de la mère serait immunodéprimé et ne réagirait pas à l'expression par le fœtus des molécules allogéniques.

- Des mécanismes actifs de régulation et de reconnaissance entre le fœtus et le système immunitaire de la mère se mettent en place pour aboutir à une tolérance materno-fœtale.

L'immunologie de la grossesse a longtemps été définie par le dogme « TH2 prédominant » qui se traduit par l'immunosuppression des réponses pro-inflammatoires et par l'augmentation des réponses anti-inflammatoires nécessaires au maintien de l'intégrité de l'allogreffe fœto-placentaire [141].

Actuellement l'immunologie de la grossesse n'est plus considérée comme un phénomène d'immunosuppression ni comme un seul événement immunologique via le déséquilibre de la balance TH1/TH2 mais comme un processus d'immunomodulation qui évolue en trois périodes pendant la grossesse [142, 143]. Les 3 phases immunologiques distinctes de la grossesse sont (**Figure 6**):

- 1<sup>ère</sup> phase inflammatoire: l'implantation de l'embryon dans l'utérus et la placentation ;
- 2<sup>ème</sup> phase anti-inflammatoire: la croissance et le développement du fœtus, pendant les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres de la grossesse;
- 3<sup>ème</sup> phase inflammatoire: le déclenchement de l'accouchement.



**Figure 6: immunologie de la grossesse [142]**

Ainsi, cette immunomodulation nécessaire au maintien de l'intégrité fœto-placentaire et au bon déroulement de la grossesse compromettrait la capacité de la femme enceinte à combattre certaines infections, d'où une augmentation de la susceptibilité de la femme enceinte à un certain nombre de maladies infectieuses (paludisme, syphilis, tuberculose) et plus récemment à des infections virales comme Ebola et la fièvre de Lassa qui peuvent avoir des conséquences pour la mère, le fœtus et le nouveau-né [144-147].

Ensuite, le paradigme « TH1/TH2/TH17, lymphocytes Treg et cellules dendritiques » a été proposé pour expliquer l'immunomodulation particulière d'origine placentaire [148, 149].

Actuellement, le placenta est considéré comme un organe immunologique qui interagit continuellement avec le système immunitaire de la mère pour accepter l'allogreffe foetal mais aussi pour lutter contre les agents infectieux, protégeant ainsi la mère et le fœtus.

Les cellules trophoblastiques fœtales et les cellules immunes maternelles interagissent localement (decidua et trophoblaste) et systématiquement via des facteurs solubles issus du placenta pour inhiber l'activité des cellules T cytotoxiques.

Le système immunitaire de la femme enceinte s'adapte non seulement à l'acceptation de l'antigène paternel mais aussi à lutter contre les agents infectieux protégeant ainsi la mère et le fœtus via une interaction entre le placenta et les cellules immunitaires [150-152].

L'immunomodulation va réguler et contrôler les réponses anti- et pro-inflammatoires pendant toute la durée de la grossesse par le biais des hormones, des cytokines et des chémokines. La différenciation et la maturation des cellules dendritiques (DC) et des lymphocytes T régulatrices pendant la grossesse vont orienter les réponses cellulaires vers des réponses de type anti-inflammatoire plutôt que de type pro-inflammatoire [153].

#### **2.1.4. Immunité du fœtus et du nouveau-né**

##### **2.1.4.1. Le développement du système immunitaire *in utero***

Les mécanismes de défense immunitaire se mettent en place progressivement au cours de la vie intra-utérine mais la maturation des cellules immunitaires néonatales ne se fait qu'après la naissance. Ce développement se réalise à travers plusieurs processus:

- la mise en place de réponses immunitaires innées et adaptatives
- le système de régulation des réponses immunitaires néonatales
- des échanges cellulaires entre la mère et le fœtus
- le transfert d'immunoglobulines maternelles au fœtus

La mise en place du système immunitaire néonatal peut être perturbée par des infections maternelles, des pathologies associées à la grossesse, telles que l'éclampsie, le retard de croissance *in utero* ou par un dérèglement dans les échanges materno-fœtaux [154, 155].

Au début de la vie fœtale, les cellules souches pluripotentes à l'origine des différentes lignées hématopoïétiques sont générées par plusieurs vagues concomitantes dans deux compartiments principaux : le sac vitellin et la région AGM (Aorte-Gonades-Mésonephros) du fœtus (**Figure 7**). L'hématopoïèse primitive commence dans le mésoderme du sac vitellin à partir du 21<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire pour former des îlots sanguins où se différencient des progéniteurs érythro-myéloïdes dont des macrophages primitifs. Ces



macrophages vont coloniser différents tissus pour donner la microglie et les cellules de Langerhans ainsi que d'autres macrophages « résidents ». Seules les cellules de la microglie dériveraient uniquement du sac vitellin et conserveraient la capacité de se régénérer [156]. En parallèle, l'hématopoïèse définitive débute dans l'aorte dorsale de la région AGM 28<sup>ème</sup> jour. Les cellules souches (produites une seule fois dans la vie) iront coloniser le foie puis la rate, principaux organes hématopoïétiques (1,5–7,5 mois), relayés à partir du troisième trimestre par la moelle osseuse [157].

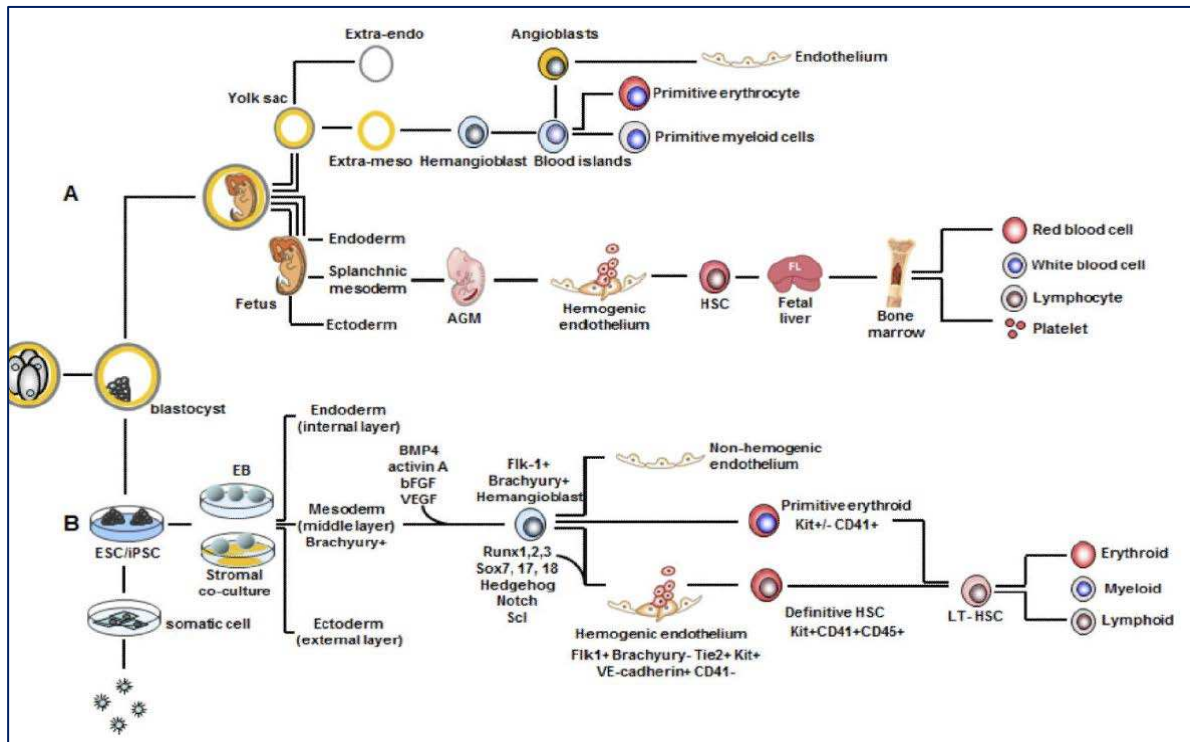
A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation, des précurseurs des cellules présentatrices d'antigènes se développent dans le sac vitellin. L'expression des molécules CMH-II ainsi que la capacité de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T restent faible par rapport à celles de l'adulte.

Les cellules NK et les précurseurs de neutrophiles sont générés au niveau du foie fœtal à 6 semaines de gestation alors que le système du complément se met en place à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine [158, 159].

Le développement des cellules du système immunitaire adaptatif se fait entre la 7<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> semaine de la gestation.

i) Les précurseurs des lymphocytes T migrent du foie fœtal vers le thymus dès la 10<sup>ème</sup> semaine et acquièrent dans ce dernier la capacité d'expression de marqueurs tels que le TCR et le CD3 [160]. La présence des lymphocytes T naïfs est observée dans le sang de cordon à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine de gestation [158]. Au cours de la vie fœtale, un processus de sélection intrathymique des lymphocytes T exprimant les TCR permet la sélection négative pour la reconnaissance d'un auto-antigène et la sélection positive pour la reconnaissance d'un alloantigène [161].

ii) Les précurseurs de lymphocytes B expriment le CD19<sup>+</sup> dans le foie fœtal. La maturation des lymphocytes B se fait dans les organes lymphoïdes primaires (foie fœtal puis moelle osseuse) contrairement à la maturation des lymphocytes T. Dès la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation, les lymphocytes B naïfs exprimant les récepteurs BCR sont détectables dans le sang du cordon [158].



**Figure 7: Développement du système immunitaire *in utero* [162]**

La réponse immune spécifique apparaît donc possible dès la fin du premier trimestre du développement du fœtus. Bien que les composants du système immunitaire soient présents à la naissance et qualitativement matures, ils sont souvent dans un état naïf ou quiescent en raison de l'absence d'infection [163]. Cette caractéristique des lymphocytes T et B est responsable d'une réponse de type primaire, retardée, lente et peu efficace. Cela explique la susceptibilité particulière du nouveau-né et surtout du prématuré aux infections bactériennes et virales. Seules les cellules de type TH2 et les Treg sont activées au cours du développement fœtal en absence d'infection utérine [163].

Des échanges cellulaires par transfert passif ou actif se font entre la mère et le fœtus à travers le syncytiotrophoblaste et les vaisseaux endothéliaux [43]. Les cellules trophoblastiques peuvent être identifiées dans la circulation sanguine de la mère alors qu'il existe des contradictions sur le passage trans-placentaire des cellules maternelles [164, 165].

Le transfert de certaines substances de faible poids moléculaire (<500 Da), telles que le fer et les acides aminés est coordonné par le transfert unidirectionnel tandis que le transfert des IgG (poids moléculaire 160 kDa) se fait à travers les récepteurs Fc endothéliaux à partir du premier trimestre de la grossesse [166]. Les sous-classes d'immunoglobulines G (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) représentent les seules immunoglobulines pouvant traverser la barrière placentaire [43, 167]. Des études sur des grossesses pathologiques ont montré que les IgA et IgM pouvaient traverser la barrière placentaire mais les mécanismes liés à ce transfert restent

à déterminer en raison de leurs poids moléculaires élevés [168]. La présence d'IgA, d'IgE et d'IgM dans le sang de cordon signe une production *de novo* par le nouveau-né. Le transfert d'IgG vers le fœtus participe à sa protection jusqu'à neuf mois environ, en attente de la mise en place du système immunitaire du nouveau-né [169]. Malgré une exposition limitée *in utero* aux antigènes et une protection temporaire induite par les anticorps maternels, le système immunitaire du nouveau-né reste naïf et quiescent [170, 171].

Les diverses stimulations antigéniques et les coopérations des lymphocytes T et B vont permettre la maturation complète du système immunitaire spécifique au cours des premières années de vie.

#### **2.1.4.2. L'immunité du nouveau-né**

A la naissance, le fœtus change soudainement d'environnement en passant du milieu *in-utéro* protégé et physiologiquement stérile au milieu extérieur où les micro-organismes bénéfiques et pathogènes coexistent. La peau et le tractus gastro-intestinal du nouveau-né sont rapidement colonisés par cette flore microbienne et sont caractérisés par une surexpression des molécules de l'immunité innée avec notamment, au niveau de la peau, une sécrétion de composés antimicrobiens et au niveau de l'intestin avec une expression de TLR2 et TLR4 fonctionnels [171, 172]. La majorité des études portant sur l'immunité du nouveau-né montrent un déficit de la réponse immunitaire adaptative avec notamment une déficience dans la présentation antigénique par les cellules dendritiques [170], une expression suboptimale des molécules de costimulation par les LT et une immaturité fonctionnelle des monocytes [173].

Comparées aux LT du sang d'adulte, les cellules T du sang du cordon présentent également des différences fonctionnelles comme une signalisation diminuée *via* CD28 [174], une diminution de l'expression de CD40 [175] et une expression différentielle des récepteurs de cytokines [176, 177]. Dans des réactions lymphocytaires mixtes, les cellules T du sang de cordon montrent une alloréactivité réduite comparée à celle de l'adulte [178]. Malgré ces différences, les cellules T du fœtus sont capables d'induire des réponses immunes contre un pathogène comparables à celles de l'adulte [179].

De nombreuses études ont pu mettre en évidence une réduction significative du niveau d'expression de l'ARNm pour la traduction des protéines (cytokines) et une diminution de la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (de type Th1) par les cellules mononucléées du sang du cordon [180]. De plus, quel que soit le stimulus, les productions d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 dans le sang du cordon sont réduites [181-184].

Ainsi la production des cytokines de types Th2 ou Th17 [185] et l'abondance des cellules T régulatrices [186] pendant la petite enfance suggèrent une tolérance caractéristique du

système immunitaire néonatal [171]. Plusieurs études ont montré que des cytokines du type Th2 (IL-13) et TH17 (IL-17 et IL-22) sont produites en grande quantité durant la vie fœtale [185, 187, 188]. De plus, l'activité suppressive des Treg issus du sang de cordon est plus puissante et plus constante que celle des Treg issus de l'adulte [189].

Plusieurs études sur la stimulation des TLR chez les nouveau-nés ont montré que la mise en place d'une immunité naturelle et protectrice se développent pendant la première année de vie [184, 190, 191]. Ces études montrent une augmentation de la production des cytokines en réponse aux TLR avec l'âge durant les premiers mois de vie.

En plus de la protection acquise par la stimulation de leur propre système immunitaire, les nouveau-nés bénéficient d'une protection maternelle passive via l'absorption des composants immunitaires comme les anticorps, présents dans le lait. Ce dernier contient notamment des molécules de l'immunité. Le système immunitaire du nouveau-né est bien contrôlé.

## **2.2. Aspects épidémiologiques du PAG**

Le paludisme associé à la grossesse représente toujours un problème de santé publique en zone d'endémie palustre en raison de ses conséquences graves sur la santé de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau-né.

En Afrique Subsaharienne, 28 millions de femmes enceintes seraient exposées au paludisme en 2014, dont 15 millions n'auraient reçu aucune dose du TPI [1]. Les conséquences et les caractéristiques cliniques du PAG vont dépendre des niveaux de stabilité de transmission du paludisme.

En zone d'endémie stable comme au Bénin, le risque d'infection palustre est élevé chez les femmes primigestes par rapport aux multigestes en raison d'une immunité protectrice acquise par ces dernières au cours des grossesses successives impaludées [192, 193]. Les infections sont le plus souvent pauci-symptomatiques et les accès graves sont rares. Les principales conséquences du PAG sont l'anémie maternelle et le faible poids de naissance [193, 194]. Ce dernier serait une conséquence du retard de croissance intra-utérin.

Le pourcentage de femmes enceintes ayant reçu au moins trois doses de traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg) a augmenté depuis les nouvelles recommandations de l'OMS en 2012 [69]. En 2014, 52 % des femmes enceintes ayant bénéficié du TPIg ont reçu au moins une dose, 40 % en ont reçu deux ou plus et 17 % au moins trois. La différence entre le pourcentage de femmes se présentant pour une consultation prénatale (CPN) dans un établissement de santé et le pourcentage recevant une ou plusieurs doses de TPIg laisse penser

que les possibilités d'administration du TPIg ne sont pas toutes exploitées. Le pourcentage de femmes enceintes bénéficiant du TPIg varie sur le continent africain [1]

### **2.3. Mécanismes de séquestration des parasites et Immunité spécifique du PAG**

Les parasites placentaires expriment à la surface des hématies qu'ils parasitent une protéine appelée VAR2CSA, variant de la famille des (PfEMP1). VAR2CSA se lie spécifiquement à une glycosaminoglycane, la chondroïtine sulfate de type A (CSA), récepteur exprimé par le syncytiotrophoblastes [19]. La protéine VAR2CSA est une molécule de 350 kDa comprenant 6 domaines appelés Duffy-binding-like (DBL) entrecoupée d'inter-domaine (ID). Certaines régions de VAR2CSA induisent des anticorps protecteurs diminuant la séquestration des hématies parasitées dans le placenta [18, 20, 195, 196].

Au cours du paludisme placentaire, les hématies infectées par *Plasmodium falciparum* sont séquestrées dans les espaces inter-villeux du placenta [14]. Cela est dû à un phénomène de cytoadhésion des hématies infectées à la CSA exprimée à la surface du syncytiotrophoblaste. Une inflammation locale se développe ainsi qu'une réduction des échanges nutritifs foeto-maternels [197]. Cette insuffisance fonctionnelle du placenta, ajoutée à l'anémie maternelle, se traduit par une hypotrophie du nouveau-né, un petit poids de naissance, entraînant ainsi une mortalité élevée et une plus forte susceptibilité aux infections, notamment palustres [12, 198-202]. Depuis une trentaine d'années, il a été observé que l'impact du paludisme placentaire ou paludisme gestationnel est plus important lors des premières grossesses et diminuait progressivement lors des grossesses ultérieures [3, 4]. Cette immunité protectrice développée par la femme pourrait être mise à profit pour proposer un vaccin hautement spécifique [203].

### **2.4. Immunité du nouveau-né et paludisme**

Le paludisme reste l'une des principales causes de mortalité infantile en Afrique subsaharienne et se positionne au quatrième rang avec 10% des décès à l'échelle du continent en 2015 (OMS 2015). La plus grande susceptibilité des enfants aux infections pendant la petite enfance serait liée non seulement à leurs systèmes immunitaires mais aussi aux conditions pathologiques maternelles durant la grossesse via les contacts *in utero* aux antigènes solubles lors des infections. Les enfants nés des mères impaludées au cours de la grossesse sont plus susceptibles et ont un risque plus élevé au paludisme ainsi qu'à d'autres infections (bactérienne, virale, parasitaire) au cours de leur première année de vie [12, 13].

Les études sur l'immunité néonatale et sur les interactions mère-enfant par rapport à l'infection palustre ont permis de comprendre la plus grande susceptibilité au paludisme pendant la petite enfance. Les mécanismes immunologiques responsables de cette plus grande

susceptibilité des enfants nés de mères impaludées durant la grossesse sont partiellement connus et seraient liés à une stimulation des cellules fœtales *in utero*. Des études réalisées à partir du sang de cordon ont permis de comprendre partiellement les réponses immunitaires spécifiques du paludisme chez les nouveau-nés. L'immunité du nouveau-né issu de mère infectée par *Plasmodium* durant la grossesse est caractérisée par une suppression des réponses inflammatoires induites par des fréquences élevées des cellules Treg associées à une production augmentée d'IL-10 ainsi qu'à une altération de l'activité des cellules dendritiques [11, 204]. Ce phénomène suggère que les enfants ayant été exposés *in utero* aux antigènes solubles du *Plasmodium* présentent une tolérance immunitaire vis-à-vis du paludisme. L'immaturation des cellules dendritiques, exprimant faiblement la molécule du CMH2, favoriserait leur incapacité à initier des réponses spécifiques T chez les nouveau-nés exposés *in utero* [204]. Cependant l'infection palustre au cours de la grossesse est associée à la régulation des réponses cellulaires chez les nouveau-nés exposés *in utero* au *Plasmodium* [114, 205, 206]. La stimulation des TLR démontre la capacité des cellules du sang de cordon du nouveau-né exposés *in utero* au paludisme, à produire de l'IFN- $\gamma$  [10].

Les mécanismes liés à une altération des réponses immunologiques des enfants exposés *in utero* au paludisme par rapport aux enfants non exposés, restent encore à déterminer. Dans cette thèse, nous proposons d'étudier les conséquences du PAG sur les réponses immunologiques du nouveau-né. Ainsi, nous avons étudié la mise en place de la réponse immunitaire innée à travers la stimulation spécifique des CPA avec des ligands de TLR d'une part et d'autre part nous avons exploré le système immunitaire adaptatif via la caractérisation des différentes sous populations lymphocytaires.

Chez les jeunes enfants infectés par *P. falciparum*, des fréquences élevées de DC ont été observées suggérant une réponse spécifique importante, mais la présence d'antigène parasitaire inhiberait l'activation de ces cellules [207, 208]. Par ailleurs, des fréquences élevées de DC immatures ont été observées chez des enfants infectés par *P. falciparum* [208, 209]. Ces données suggèrent qu'une réponse inflammatoire importante chez l'enfant au cours de l'infection palustre conduirait à des accès graves. Par conséquent, la prise en charge des jeunes enfants est indispensable dans le contrôle du paludisme.

## **2.5. Les Effets du PAG sur la santé de la mère et du nouveau-né**

L'infection palustre chez la femme enceinte constitue un très grave problème de santé publique puisqu'elle représente des risques non négligeables pour la mère, le fœtus et le nouveau-né.

### **2.5.1. Effet mutuel paludisme-grossesse**

Cette association paludisme et grossesse peut avoir des répercussions sévères chez le fœtus.

L'infection palustre et la grossesse vont interagir mutuellement en fonction de l'état physiologique du système immunitaire.

#### **• Retentissement de la grossesse sur le paludisme**

La grossesse entraîne une immunomodulation qui contrôle des réponses inflammatoires nécessaires pour lutter contre certaines infections, surtout chez les femmes primigestes et au deuxième trimestre de la grossesse. Le bouleversement des réponses immunologiques et une susceptibilité particulière pendant la grossesse vont favoriser le développement des parasites et par conséquent, les infections seront plus fréquentes et plus graves notamment chez les gestantes non immunisées.

#### **• Retentissement du paludisme sur la grossesse**

La présence du récepteur placentaire, la CSA spécifique de la protéine VAR2CSA exprimée à la surface des hématies parasitées, favorise la séquestration de ces dernières dans le placenta. La présence de ces hématies parasitées dans le placenta va entraîner des réactions inflammatoires avec un afflux de macrophages dans la chambre intervillieuse, des dépôts de fibrines périvillositaires, de pigments malariques et un épaississement de la membrane basale trophoblastique. Ces lésions placentaires vont entraîner une diminution des échanges fœto-maternels générant une hypoxie chez le fœtus. L'infection palustre pendant la grossesse est fortement associée à une diminution du transfert des anticorps maternel nécessaire pour la croissance fœtale [210, 211]. Cependant ces anomalies placentaires sont partiellement réversibles si le traitement est précoce. Selon l'importance des altérations histologiques et le terme de la grossesse, on pourra observer un avortement, une mort fœtale *in-utero*, un retard de croissance ou une souffrance fœtale aiguë à l'accouchement.

### **2.5.2. Les conséquences du paludisme gestationnel**

Le paludisme gestationnel affecte l'issue de la grossesse en agissant à la fois sur la mère et le fœtus [7, 212]. Les conséquences liées au paludisme au cours de la grossesse varient en fonction de l'intensité de l'infection.

#### **2.5.2.1. Les conséquences chez la future mère**

Chez la mère, les conséquences du paludisme associé à la grossesse vont de l'anémie sévère [200] aux complications graves, telles que l'œdème pulmonaire ou l'insuffisance rénale [213]. Ce qui pourrait aboutir finalement à un avortement et au décès maternel.

### 2.5.2.2. Les conséquences chez le fœtus et le nouveau-né

La conséquence périnatale du paludisme la mieux étudiée au cours de la grossesse est le faible poids à la naissance [7]. L'activité et la sévérité des infections déterminent la prématurité et le retard de la croissance *in-utero*; Ce qui représente des facteurs de risque de la mortalité néonatale et infantile.

Des études épidémiologiques et parasitologiques ont pu montrer que les enfants nés avec un placenta infecté par *P. falciparum* développent plus précocement que les autres une infection palustre [11, 12, 214].

## Chapitre 3: Mémoires immunologiques et développement du vaccin à base du VAR2CSA pour prévenir le PAG

En raison des conséquences fatales du paludisme gestationnel pour la mère et le nouveau-né, le développement d'un vaccin pour protéger les complications graves du PAG devient urgent. Plusieurs approches sur la compréhension et la pathologie du PAG ont permis l'identification d'une cible vaccinale potentielle, VAR2CSA. VAR2CSA, présente dans presque tous les isolats de *P. falciparum*, est une protéine (environ 350 KDa) appartenant à la famille des antigènes variants de surface PfEMP1 de *P. falciparum*. Les protéines PfEMP-1 sont codées par la famille des gènes *var* dont il existe environ 60 copies dans le génome de *P. falciparum* ([215, 216]. La structure de la protéine PfEMP-1 est particulière et très variable, principalement la partie extracellulaire soumise à la pression immunitaire de l'hôte. La protéine PfEMP-1 est une protéine transmembranaire ayant une région extracellulaire, une partie transmembranaire et une région intracytoplasmique. La partie extracellulaire de tous les variants PfEMP-1 est composée d'un segment N-terminal (NTS) suivi par la succession de plusieurs domaines DBL (Duffy Binding like) et des régions appelées inter-domaines riches en cystéines (CIDR) [217, 218].

En particulier, la partie extracellulaire de VAR2CSA, moins variable que les autres variants du PfEMP-1, est composée de 6 domaines DBL (Duffy binding like) riches en cystéine et des régions ID (inter-domaine) (**Figure 8**). Il n'y a pas de domaine CIDR. Cette partie extracellulaire joue un rôle clé dans l'adhésion et l'immunogénicité des fragments recombinants du VAR2CSA.

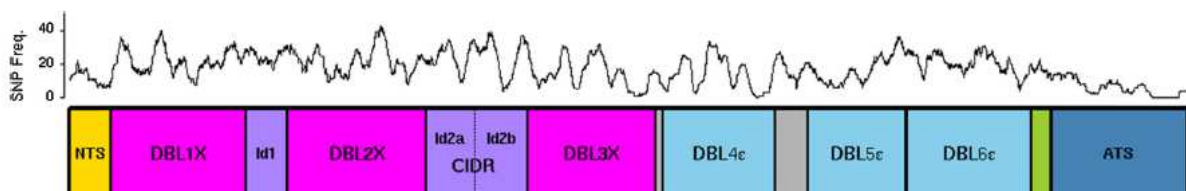
Les anticorps dirigés contre certains domaines ou combinaison de domaines inhibent la séquestration des hématies parasitées dans les espaces intervilleux du placenta [18, 20, 195, 196].



Ainsi les propriétés et les qualités qui font du VAR2CSA le meilleur candidat vaccin pour la prévention du PAG sont:

- i) l'acquisition d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine VAR2CSA dépendante du sexe et de la parité des individus vivant en zone d'endémie [19, 44, 219],
- ii) l'association entre la réponse humorale acquise spécifique de la protéine VAR2CSA et la protection contre le paludisme gestationnel [19, 44, 219],
- iii) la réponse humorale cible des régions ou domaines de la protéine VAR2CSA qui sont relativement conservées. Les épitopes ou les séquences des acides aminés de VAR2CSA spécifiques des anticorps protecteurs sont particulièrement conservés [18, 220-222],
- iv) l'inactivation partielle ou totale du gène *var2csa* entraîne une perte de la fonction d'adhérence des parasites à la CSA [220, 223],
- v) le VAR2CSA est préférentiellement exprimé par les parasites placentaires avec une liaison sélective à la CSA [19, 219].

Les multiples domaines extracellulaires, le poids moléculaire et les variations considérables des séquences du VAR2CSA rendent complexe le développement du vaccin mimant l'activité protectrice des anticorps observés naturellement chez les multigestes. Cependant, deux antigènes vaccinaux produits à partir du segment N-terminal de la protéine VAR2CSA font l'objet d'essai clinique de Phase I dont le vaccin PAMVAC (ID1-DBL2-ID2a) et PRIMALVAC (DBL1-ID1-DBL2).



**Figure 8: Structure schématique de la protéine VAR2CSA [224]**

SNP : single-nucleotide polymorphism

### 3.1. Immunité contre le paludisme et mémoires immunologiques anti-VAR2CSA spécifique du PAG

La mise en place de la mémoire immunologique est basée sur l'induction des cellules T et B mémoires via une stimulation primaire avec l'antigène (infection ou vaccination). L'immunité antipalustre n'est jamais stérile et disparaît en absence d'exposition continue aux antigènes palustres [39, 41, 225]. Par contre le maintien de l'immunité anti-VAR2CSA spécifique du paludisme placentaire a été démontré en absence d'exposition aux antigènes du PAG pour une longue durée [226]. Les mécanismes immunologiques responsables de l'échec de la mise en

place et du maintien d'une immunité efficace et protectrice contre le paludisme ne sont que partiellement connus. La pression parasitaire influencerait le système immunitaire de l'hôte induisant des changements qualitatifs et fonctionnels des cellules T et B de l'immunité adaptative nécessaire au développement et au maintien des réponses mémoires. Les lymphocytes T et B mémoires se divisent en deux sous populations (atypiques vs classiques) phénotypiquement et fonctionnellement différentes chez les sujets vivant en zone d'endémie palustre [40, 227-229]. Les fonctions des lymphocytes mémoires atypiques restent encore spéculatives et contradictoires. Les lymphocytes T et B mémoires classiques ont la capacité de se différencier très rapidement en cellules effectrices, nécessaires à l'élimination des antigènes lors d'une réinfection [119, 230]. A l'inverse, l'émergence de cellules T épuisées et B atypiques chez les sujets infectés par le VIH ou l'hépatite C est associée à une augmentation de la charge virale et à une altération de l'immunité [231, 232] ainsi qu'à une forte expression de récepteurs d'inhibition (FcR-Like 4) de la production de cytokines pro-inflammatoires [233-235]. Dans le cas du paludisme, les fonctions « délétères » de ces cellules atypiques ne sont pas établies. Une expansion des cellules B mémoires atypiques est associée à l'exposition répétée au paludisme [40, 227, 229, 236] avec des productions d'anticorps fonctionnels [228]. Cependant, il reste à déterminer si ces cellules atypiques remplissent réellement le rôle fonctionnel de cellules mémoires ou si elles représentent simplement des cellules sécrétrices d'anticorps de courte durée de vie à l'inverse des plasmocytes qui ont une longue durée de vie [237].

Les données récentes sur le maintien dans le temps de la mémoire anti-VAR2CSA spécifique du PAG [226, 238], la conservation de l'antigène ainsi que la protection des conséquences graves du PAG chez les multigestes [239] encouragent le développement du vaccin contre le PAG.

### **3.2. Développement du vaccin spécifique du PAG**

Le développement d'un vaccin contre le paludisme placentaire est fondé sur l'imitation de l'activité fonctionnelle des anticorps naturellement acquis capables de bloquer l'adhésion de la protéine VAR2CSA au récepteur CSA. Les prémices de l'approche vaccinale ont permis d'identifier les domaines immunogènes de la protéine impliqués dans la séquestration des hématies parasitées via l'interaction entre la protéine VAR2CSA et la CSA.

Les études *in vitro* ont examiné la liaison entre la CSA et les recombinants des 6 domaines DBL de VAR2CSA de différents allèles notamment 3D7, FCR3 et A4. L'ensemble des données montre une spécificité de liaison stable de la CSA avec les domaines DBL2, DBL3, DBL6 [240-244]. Par contre il a été montré *in vitro* que la liaison de certains domaines DBL

au CSA n'est pas restreinte au parasite placentaire (VAR2CSA) mais aussi les liaisons similaires ont été observées avec certains domaines DBL d' autres PfEMP1 qui ne sont pas spécifiques de la grossesse [245]. Ces observations sur l'identification des domaines de liaison de VAR2CSA spécifique à la CSA ont servi à la désignation de la cible vaccinale. Les études sur les protéines recombinantes à partir de la partie extracellulaire complète du VAR2CSA "Full length" (FV2) ont montré une forte affinité de liaison à la CSA [246, 247]. La vaccination des animaux avec FV2 a permis l'obtention d'anticorps qui inhibent complètement l'adhérence des parasites à la CSA [248]. Ces anticorps inhibent l'adhérence des souches parasitaires homologues, à fond génétique similaire au variant parasitaire, utilisées pour la vaccination mais pas les souches hétérologues. Ce qui suggère que la protéine FV2, surtout à cause de sa grande taille, n'est pas la construction optimale pour le vaccin. En ciblant les fragments N-terminaux de VAR2CSA, on induit des anticorps inhibiteurs de l'adhérence des hématies parasitées à la CSA [249, 250].

Les anticorps monoclonaux dirigés contre des domaines DBL de VAR2CSA peuvent inhiber l'adhérence des isolats placentaires à la CSA [251] et sont associés à une forte affinité de liaison avec les domaines DBL2, DBL3 et DBL6 [21, 247]. Plusieurs études ont montré la réactivité des anticorps au DBL5 dépendant de la parité [19, 252, 253]. La présence d'épitopes universels soutenait donc DBL5 comme un composant important de VAR2CSA à considérer pour le développement d'un vaccin [252, 253].

Les travaux sur les niveaux d'anticorps spécifiques des différents DBL en fonction de la gestité montrent parfois des contradictions en considérant certains paramètres comme le sexe, l'âge et la zone géographique. Le tableau 2 illustre en fonction de la gestité, la variabilité des réponses humorales spécifiques de la protéine VAR2CSA. Cela montre la difficulté pour la communauté scientifique d'identifier avec certitude le (ou les domaines) de la protéine VAR2CSA capables d'induire une réponse protectrice pour prévenir le paludisme placentaire. C'est une combinaison de ces domaines de la protéine VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a) qui est impliquée dans la formulation du vaccin PAMVAC (pregnancy-associated malaria vaccine) actuellement en cours d'essai clinique de Phase Ia (en Allemagne) et Phase Ib (au Bénin) chez l'Homme dans le cadre du projet PLACMALVAC .

**Tableau 2:** Les études sur l'acquisition de l'immunité au VAR2CSA avec les différents domaines indiquant la relation entre les niveaux d'anticorps et la parité. Les moments du prélèvement pendant la grossesse ou à l'accouchement sont indiqués [224].

<b>Domaine DBL</b>	<b>Parité dépendante</b>	<b>Pas d'effet de la parité</b>
DBL1	Oleinikov [254] (accouchement)	Ndam [23] (inclusion & accouchement)
DBL1-DBL2	Ndam [239] (inclusion & accouchement)	
ID1-ID2a		Babakhanyan [255]
DBL3	Oleinikov [254] (accouchement)	Brolin [256] (3 <sup>ème</sup> trimestre)
DBL4	Ndam [239] (accouchement)	Oleinikov [254] (accouchement) Tuikue Ndam [239] (inclusion)
DBL5	Brolin [256] (3 <sup>ème</sup> trimestre) Gangnard [252] (durant la grossesse) Gnidehou [253] (2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> trimestre) Salanti [19] (accouchement) Ndam [23] (inclusion & accouchement) Ndam [239] (inclusion)	Oleinikov [254] (accouchement) Ndam [239] (accouchement)
DBL6	Oleinirov [254] (accouchement) Ndam [23] (inclusion & accouchement)	Brolin [256] (3 <sup>ème</sup> trimestre) Ndam [239] (inclusion & accouchement)

**PARTIE II: PROBLEMATIQUE**  
**ET OBJECTIFS DE LA THESE**

Les femmes enceintes et les enfants de 0 à 5 ans représentent les deux populations à risque du paludisme à *P. falciparum*, celles à protéger en priorité. La séquestration et la multiplication des parasites du paludisme au niveau du placenta participent à altérer non seulement la santé de la femme enceinte mais aussi celle du fœtus et du nouveau-né. Le paludisme associé à la grossesse (PAG) augmente le risque d'anémie maternelle, d'avortement précoce ainsi que de retard de croissance *in utero* et de prématurité, mais la conséquence majeure du PAG est une réduction du poids de naissance et une augmentation de la fréquence des petits poids de naissance (moins de 2500 g), lesquels présentent une augmentation de la morbidité et la mortalité infantiles [257-259]. Plusieurs études épidémiologiques ont montré une association entre le paludisme placentaire et une plus grande susceptibilité de l'enfant au paludisme [12, 214, 260] mais aussi à d'autres infections [13] pendant ses premières années de vie.

L'hypothèse pour expliquer cette dernière observation est que le contact *in utero* avec des antigènes solubles du paludisme suite à une infection du placenta au cours de la grossesse pourrait induire une tolérance immunologique ou un dysfonctionnement des réponses immunologiques chez le nouveau-né.

Certains marqueurs immunologiques sont augmentés dans le sang du cordon en cas de paludisme placentaire et sont associés au risque de survenue du paludisme chez les nouveau-nés pendant l'enfance. Une augmentation de la fréquence des lymphocytes T régulateurs associée à des concentrations élevées d'IL-10 dans le sang de cordon suite à une exposition *in utero* aux antigènes palustres [10, 11, 114, 193] pourraient inhiber les réponses inflammatoires nécessaires au contrôle des infections. Aussi, des concentrations plus élevées de la protéine HLA-G soluble dans le sang de cordon des enfants nés des mères infectées à l'accouchement sont associées à un faible poids de naissance et à une augmentation du risque d'infection palustre pendant la petite enfance [261]. L'infection palustre pendant la grossesse est fortement associée à une altération du tissu placentaire et par conséquent à une réduction des échanges fœto-maternels notamment le transfert des anticorps maternels [210].

La plupart des études sur l'effet du PAG sur la modification des réponses immunologiques du nouveau-né sont réalisées uniquement avec des informations à l'accouchement et ne traduisent pas l'impact des infections au début ou au cours de la grossesse. Les parasites du paludisme peuvent séquestrer dans le placenta à partir du premier trimestre de la grossesse [17] et les études sur les cohortes de femmes enceintes et des nouveau-nés du projet STOPPAM ont montré des associations significatives entre:

- i) l'infection palustre au début du deuxième trimestre et le risque d'un faible poids de naissance et d'anémie maternelle à l'accouchement [7, 15];

ii) l'infection palustre durant le troisième trimestre de la grossesse et le risque d'infection palustre au cours de la première année de vie [262].

Il est essentiel de mieux documenter la cinétique des infections et leur gravité pendant toute la durée de la grossesse. Ces infections pourraient avoir des impacts sur: i) la croissance foetale, ii) le développement du système immunitaire *in utero*, iii) les réponses immunes futures du nouveau-né.

Le premier objectif de ma thèse se situe dans ce contexte afin de mieux comprendre les mécanismes associés à l'orientation des réponses immunologiques innées et adaptatives du nouveau-né pendant la petite enfance. Deux études ont été réalisées dans ce cadre sur les cohortes mères-enfants du projet STOPPAM afin d'étudier chez les nouveau-nés de la naissance à 12 mois:

- i) l'activation du système immunitaire inné via la stimulation des récepteurs TLR
- ii) l'évolution des fréquences de différentes populations des cellules de l'immunité innée et adaptative (cellules T effecteurs, Treg, NK, NKT).

Protéger la femme enceinte contre le paludisme afin de réduire la morbidité et la mortalité maternelle, néonatale et infantile reste une priorité. Les stratégies de prévention du PAG recommandées par l'OMS reposent sur l'administration d'un traitement préventif intermittent au cours de la grossesse (TPIg) par la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. L'émergence de résistances des vecteurs aux insecticides et des parasites aux antimalariques nécessite la recherche de nouvelles stratégies de contrôle du paludisme. Ainsi de nouvelles molécules [263, 264] et/ou de nouvelles associations thérapeutiques [265] pour remplacer la SP ont été validées par des essais cliniques. Le vaccin représente une des alternatives essentielles pour la prévention du PAG.

Depuis une vingtaine d'années, des recherches ont permis d'identifier le mécanisme physiopathologique du PAG. Il s'agit de l'interaction entre un antigène parasitaire VAR2CSA exprimé à la surface des hématies parasitées et un récepteur placentaire la chondroïtine sulfate A (CSA) qui permet l'adhésion des hématies parasitées par *P. falciparum* à la surface du placenta [14, 22]. Plusieurs études ont montré que des anticorps de type IgG capables d'inhiber l'adhérence des hématies parasitées à la CSA confèrent une immunité protectrice chez les femmes multigestes contre le paludisme placentaire [22, 266], cette immunité est parité dépendante [192]. De la caractérisation de ces parasites spécifiques du placenta a découlé un candidat vaccin ciblant la protéine VAR2CSA, une protéine de la famille PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1) codée par le gène *var2csa*. Certains domaines de VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a) sont relativement conservés et capables d'induire

des anticorps inhibiteurs de la séquestration des hématies parasitées dans le placenta. Cet antigène (ID1-DBL2-ID2a) est impliqué dans la formulation du vaccin PAMVAC. Le vaccin, produit en qualité GMP a servi à l'étude toxicologique chez l'animal et à valider les réponses immunologiques *in vitro* au Bénin. Dans le cadre du projet PlacMalVac, il est actuellement en cours d'essai clinique de Phase Ia en Allemagne et Phase Ib au Bénin.

Le deuxième objectif de ma thèse dans le cadre du projet vaccinal est d'étudier l'acquisition d'une mémoire immunologique dirigée contre VAR2CSA et qui protégerait du PAG. Ce travail vise spécifiquement à quantifier et à caractériser les réponses immunologiques des cellules T et B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal.

J'ai étudié la construction naturelle de la mémoire immunologique cellulaire contre le PAG spécifique à deux domaines de VAR2CSA; le DBL5 et l'antigène vaccinal (ID1-DBL2-ID2a) au cours de la grossesse chez les femmes vivant en zone endémique naturellement exposées au paludisme. L'objectif est d'évaluer comment les infections palustres pendant la grossesse pourraient moduler les réponses cellulaires aux futurs candidats vaccin.



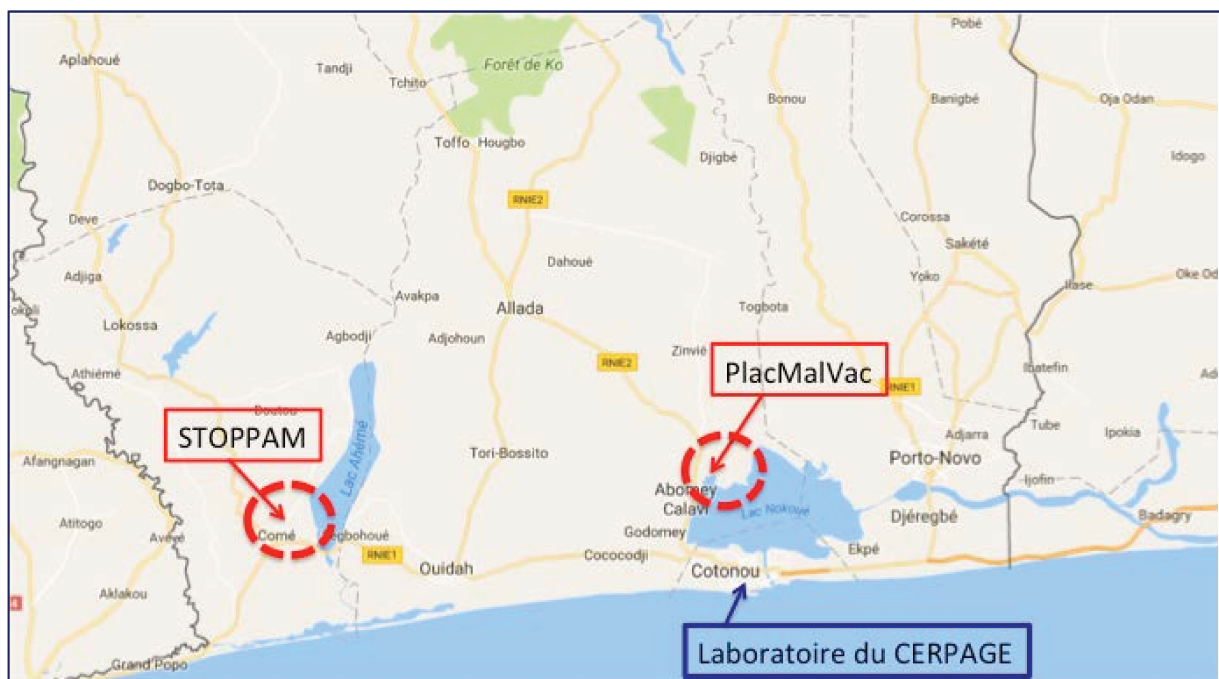
**PARTIE III:**  
**CADRE ET METHODES D'ETUDE**

## Organisation de la thèse en alternance

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à un cofinancement de trois ans obtenu auprès du Service de Coopération et d'Action Culturel de l'Ambassade de France au Bénin et du département AIRD-DPF de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Ces financements m'ont permis d'effectuer pendant ces trois années des alternances entre trois équipes de recherche:

- CERPAGE (Centre d'étude et de recherche sur le paludisme associé à la grossesse et à l'enfance) à Cotonou, Bénin,
- MERIT-UMR 216 IRD à Paris (Mère et enfants face aux infections tropicales), Paris (France)
- ITM (Intitut für Tropmedezin), Tübingen, Allemagne

Ma thèse a été réalisée en cotutelle entre les universités d'Abomey-Calavi (Bénin) et Paris-Descartes (France).



**Figure 9:** Localisation des 2 sites d'étude STOPPAM et PlacMalVac et du laboratoire à Cotonou

## Chapitre 1: Projet STOPPAM: suivi longitudinal d'une cohorte de femmes enceintes et de leurs nouveau-nés

Nous nous sommes intéressés aux conséquences du PAG sur la mise en place des réponses immunologiques du nouveau-né au cours des premiers mois de vie. Ces études ont été

réalisées sur un suivi longitudinal des cohortes de femmes enceintes et des nouveau-nés dans le cadre du projet STOPPAM (Strategies To Prevent Pregnancy Associated Malaria).

### **1.1. Description de l'étude STOPPAM**

Le projet STOPPAM est un consortium de six pays (France, Danemark, Pays-Bas, Suède, Tanzanie et Bénin). L'étude STOPPAM a reçu l'avis favorable des comités d'éthique dans chaque pays du consortium. Ce projet financé par l'Union Européenne avait pour objectif d'élucider et de quantifier les conséquences du paludisme associé à la grossesse sur la santé de la mère et de l'enfant dans la perspective d'identifier un candidat vaccin.

Au Bénin, l'étude STOPPAM s'est déroulée de février 2008 à avril 2011 dans la commune de Comé à 70 Km de la capitale économique, Cotonou (**Figure 9**). Un suivi longitudinal a été réalisé sur le plan clinique et parasitologique de 1037 femmes enceintes et de 217 enfants provenant de trois centres de santé de la commune de Comé (Akodeha, Comé, Oudémé-Pédah) (**Figure 10**). Un consentement écrit et éclairé a été signé par les femmes enceintes qui acceptaient de participer à l'étude. Ainsi les femmes enceintes avec un âge gestationnel inférieur à 24 semaines et résidant depuis 6 mois et à moins de 10 km d'un des centres de santé de l'étude étaient incluses dans l'étude. Les données cliniques, anthropométriques et parasitologiques (parasitémie et anémie) ainsi que les échantillons biologiques ont été collectés chez les femmes pendant leur grossesse à chaque consultation prénatale (CPN), de l'inclusion à l'accouchement et aussi pendant les consultations d'urgence. Afin de bien définir l'âge gestationnel et étudier la croissance fœtale, 4 échographies ont été réalisées pendant le suivi des femmes enceintes.

Pour le suivi des enfants, 217 nouveau-nés provenant de 217 femmes parmi les 1037 femmes ont été sélectionnés à l'accouchement suivant les données cliniques et parasitologiques des mères au cours de la grossesse. Trois groupes d'enfants ont été inclus en fonction de 3 histoires palustres différentes des mères durant la grossesse:

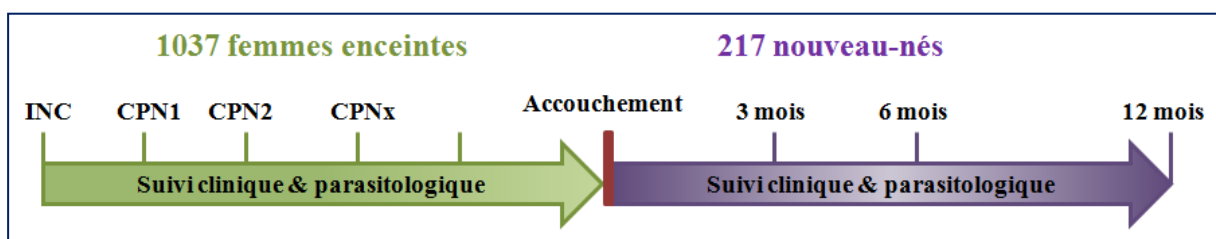
- i) 99 femmes qui n'ont manifesté aucun accès palustre de l'inclusion jusqu'à l'accouchement;
- ii) 71 femmes qui ont manifesté au moins une infection palustre pendant la grossesse mais qui ont été traitées avant l'accouchement;
- iii) 47 femmes qui ont développé ou non une infection palustre pendant la grossesse et qui ont fait une infection palustre à l'accouchement.

L'inclusion des enfants a eu lieu après explication de l'étude et l'obtention de la signature d'un consentement éclairé des parents. En plus des consultations en urgence, ces enfants ont été suivis deux fois par mois avec en alternance, une visite à domicile et une visite au

dispensaire. Les données cliniques et parasitologiques étaient recueillies lors de ces visites pour le suivi des enfants pendant 12 mois. Les prélèvements sanguins de 2 ml ont été recueillis chez les enfants à quatre différents moments au cours du suivi (à la naissance "sang du cordon"; à 3 mois, 6 mois et 12 mois) pour les études de l'immunité néonatale.

Pour la détermination de l'infection palustre, un test de diagnostic rapide (TDR, Cypress diagnostic), un frottis et une GE (goutte épaisse) étaient réalisés sur le sang veineux des femmes et des enfants. Lorsqu'une infection palustre était détectée au cours du suivi ou lors des consultations d'urgence, les femmes étaient systématiquement traitées selon les recommandations nationales du ministère de la santé béninois avec une dose de quinine (8mg/kg/jour en trois fois pendant sept jours) et les enfants au Coartem© (20 mg d'artéméter et 120 mg de luméfantrine). Après l'extraction des ADN parasites à partir des confettis de sang par la méthode du chelex, les qPCR ont été réalisées à quatre moments durant le suivi chez les femmes (à l'inclusion, à la première et deuxième doses de TPIg et à l'accouchement) afin de caractériser les parasites et de détecter les infections de faibles parasitemies, submicroscopiques.

Les échantillons biologiques étaient convoyés quotidiennement, dans les 4 heures suivant le prélèvement, au laboratoire pour des analyses hématologiques, biochimiques, et parasitologiques. Les études immunologiques ont été réalisées au laboratoire du Centre d'étude et de recherche sur le paludisme associé à la grossesse et à l'enfance (CERPAGE) de la Faculté des Sciences de la Santé en collaboration avec l'Unité Mixte de Recherche 216 (UMR216) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD).



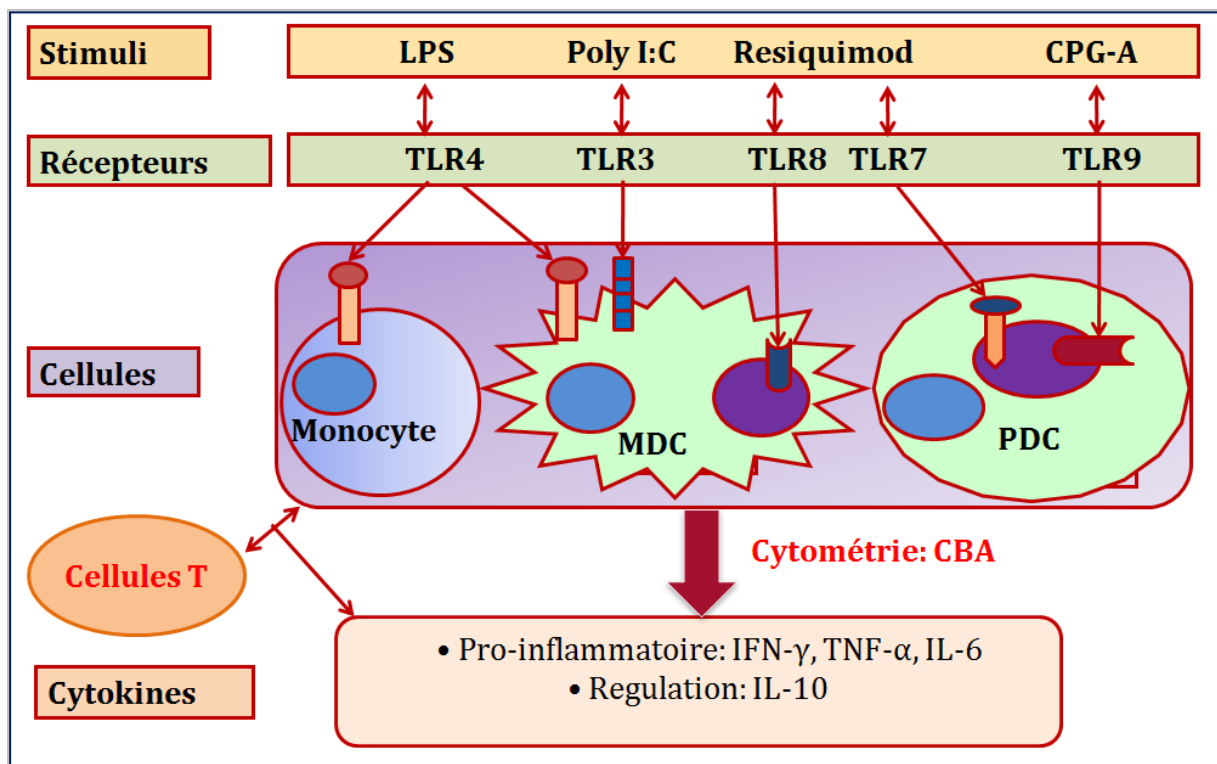
**Figure 10:** Suivi longitudinal des femmes enceintes et des nouveau-nés dans le cadre du projet STOPPAM Bénin

## 1.2. Etudes de l'impact du PAG sur les réponses immunologiques du nouveau-né dans le cadre du projet STOPPAM

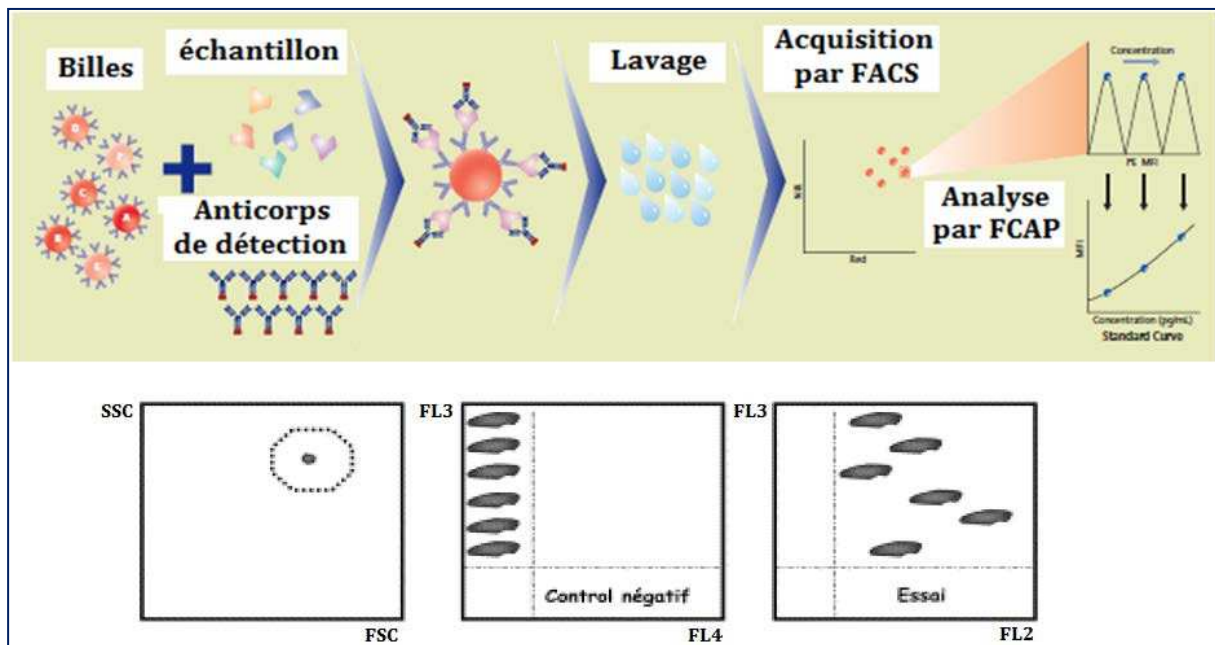
### 1.2.1. Etude de la réponse innée via la stimulation des récepteurs TLR (STOPPAM)

Pour l'étude de l'immunité innée du nouveau-né, nous avons travaillé sur un sous échantillon de couples mères enfants (n= 137) issus de la cohorte des 217 couples mères-enfants. Le sang

total des enfants à la naissance (sang du cordon, M0), à 3 mois (M3), à 6mois (M6) et à 12 mois (M12) a été stimulé ou non (contrôle négatif) pendant 24 heures avec quatre ligands des TLR à savoir: Poly I:C (20 µg/ml), LPS (100 ng/ml), Résiquimod (1 mg/ml) et CpG ODN2216 (3 µg/ml) (**Figure 11**). A la fin du temps de stimulation, les échantillons étaient centrifugés pendant 8 minutes à 450g afin de récupérer les surnageants de culture. Ces derniers furent conservés à -80°C et ont servi à évaluer les concentrations des cytokines produites par les cellules du sang après stimulation. Les cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) et anti-inflammatoire (IL-10) ont été dosées simultanément dans 50µl de surnageant de culture par la technique CBA (Cytometric Bead Array) à l'aide de la cytométrie en flux (FACS Calibur). Les données de cytométrie ont été analysées par le logiciel FCAP array version 1 pour la détermination des concentrations des cytokines mesurées (**Figure 12**). Les analyses ont été réalisées sur un sous échantillon de (n= 134) couples mères enfants issus de la cohorte des 217 couples mères-enfants après avoir exclu les enfants avec un statut VIH positif ou inconnu (n=3) ainsi que ceux pour lesquels nous n'avons pas pu faire au moins 2 prélèvements de 2 ml de sang veineux (n=80) durant le suivi en plus du sang du cordon.



**Figure 11:** Protocole expérimental de la stimulation des CPA via les TLR



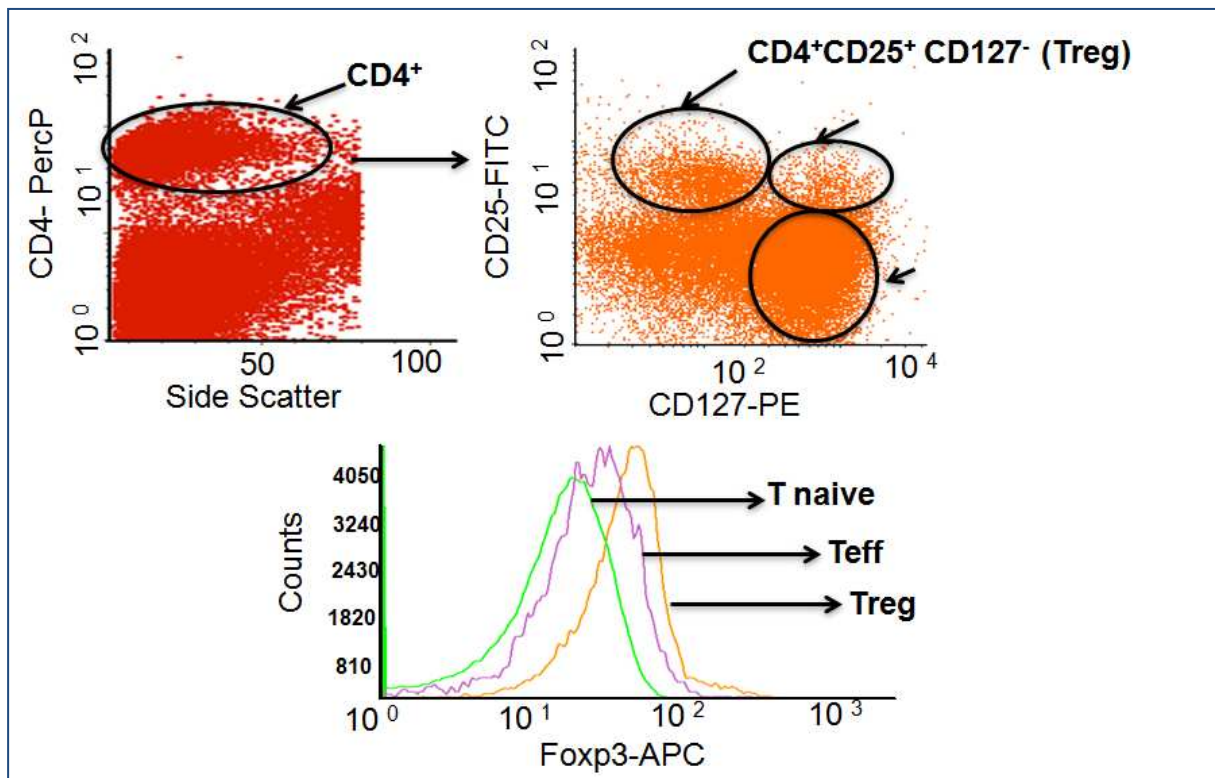
**Figure 12:** Principe du dosage des cytokines par la technique CBA

### 1.2.2. Etude de la réponse adaptative via la caractérisation des cellules T (STOPPAM)

L'étude de l'immunité adaptative a été réalisée sur la même cohorte de 217 couples mères-enfants du projet STOPPAM avec le sang total des enfants. L'immunophénotypage des cellules T, NK a été réalisé après marquage extracellulaire par des anticorps monoclonaux CD8-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD3-APC, anti-CD56-PE (BD Biosciences).

Les fréquences des lymphocytes régulateurs (Treg) et T effecteurs (Teff) ont été déterminées en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD4-PerCP, anti-CD25-FITC, anti-CD127-PE et anti-Foxp3-APC (BD Biosciences et eBioscience). La combinaison des clusters de détermination permet de définir les phénotypes cellulaires. Les cellules NK sont  $CD3^+CD56^+$ , les NKT sont  $CD3^+CD56^+$ , les Treg sont  $CD4^+CD25^+CD127^-$  et les T effecteurs sont  $CD4^+CD25^+CD127^+$  parmi l'ensemble de la population lymphocytaire. Les niveaux d'expression de la protéine FoxP3, impliquée dans l'activité suppressive des Treg, ont été évalués avec la valeur relative correspondante à l'intensité de fluorescence sur les lymphocytes Treg ou T effecteurs. Après exclusion des enfants dont le statut VIH est positif ou inconnu (n=3) ainsi que ceux pour lesquels n'avons pas pu prélevé 2ml de sang au moins 3 fois au cours du suivi; les analyses statistiques ont portés sur 150 enfants pour les cellules T et NK d'une part et d'autre part sur 158 enfants pour les Treg et Teff.

Les stratégies d'analyse sur la caractérisation des différentes populations lymphocytaires sont représentées sur la **Figure 13**.



**Figure 13:** Caractérisation des différentes populations T lymphocytaires

### 1.3. Etude de la réponse mémoire spécifique au VAR2CSA-DBL5 chez les femmes enceintes (STOPPAM)

Ce travail a été réalisé sur deux sous-échantillons différents sélectionnés parmi les 1037 femmes enceintes du projet STOPPAM à l'inclusion et à l'accouchement. Pour les explorations des réponses cellulaires, nous ne pouvions pas techniquement et financièrement travailler sur les 1037 femmes. La population d'étude est composée de deux sous populations:

- i) au début de la grossesse, 142 femmes sélectionnées selon l'infection palustre diagnostiquée par TDR dont 71 femmes infectées et 71 femmes non infectées;
- ii) à l'accouchement, 125 femmes sélectionnées en fonction de l'histoire palustre au cours de la grossesse subdivisées en trois groupes: infectées, exposées et non-infectées. 22 femmes ont été incluses dans les deux sous populations, au début de la grossesse et à l'accouchement.

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'implication des lymphocytes T dans la mise en place d'une immunité protectrice contre le PAG.

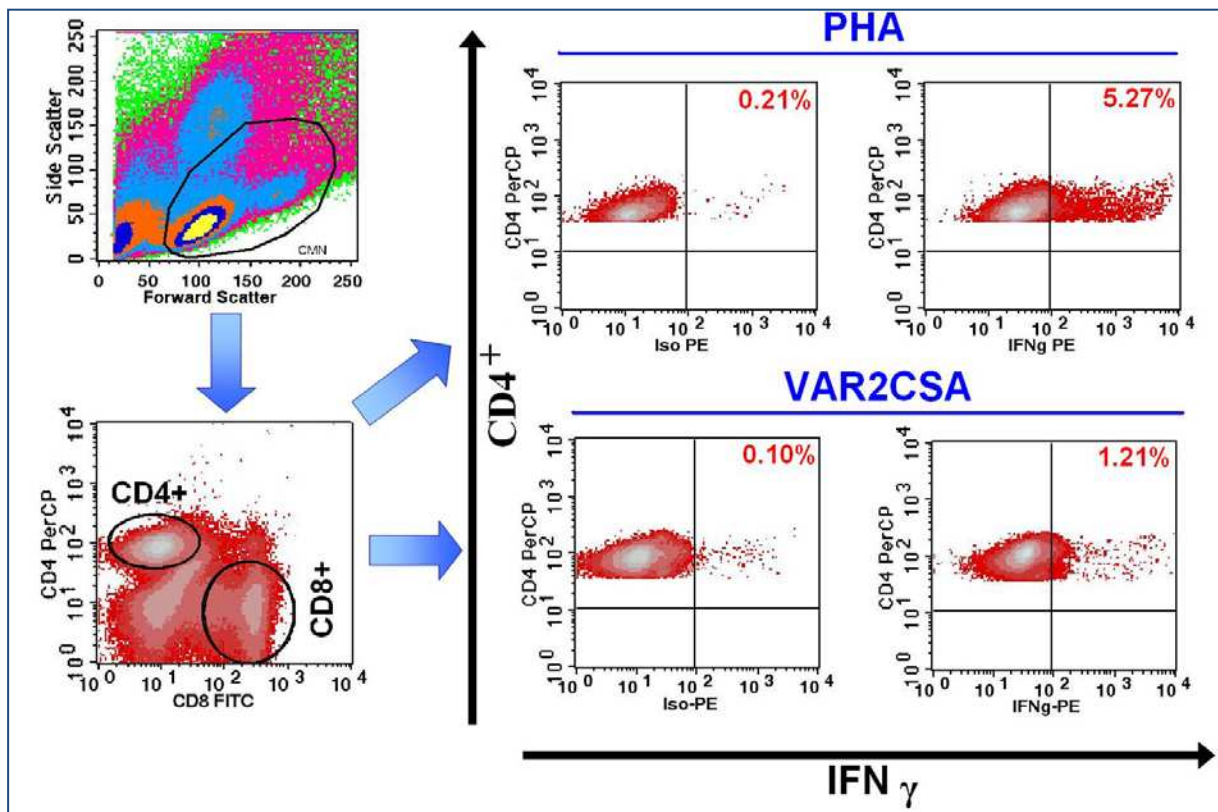
Les cellules mononucléées du sang périphériques ( $3 \cdot 10^5$  cellules par tube) des femmes sélectionnées au début de la grossesse et à l'accouchement ont été isolées et stimulées avec un antigène issu de la protéine VAR2CSA (domaine DBL5) ainsi qu'avec un mitogène, la PHA. Un tube est traité dans les mêmes conditions sans stimulation pour le contrôle négatif. Les



concentrations de cytokines pro et anti-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-17, IL-10, IL-13) ont été mesurées dans les surnageants de culture après 24 heures de stimulation.

Ensuite en fonction de la quantité de cellules mononucléées disponibles, un marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$  produit après stimulation avec le VAR2CSA et la PHA a été réalisé pour caractériser la fréquence des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sécrétrices de l'IFN- $\gamma$  (**Figure 14**). Deux millions de PBMC par tube ont servi au marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$ .

Les données de l'immunophenotypage des cellules et la mesure des concentrations des cytokines ont été acquises par le cytomètre BD FACS Calibur (BD Biosciences, France).



**Figure 14:** Marquage intracellulaire des cellules T sécrétrices de l'IFN- $\gamma$



## **Chapitre 2: Etude PLACMALVAC, le développement clinique d'un vaccin contre le PAG**

### **2.1. Description de l'étude PlacMalVac**

Le projet PlacMalVac, suite logique du projet STOPPAM, est financé par l'Union Européenne avec comme objectif principal, le développement clinique d'un vaccin contre le paludisme associé à la grossesse. Un nouveau consortium africain (Bénin) et européen (Allemagne, Danemark, France) a sélectionné une partie de l'antigène VAR2CSA à tester dans ce nouveau projet. L'objectif de PlacMalVac est de réaliser un essai clinique de Phase Ia en Allemagne et Phase Ib au Bénin, et en amont, de faire une étude de faisabilité de l'essai clinique de Phase II chez des femmes béninoises non enceintes ainsi qu'une étude d'acceptabilité d'un vaccin contre le PAG au Bénin. Au final, le travail présenté dans cette thèse concerne le suivi de cohorte de femmes primigestes de PlacMalVac. Mon objectif était d'explorer comment les infections à *P. falciparum* pendant la première grossesse pouvaient moduler les réponses cellulaires.

### **2.2. Méthodes d'étude**

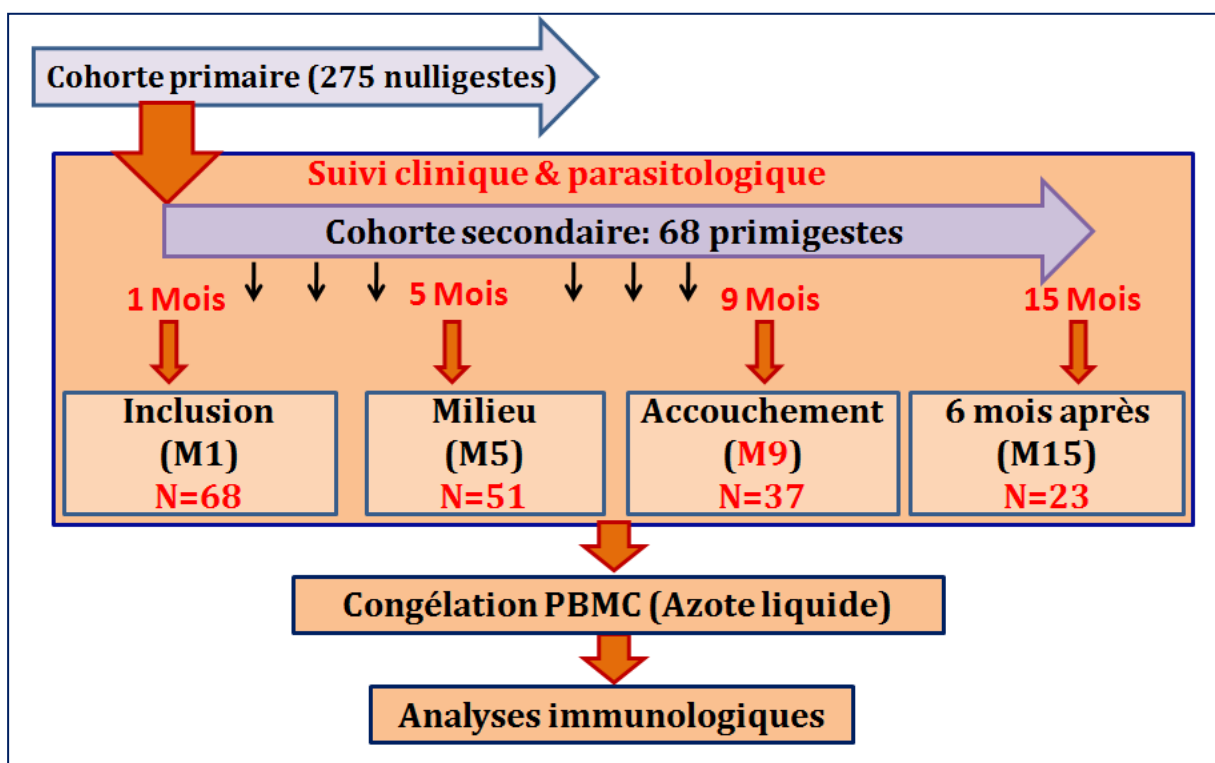
L'originalité de l'étude PlacMalVac était de suivre des femmes nulligestes pour identifier celles qui tomberaient enceintes afin de pouvoir suivre des femmes primigestes dès leur premier mois de grossesse avec un enregistrement des données cliniques et parasitologiques ainsi que des échographies obstétricales pour estimer l'âge exact de la grossesse et la croissance fœtale tout au long de la grossesse et 6 mois après.

#### **2.2.1. Echantillonnage**

Cette étude se propose de suivre une cohorte de jeunes femmes nulligestes afin de simuler et de préparer la future phase II du développement clinique du vaccin anti-VAR2CSA. Une cohorte primaire de 275 nulligestes 18 à 30 ans, se déclarant nulligestes, au sein de la population rurale du département de l'Atlantique (communes de Sô-Ava et Zè) proche de Calavi a été suivie (**Figure 9**). Chez ces jeunes femmes, des tests de grossesse urinaires étaient réalisés mensuellement lors des visites à domicile. Les premières 68 femmes enceintes étaient incluses dans une cohorte secondaire. Ces primigestes étaient suivies sur le plan clinique et parasitologique dès leurs premiers mois de grossesse jusqu'à l'accouchement ainsi qu'à six mois après l'accouchement afin de surveiller le bon déroulement de la grossesse et de mesurer le développement de l'immunité anti-VAR2CSA acquise naturellement en fonction de l'histoire palustre.

Pour l'étude de l'immunité humorale, des prélèvements sur microtainers de 500 µl ont été réalisés mensuellement à chaque consultation prénatale. Par contre pour l'étude de l'immunité cellulaire, 20 ml de sang veineux étaient prélevés chez les primigestes à 4 différents moments durant le suivi: au début de la grossesse, à 5 mois de grossesse, à l'accouchement et à 6 mois après l'accouchement. Ces moments sont parfois décalés de plus ou moins un mois maximum pour certaines femmes en raison de problèmes logistiques sur le terrain.

Les échantillons biologiques étaient convoyés quotidiennement dans les 4 heures suivant le prélèvement au laboratoire du Centre d'étude et de recherche sur le paludisme associé à la grossesse et à l'enfance (CERPAGE) pour des analyses hématologiques, biochimiques, parasitologiques et la préparation des études immunologiques (**Figure 15**).



**Figure 15:** Suivi longitudinal des primigestes de PlacMalVac au Bénin

### 2.2.2. Isolement, congélation et décongélation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)

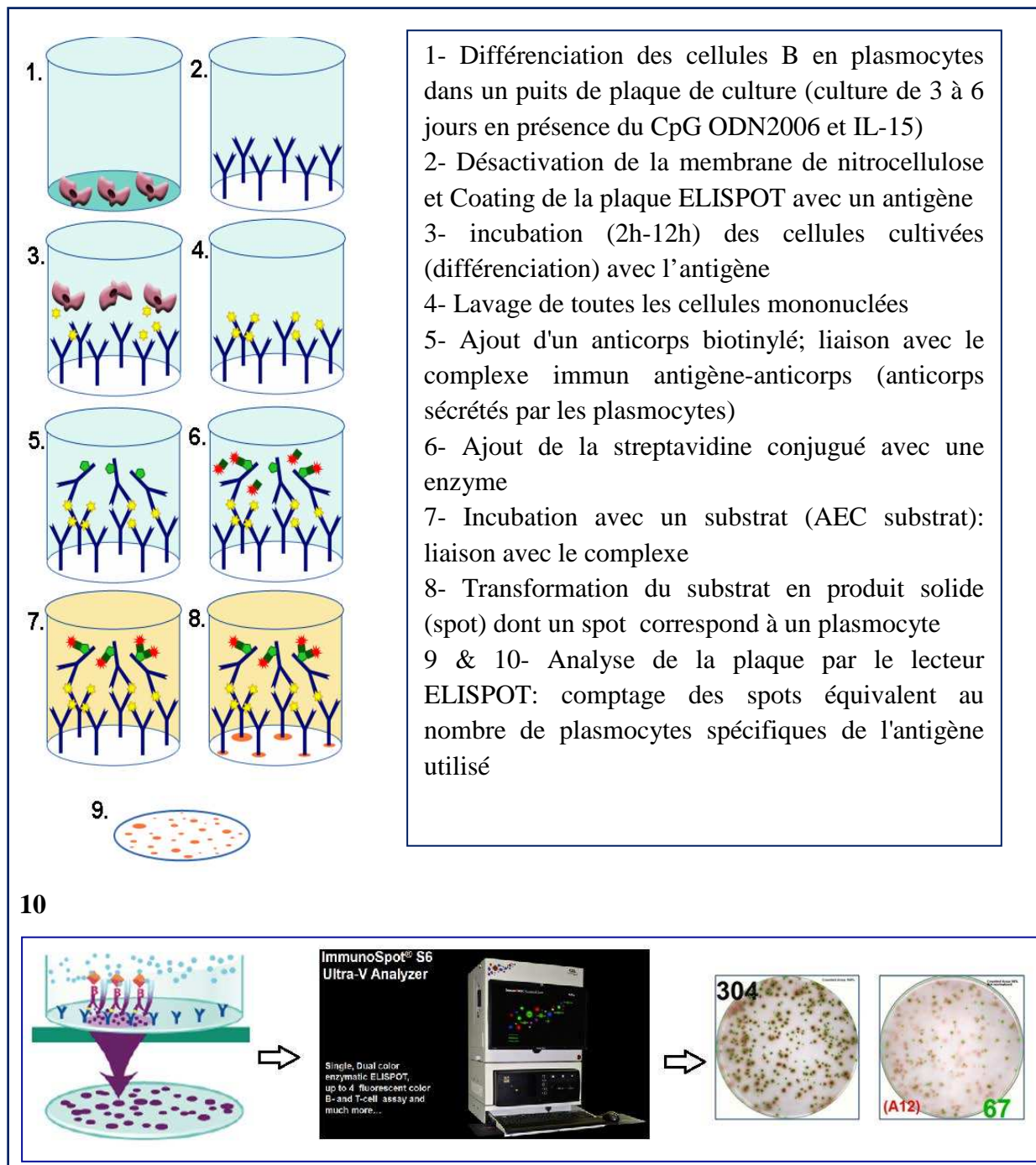
Les échantillons du sang veineux ont été centrifugés à 1800 tours/minute pendant 10 minutes pour l'aliquotage et la conservation des plasmas à -20°C pour le dosage des anticorps et à -80°C en prévision du dosage de cytokines plasmatiques. Le reste du sang, dilué au demi avec du RPMI, a servi à l'isolement des PBMC après centrifugation avec du Ficoll-Histopaque (Thermo Fischer Scientific, United Kingdom). Ces cellules ont été récupérées et lavées avec du RPMI, puis congelées entre 4 à 7 millions par ml dans l'azote liquide avec du SVF (sérum

du veau fœtal) (GE Healthcare) contenant 10% DMSO (Sigma). Pour les analyses immunologiques, les PBMC ont été décongelées avec du milieu RPMI complétés en SVF.

### **2.2.3. Quantification des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène**

Les cellules B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal (PAMVAC) ainsi qu'à d'autres antigènes (CIDR, la toxine tétanique et un anti-IgG totales) ont été quantifiées via la technique ELISPOT. Le CIDR est une protéine du PfEMP1 non spécifique du PAG qui va nous servir d'élément de comparaison avec l'antigène spécifique du PAG. Les PBMC ont été cultivées pendant 6 jours en présence d'une cytokine, l'IL15 et du CpGODN-2006 pour induire la différenciation de l'ensemble des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps (plasmocytes). L'antigène vaccinal (PAMVAC), et les témoins (Anti-IgG, CIDR et Toxine tétanique) ont été adsorbés ("coating") séparément dans des puits d'une plaque ELISPOT avec un fond en nitrocellulose. Les cellules différenciées, déposées dans chaque puits ont été incubées une nuit à 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Au cours de ce temps d'incubation, les anticorps sécrétés par les cellules B spécifiques de leur antigènes respectifs immobilisés dans leur puits sont capturés via l'interaction anticorps-antigène. Après une étape de lavage, les empreintes formées (anticorps-antigènes) ont servi à la quantification du nombre de cellules B mémoires spécifiques de l'antigène par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme qui transforme le substrat en produit solide coloré sous forme de « spots ou point ».

Le lecteur ELISPOT (CTL Immunospot S6 Ultra-V) a servi au comptage et à l'analyse des plaques. Chaque spot correspond à une cellule B mémoire spécifique de l'antigène (**Figure 16**).



**Figure 16:** Quantification des cellules B par la technique ELISPOT

### 2.2.4. Mesure des cytokines dans les surnageants de culture après stimulation avec l'antigène vaccinal

Après décongélation, les PBMC ont été incubées dans l'étuve (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pendant une nuit uniquement avec du milieu culture complet (RPMI 10%, SVF, 1% L-glutamine à 200 mM, 1% Pénicilline et Streptomycine à 10000 UI) afin de restaurer l'intégrité des membranes cellulaires. Ensuite les cellules ont été récupérées, lavées et comptées pour la stimulation. 2.10<sup>5</sup> PBMC par puits ont été stimulées avec trois antigènes: la PHA, la PPD (tuberculose) et l'antigène vaccinal (VAR2CSA) ainsi qu'un tube non stimulé comme contrôle négatif. Après

72h de stimulation, les plaques cultures de PBMC ont été centrifugées pendant 5 minutes à 400 g afin de récupérer les surnageants de culture. Ces derniers ont été conservés à -80°C et ont servi à évaluer la sécrétion des cytokines par les cellules immunitaires après stimulation. Six cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL13 et TNF- $\alpha$ ) ont été dosées simultanément dans 50 $\mu$ l de surnageant de culture par la technique CBA (Cytometric Bead Array) à l'aide d'un cytomètre à flux (FACS Calibur). Les données de cytométrie ont été analysées par le logiciel FCAP version 1 pour la détermination de la concentration des cytokines mesurées.

### **Chapitre 3: Analyse statistique**

Les données de l'immunophénotypage des cellules et de la mesure cytokines ont été acquises avec le cytomètre BD FACS Calibur (BD Biosciences, France). L'analyse des données a été faite à l'aide du logiciel CellQuest Pro. Les concentrations de cytokines ont été obtenues après analyse des données de cytométrie avec le logiciel FCAP array version 1.

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisées par les outils STATA 12, le logiciel R (StataCorp, College Station, TX USA) et Prism 6.0 (Graph pad Inc, CA, USA). Des tests paramétriques et non paramétriques ont été utilisés en fonction des données.

**PARTIE IV:**  
**RESULTATS**

## **ARTICLE 1: Malaria modifies neonatal and early-life Toll-like receptor cytokine responses**

Komi Gbédandé,<sup>a,b</sup> Stefania Varani,<sup>c</sup> Samad Ibitokou,<sup>a,d,e</sup> Parfait Houngbegnon,<sup>a</sup> Sophie Borgella,<sup>a</sup> Odilon Nouatin,<sup>a,b</sup> Sem Ezinmegnon,<sup>a,b</sup> Adicatou-lai Adeothy,<sup>a</sup> Gilles Cottrell,<sup>d,e</sup> Achille Massougbodji,<sup>a</sup> Kabirou Moutairou,<sup>b</sup> Marita Troye-Blomberg,<sup>f</sup> Philippe Deloron,<sup>d,e</sup> Nadine Fievet,<sup>a,d,e</sup> Adrian J. F. Luty<sup>g</sup>

**Journal: Infect Immun 2013; Volume: 81; DOI: 10.1128/IAI.00237-13**

### **Présentation au congrès:**

- November 2012: **ASTMH 61st Annual Meeting, Atlanta, USA.** Posters
- October 2013: **MIM congress « Pan-African Malaria Conference » in Durban, South Africa. Oral**

Pendant la petite enfance, il existe une susceptibilité accrue aux maladies infectieuses due à une immunomodulation qui inhibe et contrôle les réponses pro-inflammatoires délétères à la naissance. La mise en place d'une réponse immune protectrice résulte de la reconnaissance, de la présentation de l'antigène et de l'activation des cellules immunitaires via les TLR présents à la surface des CPA (cellules présentatrices d'antigènes). Ces TLR activés induisent la sécrétion de cytokines et l'expression des molécules de co-stimulation pour réguler la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Chez les nouveau-nés, les CPA via la stimulation des TLR sont impliquées dans la mise en place progressive des réponses inflammatoires pendant les premiers mois de vie. Le paludisme gestationnel pourrait modifier les réponses TLR impliquées dans le développement des mécanismes des réponses immunologiques du nouveau-né.

Cette étude est une partie du projet STOPPAM réalisée au Bénin sur une cohorte de 222 femmes enceintes et leurs enfants suivis de la naissance jusqu'à 12 mois. Cette étude prospective chez la mère et l'enfant vise à apprécier l'impact de l'infection palustre sur l'immunité néonatale via les réponses cytokiniques avec la stimulation des TLR. Des données cliniques et parasitologiques (parasitémie et anémie) sont collectées chez la mère pendant la grossesse et chez l'enfant. Le sang total des enfants (0, 3, 6 et 12 mois) est stimulé avec 4 ligands des TLR (polyI.C, LPS, Résiquimod, CpGODN) spécifiques de différentes CPA (monocytes, cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes). Les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et anti-inflammatoire (IL-10) sont dosées dans les surnageants de culture des enfants par cytométrie en flux afin d'étudier les niveaux d'activation des CPA chez les nouveau-nés en fonction du paludisme gestationnel. L'analyse statistique des données a été réalisée sur 134 paires mères-enfants.

D'une manière générale, les réponses des CPA via la stimulation des TLR augmentent avec l'âge. Les productions de l'IL-6 et de l'IL-10 sont élevées dès la naissance alors que celles du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  sont faibles à la naissance puis augmentent avec l'âge en réponse aux TLR. Les analyses multivariées ont montré que les infections à *P. falciparum* de la mère à l'accouchement sont significativement associées à une production élevée d'IL-6 et d'IL-10 dans les 3 premiers mois de vie en réponse au TLR3 et aussi du TNF- $\alpha$  entre 6 et 12 mois en réponse aux TLR3, 7/8 et 9. Les analyses prospectives ont montré qu'une forte production d'IL-10 à la naissance en réponse aux TLR3 et 7/8 est significativement associée à un risque accru de développer une infection à *P. falciparum* pendant la première année de vie.

Notre étude suggère que l'infection palustre chez la mère, à l'accouchement, altère l'immunité innée du nouveau-né via les réponses TLR. Cette altération influencerait la mise en place d'une immunité naturelle et protectrice chez les nouveau-nés pendant leurs premières années de vie et pourraient avoir des conséquences sur la morbidité future ainsi que sur les réponses aux vaccins des enfants.



# Malaria Modifies Neonatal and Early-Life Toll-Like Receptor Cytokine Responses

Komi Gbédandé,<sup>a,b</sup> Stefania Varani,<sup>c</sup> Samad Ibitokou,<sup>a,d,e</sup> Parfait Houngbegnon,<sup>a</sup> Sophie Borgella,<sup>a</sup> Odilon Nouatin,<sup>a,b</sup> Sem Ezinmegnon,<sup>a,b</sup> Adicatou-lai Adeothy,<sup>a</sup> Gilles Cottrell,<sup>d,e</sup> Achille Massougbodji,<sup>a</sup> Kabirou Moutairou,<sup>b</sup> Marita Troye-Blomberg,<sup>f</sup> Philippe Deloron,<sup>d,e</sup> Nadine Fievet,<sup>a,d,e</sup> Adrian J. F. Luty<sup>g</sup>

Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin<sup>a</sup>; Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin<sup>b</sup>; Unit of Microbiology, Department of Diagnostic, Experimental and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy<sup>c</sup>; Institut de Recherche pour le Développement, Mère et Enfant Face aux Infections Tropicales, Paris, France<sup>d</sup>; Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, France<sup>e</sup>; Department of Immunology, Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm, Sweden<sup>f</sup>; Department of Medical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands<sup>g</sup>

**Protection from infections in early life relies extensively on innate immunity, but it is unknown whether and how maternal infections modulate infants' innate immune responses, thereby altering susceptibility to infections. *Plasmodium falciparum* causes pregnancy-associated malaria (PAM), and epidemiological studies have shown that PAM enhances infants' susceptibility to infection with *P. falciparum*. We investigated how PAM-mediated exposures *in utero* affect innate immune responses and their relationship with infection in infancy. In a prospective study of mothers and their babies in Benin, we investigated changes in Toll-like receptor (TLR)-mediated cytokine responses related to *P. falciparum* infections. Whole-blood samples from 134 infants at birth and at 3, 6, and 12 months of age were stimulated with agonists specific for TLR3, TLR4, TLR7/8, and TLR9. TLR-mediated interleukin 6 (IL-6) and IL-10 production was robust at birth and then stabilized, whereas tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) responses were weak at birth and then increased. In multivariate analyses, maternal *P. falciparum* infections at delivery were associated with significantly higher TLR3-mediated IL-6 and IL-10 responses in the first 3 months of life ( $P < 0.05$ ) and with significantly higher TLR3-, TLR7/8-, and TLR9-mediated TNF- $\alpha$  responses between 6 and 12 months of age ( $P < 0.05$ ). Prospective analyses showed that higher TLR3- and TLR7/8-mediated IL-10 responses at birth were associated with a significantly higher risk of *P. falciparum* infection in infancy ( $P < 0.05$ ). Neonatal and infant intracellular TLR-mediated cytokine responses are conditioned by *in utero* exposure through PAM late in pregnancy. Enhanced TLR-mediated IL-10 responses at birth are associated with an increased risk of *P. falciparum* infection, suggesting a compromised ability to combat infection in early life.**

Chronic infections during pregnancy, including those of parasitic origin, are a frequent occurrence in low-income areas of the world in general and in sub-Saharan African countries in particular, and they affect fetal immunity such that infants' responses to vaccination are diminished and their susceptibility to infection is increased (1, 2). Maternal infection with *Trypanosoma cruzi*, for example, without vertical transmission, stimulates fetal innate and adaptive immune responses such that exposed but uninfected neonates produce higher concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines than their unexposed counterparts (3, 4). Maternal infection with *Schistosoma* spp. has also been shown to be associated with fetal inflammation, characterized by increased levels of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor (TNF) receptor II in cord blood of those born to infected mothers (5). With an annual estimate of 50 million or more mothers at risk, pregnancy-associated malaria (PAM) due to *Plasmodium falciparum* is a well-recognized and well-described example of such an infection, representing a major public health burden measurable by the adverse pregnancy outcomes it causes (reviewed in references 6–10). Quite apart from the association between PAM and low birth weight and the poor prognosis of survival that goes with it, a number of studies have documented the increased susceptibility to malaria of infants born to mothers with *P. falciparum* infection detected at delivery (11–15). PAM has also recently been shown to be associated with an increased risk of

fever episodes of nonmalarial causes in infancy (16). Taken together, these findings suggest that exposure to *P. falciparum* *in utero* alters fetal and/or neonatal immune development, resulting in enhanced susceptibility to malaria in infancy, and, furthermore, that such alterations may also affect susceptibility to infections other than malaria.

Evidence of altered fetal/neonatal cellular immunological activity comes from reports of cord blood cell frequencies, their activation status, and their antigen-specific proliferative and/or cytokine responses resulting from placental infection with *P. falciparum* and consequent exposure of the fetal immune system to parasite-derived antigens *in utero* (reviewed in reference 17). At the level of induction and acquisition of specific T cell activity, the conclusion from several of these studies is that regulatory T cells

Received 21 February 2013 Returned for modification 19 March 2013

Accepted 30 April 2013

Published ahead of print 20 May 2013

Editor: J. H. Adams

Address correspondence to Adrian J. F. Luty, adrian.luty@ird.fr.

K.G. and S.V. contributed equally to this work, as did N.F. and A.J.F.L.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00237-13

(Treg) producing the immunosuppressive cytokine IL-10 play a pivotal role in downmodulating cord blood Th1-type responses to *P. falciparum* antigens (18–23). The latter studies, however, examined only the downstream nature of the altered immunological responses, giving little, if any, information on the character of the upstream innate immune interactions, for example, that may have led to the observed changes in T cell activity.

Innate immunity involves the family of so-called “professional” antigen-presenting cells (APC), a family that includes myeloid and plasmacytoid dendritic cells (mDC and pDC) as well as monocytes and B cells. These cells play a pivotal role in recognition of pathogens and orchestrating the subsequent adaptive immune response (24). A major component of pathogen recognition by APC comprises a family of pattern recognition receptors referred to as Toll-like receptors (TLR) that interact with a range of highly conserved microbial components, leading, conventionally, to a burst of proinflammatory cytokine activity. In early life, the components of the adaptive immune system, although present, are insufficiently mature, and an infant’s response to infection therefore relies extensively on innate immunity (reviewed in reference 25). At all times, the balance between production of pro- and anti-inflammatory mediators is tightly regulated to allow efficient, protective immune responses to develop while preventing the pathological consequences of excessive inflammation (26). In the particular context of control of inflammatory activity in early life, a pivotal role for neonatal B cells producing IL-10 as a result of TLR9 activation has been reported (27), a role that is consistent with reports of robust TLR ligand-mediated IL-10 responses present at birth both in non-African and in African populations (28–30).

In the context of pregnancy, we and others have shown that placental infection with *P. falciparum* at delivery is associated with altered fetal innate immune responses, modified frequency of cord blood DC (31), partial activation of cord blood APC (32), and modulated cord blood cytokine responses to TLR ligation (33). Two independent studies in nonpregnant individuals have reported the capacity of *P. falciparum* infection to cause proinflammatory priming of responses to subsequent TLR ligation, a capacity that distinguishes the parasite from most other microbial pathogens (34, 35). Thus, although the detailed mechanisms remain to be characterized, with controversy remaining over the precise nature of the parasite-derived TLR ligands, it is clear that *P. falciparum* generates an array of responses through interaction with different TLR, including at least TLR2, -4, and -9 (36). The above-mentioned cross-sectional studies present a limitation, i.e., the role of PAM in influencing early-life cellular immunological responses has been investigated only at delivery, leaving unknown the potential impact of *in utero* exposure to *P. falciparum* on the normal profile of maturation of the innate immune system in infancy.

Here, we evaluated the development of TLR-mediated cytokine responses both at birth and during the first 12 months of life in a large cohort of children born to mothers with different malaria histories, following the hypothesis that PAM and, potentially, infection and/or malaria episodes in early life would affect the development of infants’ innate immune responses. Since the timing of occurrence of PAM during pregnancy is associated with fetal and infant malaria outcomes (37, 38), parasitological data were collected from all mothers starting with inclusion, during the second trimester, and thereafter throughout pregnancy up to and

including delivery. These data were then combined with measures of innate immune activity at birth and during infancy. Through prospective evaluation during the first year of life, we also evaluated the independent influence of being born premature and of infection and/or malaria episodes during infancy on the same TLR-mediated responses.

## MATERIALS AND METHODS

**Ethics statement.** The Strategies to Prevent Pregnancy-Associated Malaria (STOPPAM) study was approved by the ethics committee of the Health Science Faculty of the University of Abomey-Calavi, Benin, and by the ethics committees of the Research Institute for Development (IRD) in France. Written informed consent was obtained from all mothers, who additionally provided consent for their babies, prior to inclusion in the study. All procedures adhered to Declaration of Helsinki principles.

**Study design.** The STOPPAM project was conducted in parallel in Benin and in Tanzania from 2008 to 2011. In Benin, the study took place in the district of Come, Mono Province, located 70 km west of the economical capital, Cotonou. Malaria transmission in this area can be characterized as hyperendemic, with two peaks during the rainy seasons (April to July, September to November), and an entomological inoculation rate estimated at 35 to 60 infective bites per person per year (13). The STOPPAM study design has been described in detail elsewhere (37). In total, 1,037 women less than 24 weeks pregnant were enrolled in 3 clinics (Come, Akodeha, and Ouedeme Pedah) in the Come district. Clinical and parasitological data were subsequently collected at monthly follow-up visits and at delivery. According to the existing national policy for malaria, women received intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) with the antimalarial drug combination sulfadoxine-pyrimethamine (SP) on two separate occasions during scheduled antenatal visits (ANV) spaced at least 1 month apart in the second/third trimesters. Women diagnosed with malaria (positive malaria rapid diagnostic test [RDT]; see below) received a standard treatment regimen of quinine unless the diagnosis coincided with a scheduled IPTp dose, in which case SP was given instead of quinine. Women were encouraged to present at the maternity clinic to receive care whenever necessary between ANV. Such visits are referred to as emergency visits.

For an immunological substudy conducted as part of the STOPPAM project in Benin, a subgroup of 217 pregnant women from the enrolled cohort were selected at delivery on the basis of their recorded history of infection with *P. falciparum* (uninfected during pregnancy,  $n = 99$ ; infected during pregnancy but uninfected at delivery,  $n = 71$ ; infected at delivery,  $n = 47$ ). The cohort of infants of these selected women were actively followed up at home from birth to 12 months of age, with clinical assessments every 2 weeks and parasitological assessments (see below) every month. Cellular immunological studies were performed with cord blood and the infants’ peripheral blood that was collected at 3, 6, and 12 months of age. Infants from whom fewer than 3 blood samples were collected during the follow-up period were excluded from the study, as were infants either of mothers who subsequently tested seropositive for HIV or for whom the HIV serostatus was unknown.

***P. falciparum* infection status.** To assess the impact of *P. falciparum* infection on neonatal immunity, clinical and parasitological data were collected from mothers at each ANV and emergency visit and from infants as described above. RDT (Parascreen; Zephyr Biomedical Systems) were used for mothers at all routine ANV and emergency visits and for infants whenever fever was detected during active surveillance. Retrospective confirmation of infection comprised parasitological diagnosis via standard microscopic examination of thick blood smears (TBS) that were prepared at monthly intervals from both mothers and infants. Briefly, smears were stained with Giemsa and examined by two experienced laboratory technicians for the presence and density of parasites. Smears were considered negative if no asexual-stage *Plasmodium* parasite was detected by counting high-power fields containing the equivalent of 500 leuko-

cytes. Parasites were counted against 200 leukocytes, and parasite density was calculated based on an estimate of 8,000 leukocytes/ $\mu$ l of blood. At delivery, TBS were prepared with maternal peripheral and cord blood samples, and an impression smear of placental blood was also examined. Infection of mothers at delivery was thus defined by the presence of parasites in placental and/or in peripheral blood, while infections earlier in pregnancy and during infancy were defined either by a positive RDT or by a positive TBS result.

**Blood collection and cell stimulation with TLR agonists.** Cord (10 ml) and peripheral (2 ml) venous blood samples were collected in tubes containing citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) as an anticoagulant. All samples were transported within 4 h to the laboratory of the Research Center for Malaria during Pregnancy and Infancy (CERPAGE) in Cotonou, where stimulation assays were performed the same day. Whole-blood samples were diluted 1:1 with RPMI, and separate aliquots (200  $\mu$ l) of diluted whole blood distributed in fluorescence-activated cell sorting (FACS) tubes were either left unstimulated or stimulated either with poly(I-C) (TLR3 ligand; 20  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany), with ultrapure lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (TLR4 ligand; 100 ng/ml; Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany), with resiquimod (R848; TLR7/8 ligand; 1 mg/ml; Sigma-Aldrich), or with CpG oligonucleotide type A (CpG ODN2216; TLR9 ligand; 3  $\mu$ g/ml; Metabion, Martinsried, Germany). After 24 h of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, culture supernatants were collected by centrifugation and stored at -80°C for cytokine determination.

The different TLR ligands used in these assays exert their effects on distinct immune cell subsets: poly(I-C) interacts with TLR3 and RIG-like receptors expressed within mDC (39), natural killer cells, and lymphocytes (40, 41); LPS activates TLR4 expressed on monocytes and mDC (42); R848 activates TLR7 and TLR8, with TLR7 being expressed mainly within pDC and B cells (40, 43), whereas TLR8 is found within monocytes and mDC (44, 45); the type A CpG 2216 interacts with TLR9 expressed within pDC but not B cells (46). The choice of stimulants reflects a desire, based on our own knowledge and experience (32), to focus as much as possible on DC-mediated activity.

**Cytokine measurement.** We quantified the cytokines IL-6, IL-10, gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), and TNF- $\alpha$  in 50  $\mu$ l of sampled supernatants through the use of the commercially available cytometric bead array (CBA soluble protein Flex set assay; BD Biosciences, Grenoble, France), conducted according to the manufacturer's instructions on a FACsCalibur 4-color cytometer. The assay sensitivity was 1.6 pg/ml for IL-6, 0.13 pg/ml for IL-10, 0.8 pg/ml for IFN- $\gamma$ , and 1.2 pg/ml for TNF- $\alpha$ . When the cytokine concentration in a sample was below the detection level of the test, an arbitrary value was assigned that corresponded to half of the sensitivity value for the specific cytokine concerned. Results were formatted using the BD CBA analysis software. Spontaneous cytokine production in unstimulated samples was assessed independently of that in stimulated samples, while the latter was analyzed after the corresponding unstimulated sample values were subtracted. Pilot studies of cytokine kinetics following stimulation with TLR agonists showed the 24-h incubation time to be optimal for the selected cytokines but suboptimal for pDC-specific IFN- $\alpha$  (maximal at 8 h), which was therefore not included in the panel.

**Statistical analysis.** The association between TLR-mediated cytokine responses and infant age was analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. To determine changes in TLR-mediated cytokine production as a function of malaria during pregnancy and/or infancy, the analysis proceeded as follows: for each cytokine response, we built a multivariate linear mixed model (LMM), which allows to take into account the correlation between the repeated measurements as well as the potential confounders in the relation between malaria and the TLR level. The analysis was performed in two steps: first a univariate model which aimed to select potential confounders, followed by a multivariate model. In the univariate step, we investigated the association between baseline characteristics and cytokine levels upon TLR stimulation. The baseline characteristics in-

cluded in the analysis were gravidity, maternal anemia (Hb < 11 g/dl), prematurity (<37 weeks), low birth weight (<2,500 g), and infant gender.

All variables related to *P. falciparum* infection were included in the final multivariate model, while infant age and baseline characteristics were used to adjust for confounding of the association between TLR-mediated cytokine responses and either *P. falciparum* infection during pregnancy (segregated into three periods according to the time of occurrence; see below), *P. falciparum* infection during infancy (also segregated into three time periods; see below), or other selected variables. To graphically illustrate the predicted effect of maternal infection on the TLR responses of infants, we then computed the mean predicted TLR-mediated cytokine levels of infants born to uninfected and infected mothers at each time point.

Maternal infections were segregated into the following intervals: (i) infection before the third trimester of pregnancy, (ii) infection during the third trimester of pregnancy but more than 10 days before delivery, (iii) infection from 10 days prior to delivery up to and including delivery. Designation of the latter group was based on the premise that infections detected during an emergency visit occurring 10 days or less before delivery, and therefore treated, were too close in time to delivery to be separable from it, and because most of those concerned were also found to be infected at delivery.

During the first year of life, infection/malaria episodes were also segregated into 3 intervals, (i) those occurring before 3 months of age, (ii) those occurring between 3 and 6 months of age, and (iii) those occurring between 7 and 12 months of age, and were separately assessed for associations both with spontaneous (unstimulated) and with TLR stimulation-mediated cytokine production.

In a separate analysis, we determined whether TLR-mediated cytokine responses at birth were associated with the occurrence of malaria during the first 12 months of age. For this purpose, we employed a logistic mixed model; risk factors were first analyzed in a univariate model and then, after adjusting for potential confounders, in a multivariate model. TLR responses in cord blood were considered a baseline for prediction of the development of *P. falciparum* infection during infancy. Malaria episodes recorded each month during the follow-up of infants were considered the dependent variables and coded as "infected" or "not infected." The model allowed estimation of the predictive values of the TLR-mediated cytokine levels (for any set of covariates) of all infants at each time point.

Statistical significance in all multivariate analyses was considered if *P* values were <0.05. All analyses were performed using the R statistical package (R Development Core Team; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>), and graphs were made with GraphPad (Prism 5.0).

## RESULTS

**Characteristics of the study population.** Between November 2008 and April 2011, 217 mother-infant pairs were enrolled in the study, but of these, 83 were excluded due to insufficient numbers of blood samples (80) and HIV serostatus (3 either HIV+ or unknown). Mother and infant characteristics of the 134 remaining pairs are presented in Table 1. Mothers' mean age ( $\pm$ standard deviation [SD]) was 26.3 ( $\pm$ 0.2) years, 18.7% were primigravid, and 13.4% had anemia at delivery. Babies' mean birth weight was 3,020  $\pm$  410 g (mean  $\pm$  SD). Fifteen newborns (11.2%) had a low birth weight ( $\leq$ 2,500 g), and 9 (6.7%) were born premature.

There were 41 (30.6%) women in whom infections before the third trimester of pregnancy were identified, while 24 (17.9%) were infected during the third trimester of pregnancy (but not within 10 days of delivery), and 29 (21.6%) were infected in the 10 days prior to or at delivery. Twenty-one women (15.7%) had an infected placenta, as determined by placental impression smear. Seven infants (5.2%) were infected during the first 3 months of life, 13 (9.7%) were infected between 4 and

**TABLE 1** Characteristics of the mother-infant pair study population (*n* = 134 pairs)

Characteristic	No. of individuals (%)
<b>Mother</b>	
Age (yrs)	
≤20	29 (21.6)
21–25	43 (32.2)
26–30	29 (21.6)
≥31	33 (24.6)
Gravidity status	
Primigravid	25 (18.7)
Multigravid	109 (81.3)
Anemia at delivery (Hb < 11 g/dl)	18 (13.4)
Infected before 3rd trimester of pregnancy	41 (30.6)
Infected during 3rd trimester of pregnancy up until 11 days before delivery	24 (17.9)
Infected 10 days or less prior to or at delivery	29 (21.6)
Infected placenta	21 (15.7)
No sign of infection	40 (29.9)
<b>Infant</b>	
Female	64 (47.8)
Premature (gestational age of ≤37 weeks)	9 (6.7)
Residence	
Rural	35 (26.1)
Semirural	99 (73.9)
Low birth wt (<2,500 g)	15 (11.2)
Infected before 3 mo of age	7 (5.2)
Infected between 4 and 6 mo of age	13 (9.7)
Infected between 7 and 12 mo of age	34 (25.4)
No sign of infection	80 (59.7)

6 months of age, and 34 (25.4%) were infected between 7 and 12 months of age.

**Age-dependent maturation of TLR-mediated cytokine responses.** Whole-blood samples from 134 infants were stimulated with TLR agonists at birth (cord blood) and at 3, 6, and 12 months of age (peripheral venous blood). At all time points, the production of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  by agonist-stimulated cells was higher than the amounts spontaneously secreted by unstimulated control samples (Table 2, Fig. 1). Conversely, only very limited TLR-mediated IFN- $\gamma$  production above unstimulated levels was observed regardless of time point, with the highest values seen in response to the TLR7/8 agonist R848 (Table 2, Fig. 1). Overall, the latter agonist induced the highest levels of all cytokines, while the TLR9 agonist, CpG type A, induced comparatively the weakest cytokine responses at all time points.

The concentrations of cytokines spontaneously released by unstimulated cells increased with age: univariate analyses showed that the amounts of IL-6 and TNF- $\alpha$  increased significantly from birth to 6 months of age ( $P < 0.001$ ), and the amounts of IL-10 increased from birth to 3 months of age ( $P < 0.001$ ) (Table 2, Fig. 1). Consequently, analyses of the age-dependent maturation of TLR agonist-mediated cytokine responses were conducted after subtraction of cytokine concentrations in supernatants of unstimulated cells from those in supernatants of stimulated cells.

The cytokine responses to the TLR3, TLR4, and TLR7/8 agonists exhibited similar age-related patterns, characterized by robust secretion of IL-6 and IL-10 at birth that either remained stable over time (TLR7/8) or diminished significantly with increasing age (TLR3 and -4;  $P < 0.04$  by Kruskal-Wallis; Fig. 1). In contrast, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production in response to these three agonists was weak at birth and then increased significantly to reach

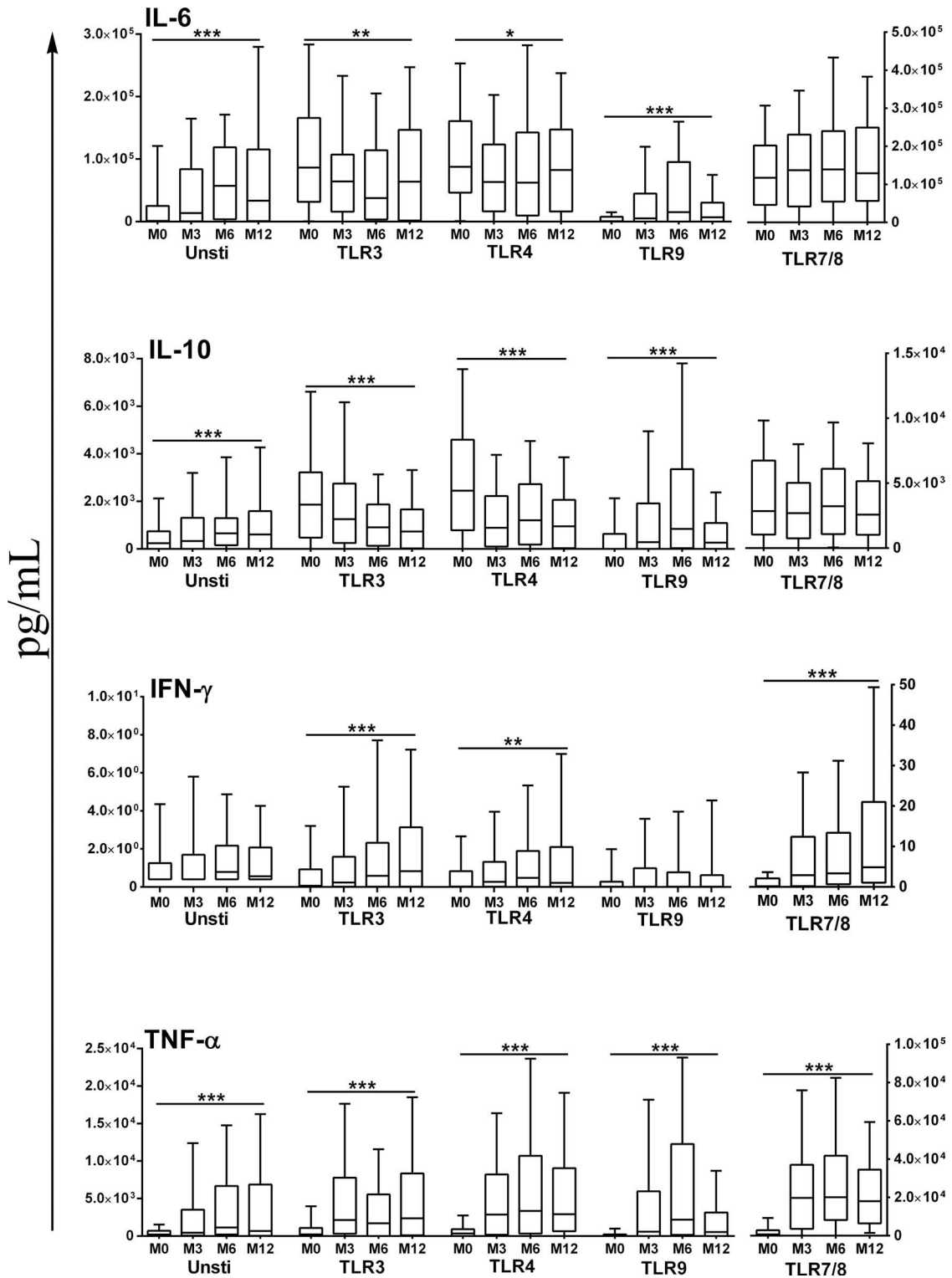
**TABLE 2** Univariate analysis of spontaneous and TLR agonist-mediated cytokine responses in cord/infant whole blood as a function of *P. falciparum* infection detected either in the mother at delivery or during infancy<sup>a</sup>

Cytokine and <i>P. falciparum</i> infection <sup>b</sup>	TLR3		TLR4		TLR7/8		TLR9		Unstimulated	
	Coefficient (SD)	<i>P</i>	Coefficient (SD)	<i>P</i>	Coefficient (SD)	<i>P</i>	Coefficient (SD)	<i>P</i>	Coefficient (SD)	<i>P</i>
<b>IL-6</b>										
Mother (at delivery)	39,697 (18,685)	0.02	23,266 (17,497)	0.04	15,335 (22,503)	NS	-8,615 (9,930)	NS	-0.2 (0.4)	NS
<b>Infant</b>										
M0-M3	-7,969 (35,165)	NS	-18,425 (32,309)	NS	64,449 (40,690)	0.06	-16,961 (17,797)	NS	-0.7 (0.8)	NS
M4-M6	-13,092 (26,431)	NS	-31,224 (24,277)	0.07	-34,977 (30,934)	NS	-9,364 (13,902)	NS	-0.3 (0.6)	NS
M7-M12	-15,297 (17,943)	NS	-1,602 (16,736)	NS	-8,256 (21,346)	NS	-11,586 (9,569)	NS	-0.2 (0.4)	NS
<b>IL-10</b>										
Mother (at delivery)	623 (283)	<0.01	325 (274)	NS	-191 (520)	NS	98 (278)	0.02	0.1 (0.4)	NS
<b>Infant</b>										
M0-M3	136 (534)	NS	-438 (499)	NS	64 (948)	0.06	-759 (497)	0.05	-0.1 (0.8)	NS
M4-M6	191 (402)	NS	31 (379)	NS	596 (715)	NS	-301 (389)	NS	0.5 (0.6)	NS
M7-M12	300 (272)	NS	297 (261)	NS	1,133 (483)	0.03	159 (267)	NS	-0.4 (0.4)	NS
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>										
Mother (at delivery)	1,772 (941)	<0.01	2,005 (1,207)	0.06	4,023 (2,807)	0.08	-334 (921)	NS	0.1 (0.4)	NS
<b>Infant</b>										
M0-M3	1,747 (1,741)	NS	-1,347 (2,202)	NS	992 (5,080)	NS	-1,016 (1,652)	NS	-0.3 (0.7)	NS
M4-M6	-298 (1,312)	NS	-1,194 (1,671)	NS	-3,363 (3,854)	NS	-1,777 (1,288)	NS	0.5 (0.5)	NS
M7-M12	535 (891)	NS	1,268 (1,151)	0.09	1,739 (2,666)	NS	1,029 (885)	0.08	0.2 (0.4)	NS

<sup>a</sup> Positive/negative coefficients indicate cytokine concentrations above/below control (uninfected) levels. SD, standard deviation; NS, not significant.

<sup>b</sup> "Mother (at delivery)" denotes the influence of infection at delivery or in the time period ≤10 days prior to delivery on neonatal/infant cytokine responses in the first 12 months of life. "Infant" denotes the influence of infection during different periods of early life on spontaneous or TLR stimulation-mediated cytokine responses over the whole 12-month period. M0, cord blood; M3, M6, M12, blood drawn at 3, 6, 12 months of age, respectively.





**FIG 1** Spontaneous and TLR agonist-mediated cytokine production in neonatal/infant whole blood. In each case, agonist-mediated responses presented are those following subtraction of the corresponding cytokine concentrations in supernatants of unstimulated cells. Box plots illustrate medians with 25th and 75th percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles. M0, cord blood; M3, M6, M12, peripheral venous blood at 3, 6, 12 months of age, respectively; Unsti, unstimulated samples. The statistical significance of differences in cytokine activity detected at different ages was determined using the nonparametric Kruskal-Wallis test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

**TABLE 3** Multivariate (LMM) analyses of alterations in spontaneous and TLR-mediated cytokine responses in whole blood as a function of infants' age and of maternal *P. falciparum* infection at delivery<sup>a</sup>

Cytokine and <i>P. falciparum</i> infection	TLR3		TLR4		TLR7/8		TLR9		Unstimulated	
	Regression coefficient (SD)	<i>P</i>	Regression coefficient (SD)	<i>P</i>	Regression coefficient (SD)	<i>P</i>	Regression coefficient (SD)	<i>P</i>	Regression coefficient (SD)	<i>P</i>
<b>IL-6</b>										
Infant age (mo)										
3	-31,335 (15,138)	<0.05	-1.32 (0.76)	<0.05	14,919 (22,093)	NS	1.79 (0.69)	<0.01	2.00 (0.54)	<0.01
6	-38,365 (15,232)	<0.05	-2.33 (0.77)	<0.01	31,892 (21,825)	NS	2.84 (0.70)	<0.01	3.16 (0.54)	<0.01
12	-7,910 (14,822)	NS	-1.60 (0.75)	<0.05	34,536 (21,579)	NS	1.38 (0.68)	<0.05	2.00 (0.53)	<0.01
Mother at delivery and:										
M0	75,243 (27,539)	<0.05	1.25 (0.99)	NS	-6,932 (36,838)	NS	1.03 (1.03)	NS	0.11 (0.81)	NS
M3	58,659 (28,714)	<0.05	-0.75 (1.15)	NS	9,411 (38,250)	NS	0.10 (1.07)	NS	-0.66 (0.85)	NS
M6	33,481 (28,406)	NS	0.98 (1.19)	NS	40,462 (37,592)	NS	-1.83 (1.07)	NS	-1.19 (0.83)	0.05
M12	8,772 (27,539)	NS	0.64 (1.19)	NS	-16,047 (36,470)	NS	0.63 (1.02)	NS	0.82 (0.84)	NS
<b>IL-10</b>										
Infant age (mo)										
3	-547 (268)	<0.05	-2.05 (0.67)	<0.01	-1,428 (518)	<0.05	2.04 (0.67)	<0.01	0.62 (0.40)	NS
6	-1,064 (269)	<0.01	-1.48 (0.67)	<0.05	-664 (512)	NS	3.44 (0.67)	<0.01	1.81 (0.40)	<0.01
12	-1,217 (262)	<0.01	-2.34 (0.66)	<0.01	-1,197 (506)	<0.05	0.94 (0.66)	NS	1.04 (0.40)	<0.05
Mother at delivery and:										
M0	652 (454)	NS	-0.84 (1.01)	NS	-772 (858)	NS	0.85 (1.00)	NS	1.01 (0.69)	0.05
M3	1,300 (476)	<0.05	1.84 (1.05)	NS	462 (891)	NS	0.24 (1.03)	NS	-0.10 (0.72)	NS
M6	328 (470)	NS	0.22 (1.05)	NS	56 (876)	NS	-0.29 (1.03)	NS	-0.65 (0.70)	NS
M12	411 (454)	NS	0.89 (1.01)	NS	-337 (850)	NS	2.11 (0.98)	<0.05	0.69 (0.71)	NS
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>										
Infant age (mo)										
3	4,529 (1,129)	<0.01	2.15 (0.76)	<0.05	21,850 (3,398)	<0.01	3.62 (0.64)	<0.01	1.99 (0.46)	<0.01
6	2,254 (1,135)	<0.05	2.70 (0.76)	<0.01	21,817 (3,361)	<0.01	5.07 (0.64)	<0.01	2.83 (0.46)	<0.01
12	5,171 (1,107)	<0.01	2.32 (0.74)	<0.01	23,242 (3,327)	<0.01	2.42 (0.62)	<0.01	1.81 (0.45)	<0.01
Mother at delivery and:										
M0	7.4 (1,827.3)	NS	0.38 (1.14)	NS	92 (5,147)	NS	-0.79 (0.95)	NS	1.12 (0.74)	0.05
M3	1,004 (1,918)	NS	0.99 (1.18)	NS	-1,908 (5,360)	NS	-0.56 (0.98)	NS	-0.71 (0.78)	NS
M6	5,238 (1,894)	<0.05	0.45 (1.18)	NS	15,856 (5,262)	<0.01	-2.10 (0.98)	<0.05	-0.36 (0.76)	NS
M12	491 (1,827)	NS	1.36 (1.14)	NS	-679 (5,092)	NS	2.85 (0.93)	<0.05	0.77 (0.77)	NS

<sup>a</sup> The reference values used for comparison are those recorded in cord blood (M0). "Mother at delivery" denotes the influence of infection at delivery or in the time period of  $\leq 10$  days prior to delivery on neonatal/infant responses measured at designated time points. M0, cord blood; M3, M6, M12, blood drawn at 3, 6, 12 months of age, respectively. Positive/negative coefficients indicate cytokine concentrations above/below control (uninfected) levels. SD, standard deviation.

plateau levels at 3 to 6 months of age ( $P < 0.001$  by Kruskal-Wallis; Fig. 1). In all cases, TLR9 agonist-mediated cytokine responses in cord blood were low but subsequently increased with age, with significantly enhanced production of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$  by Kruskal-Wallis; Fig. 1).

In multivariate analyses that adjusted for potential confounders (maternal anemia, premature birth, mother/infant infection), the various profiles of age dependency of TLR agonist-mediated cytokine responses described above were confirmed (Table 3).

**Maternal *P. falciparum* infection at delivery affects the profile of TLR agonist-mediated cytokine responses in infants.** We next examined whether *P. falciparum* infection during pregnancy influenced TLR-mediated cytokine responses in the offspring using segregation into 3 gestational age-related intervals: (i) infection before the third trimester of pregnancy, (ii) infection during the third trimester of pregnancy but more than 10 days before delivery, and (iii) infection from 10 days before delivery up to delivery.

Univariate analyses revealed no differences in spontaneous cytokine release by cells from infants born to mothers with different infection histories (Table 2) but did show that TLR ligand-mediated cytokine release by infants' cells was modulated by maternal infection occurring either during the 3rd trimester or close to/at delivery. The changes related to infection close to/at delivery concerned significantly increased production of (i) IL-6, IL-10, and

TNF- $\alpha$  upon TLR3 stimulation, (ii) IL-6 upon TLR4 stimulation, and (iii) IL-10 upon TLR9 stimulation, in comparison with cells of children born to mothers who were uninfected at delivery (Table 2). There were also associations of borderline significance between infections late in pregnancy and increased TNF- $\alpha$  production upon TLR4 and TLR7/8 stimulation (Table 2), as well as between infections earlier during the 3rd trimester and decreased IL-10 production following TLR4, TLR7/8, and TLR9 stimulation (data not shown). The concentration of IFN- $\gamma$  in supernatants of cells stimulated with TLR3, TLR4, and TLR9 agonists were too low to identify differences in secretion of this cytokine, while no differences were observed in infants' TLR7/8-induced production of IFN- $\gamma$  when segregated according to maternal infection history (data not shown).

The multivariate analyses of infants' TLR-mediated cytokine secretion as a function of maternal infection history were designed to evaluate whether maternal infection affected either spontaneous or TLR-mediated cytokine responses in infancy while adjusting for potential confounding covariables identified in the univariate analyses, i.e., maternal anemia, premature birth, and age of the infant. Using the profiles obtained from those born to uninfected mothers as reference values, the associations that remained significant following these multivariate analyses concerned only infections occurring close to/at delivery and not those earlier in pregnancy. In terms of spontaneous release of cyto-

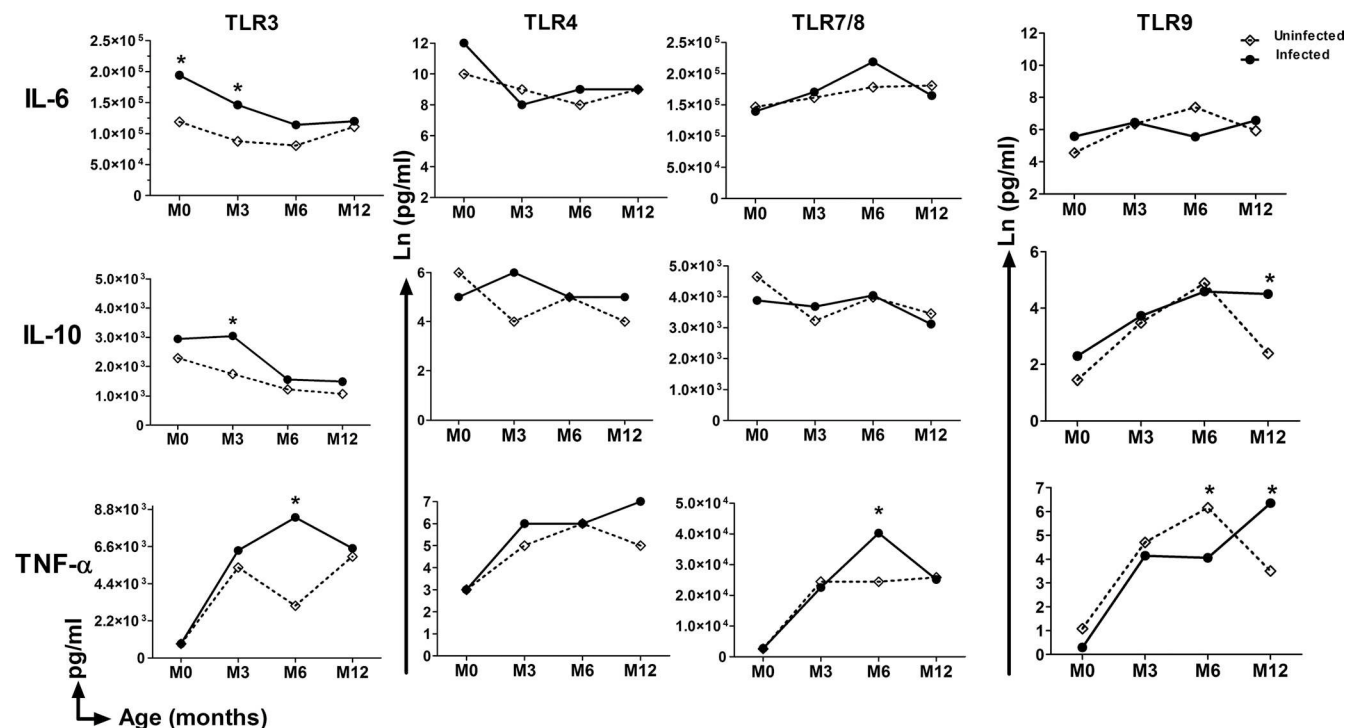


FIG 2 GLMM-based predictive profiles of TLR agonist-mediated cytokine production by neonatal/infant whole blood as a function of the presence or absence of PAM at delivery. M0, cord blood; M3, M6, M12, peripheral venous blood at 3, 6, 12 months of age, respectively. The statistical significance of differences was determined using the GLMM model. \*,  $P < 0.05$ .

kines, the production of both IL-10 and TNF- $\alpha$  was enhanced in cord blood, while that of IL-6 was reduced at 6 months of age (Table 3). In the context of TLR3 stimulation, the association between maternal infection at delivery and significantly enhanced production of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  found in univariate analyses remained, with higher production (i) of IL-6 at birth and at 3 months, (ii) of IL-10 at 3 months, and (iii) of TNF- $\alpha$  at 6 months of age than that in babies born to mothers who were uninfected at delivery (Table 3). Similarly, for TLR7/8 stimulation, the association between maternal infection at delivery and significantly enhanced production of TNF- $\alpha$  (at 6 months of age) remained, as did the association for increased TLR9 agonist-mediated IL-10 production, at 12 months of age, in parallel with increased TNF- $\alpha$  (Table 3), although production of the latter cytokine was significantly lower in infants 6 months of age. In marked contrast to the altered responses to TLR3, -7/8, and -9 stimulation, multivariate analyses revealed no significant differences in TLR4-mediated cytokine responses of infants when segregated according to maternal infection history.

A graphical depiction of the multivariate model-derived predicted, i.e., coefficient-derived TLR-mediated cytokine responses of infants as a function maternal infection close to/at delivery is shown in Fig. 2. The overall picture this gives is one of maternal infection-related enhancement of TLR3-mediated production of both IL-6 and IL-10 at birth and at 3 months of age and enhancement of TLR3-, TLR7/8-, and TLR9-mediated TNF- $\alpha$  and IL-10 production at 6 or 12 months of age.

**TLR-mediated cytokine production in cord blood as a predictor of *P. falciparum* infection in infants.** We next wished to

ascertain whether the TLR-mediated cord blood cell cytokine responses shown to be altered or not as a result of maternal infection were predictive of *P. falciparum* infections during infancy. Univariate analyses showed that high IL-10 production, following stimulation of TLR3, TLR4, or TLR7/8 in cord blood, as well as high TNF- $\alpha$  production following TLR7/8 stimulation, was associated with an increased risk of malaria during the first year of life (Table 4). Multivariate analyses confirmed the independent associations for an increased risk of *P. falciparum* infection in infancy with high TLR3- and TLR7/8-mediated cord blood cell IL-10 production (Table 4).

***P. falciparum* infection in infants influences TLR agonist-mediated cytokine response profiles.** Infants' innate immune responses, while having been "conditioned" *in utero* as a result of maternal *P. falciparum* infection, will also be potentially altered by *P. falciparum* when the infant itself is infected. Our next step was therefore to incorporate the prospectively collected data on *P. falciparum* infections in the first year of life into the multivariate model of TLR-mediated cytokine responses. In order to control for the possible influence of passively acquired (maternal antibody-mediated) antiparasit immunity, infection and/or malaria episodes in infants were segregated into three different time periods for the assessments of independent associations with either spontaneous or TLR agonist-mediated cytokine responses. Regardless of age, infection arising during infancy had no observable effect on spontaneous cytokine release (Table 2), but univariate analyses did show significantly increased TLR7/8-mediated IL-10 production as a function of infection after 6 months of age and significantly decreased TLR9-mediated IL-10 production related to infection between birth and 3 months of age (Table 2).

**TABLE 4** Prospective assessment of the predictive value of TLR agonist-mediated cytokine production in cord blood for infection with *P. falciparum* in the first year of life<sup>c</sup>

TLR	Cytokine	OR <sup>b</sup>	Univariate		Adjusted OR <sup>b</sup>	Multivariate <sup>a</sup>	
			CI 95%	P value		CI 95%	P value
TLR3	IL-6	1.17	0.97–1.42	0.09	1.07	0.88–1.30	0.50
	IL-10	1.24	1.03–1.49	0.02	1.22	1.00–1.50	0.05
	TNF- $\alpha$	1.04	0.94–1.16	0.44	0.98	0.88–1.09	0.75
TLR4	IL-6	1.23	0.96–1.59	0.09	1.12	0.84–1.48	0.43
	IL-10	1.24	1.01–1.54	0.04	1.19	0.93–1.54	0.16
	TNF- $\alpha$	1.00	0.90–1.12	0.93	0.95	0.85–1.06	0.37
TLR7/8	IL-6	1.13	0.95–1.35	0.15	0.94	0.79–1.12	0.46
	IL-10	1.40	1.06–1.86	0.01	1.38	1.00–1.90	0.04
	TNF- $\alpha$	1.18	1.03–1.35	0.01	1.11	0.97–1.27	0.11
TLR9	IL-6	1.00	0.89–1.12	0.95	0.94	0.80–1.11	0.48
	IL-10	1.02	0.90–1.14	0.80	0.96	0.82–1.14	0.66
	TNF- $\alpha$	1.10	0.97–1.24	0.12	1.17	0.99–1.38	0.06

<sup>a</sup> Adjusted on *P. falciparum* infection history of mother and gravidity and infant age and low birth weight.

<sup>b</sup> Relative risk of *P. falciparum* infection in the infant as a function of a log-fold increase in the cord blood TLR-mediated cytokine response.

<sup>c</sup> The concentration of IFN- $\gamma$  in supernatants of cells stimulated with TLR agonists was too low to allow appropriate analyses.

Multivariate analyses confirmed both those associations, while also revealing independent associations with infection between birth and 3 months of age for increased TLR7/8-mediated IL-6 production and for decreased TLR9-mediated TNF- $\alpha$  production (data not shown).

**Influence of maternal anemia and gravidity and baby gender and prematurity on the profile of TLR-mediated cytokine responses over time.** In univariate analyses, maternal anemia at delivery was associated with increased spontaneous release of IL-6 and with decreased spontaneous release of TNF- $\alpha$  (both with *P* values of <0.05) but not with any change in TLR-mediated cytokine production (data not shown). In multivariate analyses, neither of the associations with anemia remained. In univariate analyses, no cytokine production of any type was affected either by gravidity status (primi- versus multigravid) or by the baby's gender (data not shown).

Univariate analyses of data from those born premature (delivery at <37 weeks) revealed significantly elevated levels of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  in response to TLR9 ligation (data not shown). Multivariate analyses confirmed the independent influence of being born premature on increased TLR9-mediated TNF- $\alpha$  production, increased TLR4-mediated IL-10 production, and increased TLR7/8-mediated IFN- $\gamma$  production compared to the production levels of full-term babies (*P* < 0.05; data not shown).

## DISCUSSION

The published evidence of *in utero* exposure to *P. falciparum* resulting in long-term changes to the immunological responses of infants is limited, to the best of our knowledge, to a single prospective birth cohort study that documented altered parasite antigen-specific responses that persisted through childhood (23). In parallel, epidemiological studies, including our own, have clearly documented the altered susceptibility of infants to *P. falciparum* infection or disease (11–16). It has not been documented whether

and how specific components of the innate immune system of such “tolerant” infants may contribute to their apparent inability to control the parasite. The study reported here is thus the first prospective birth cohort study to address this issue by investigating in detail the effect of both the presence and timing of maternal *P. falciparum* infection on an essential component of innate immunity in early life, namely, TLR-mediated cytokine responses.

The overall age-related patterns of cytokine responses to TLR ligands we observed here in infancy are consistent with those reported in the only study of its kind published to date, in sub-Saharan African (Gambian) infants, that used whole blood and a short-term (18- to 24-h) culture period, i.e., conditions almost identical to those we used (28). The principal similarities include the presence of robust IL-6 and IL-10 responses at birth and of proinflammatory TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  responses that increased markedly from birth through the first 3 months of life. In contrast to the Gambian study, we did not detect appreciable TLR7/8-mediated production of IFN- $\gamma$  at birth. This difference most likely relates to the fact that we used just a single dual TLR7/8 agonist (R848) compared to the panel of 3 different agonists used in the Gambian study that allowed the identification of fine differences in TLR7- and TLR8-mediated activity, differences our study could not distinguish. Also, in the same context of TLR7/8-mediated activity, we did not find the same dramatic age-related increase in the amounts of IFN- $\gamma$  produced, again a difference that may be explained by the choice of agonist. Nevertheless, and as seen both in Caucasian (47, 48) and Gambian infants (28), we did find that R848 was the agonist that consistently induced the strongest pro- and anti-inflammatory cytokine responses in Beninese infants, while responses induced by the TLR9 agonist were relatively weak. Cytokine production in response to the TLR9 agonist nevertheless increased from birth up to 6 months of age, a pattern not seen in the comparable studies of European or African infants (28, 49). These disparate findings may be explained (i) by the comparatively broad target populations of R848 that can stimulate pDC, mDC, monocytes, and B cells (50) and (ii) by the TLR9 ligand we used (ODN CpG 2216) that exerts selective activity only on pDC (46) as opposed to on both pDC and B cells (28, 49). Our data also confirm published observations of a decrease in the production of IL-10 in response to TLR4 agonists postnatally (29).

In the context of the principal focus of our study, i.e., maternal infection-related changes to neonatal/infant TLR-mediated responses, the most notable finding is that exposure to *P. falciparum in utero* just prior to or at delivery significantly modulated infants' subsequent cytokine responses arising specifically from ligation of the endosomally expressed TLR3, -7/8, and -9, whereas responses arising from ligation of the surface-expressed TLR4 were unaffected. All of the observed changes involved increased production, either early or late in the first year of life, of both proinflammatory (IL-6, TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. The same exposure *in utero* also led to significantly increased spontaneous secretion of both TNF- $\alpha$  and IL-10 by cord blood cells but reduced IL-6 secretion by 6-month-old infants' cells. As has been noted by others (51), the relative predominance of the Th17 cell-promoting cytokine IL-6 along with IL-10 in infants' TLR-mediated cytokine repertoire almost certainly contributes to the well-documented deficiency in Th1 cell-type (IFN- $\gamma$ -led) responses (25). The latter are responses that are commonly considered to be an essential component of antimalarial immunity (52). Thus, maternal infection and consequent fetal exposures that reinforce



TLR-mediated IL-6 and IL-10 responses in early life, rather than inducing a switch to a “mature” Th1 type of cytokine response, could quite plausibly be implicated in enhancing infants’ susceptibility to *P. falciparum* infection. That enhanced IL-6 activity may indeed have such effects is supported by the fact that (i) *P. falciparum*-induced IL-6 is known to be associated with susceptibility to malaria in children (53) and (ii) several studies have reported the circulating concentration of IL-6 to be significantly higher in children with severe or uncomplicated malaria than in healthy controls (54). The results of the prospective assessment of cord blood cells’ TLR-mediated cytokine profiles we conducted here provide support for a similarly detrimental effect of IL-10 (Table 4).

Three recent studies have substantially expanded the knowledge of the interactions between *P. falciparum* and TLR. All revealed that, somewhat unexpectedly, exposure to the parasite *in vivo* or *in vitro* leads to a form of proinflammatory priming of TLR-mediated responses, although, notably in the context of the findings we report here, no significant change in parasite-induced TLR3-mediated cytokine responses was found (34, 35, 55). Paradoxically, in this context, our data clearly identify enhanced TLR3-mediated cytokine responses in early life as one of the major modified outcomes of exposure to *P. falciparum* *in utero*. Current knowledge nevertheless gives no indication of a parasite-derived TLR3-specific ligand that may be at the origin of this effect (56, 57). These findings are particularly striking, because the significantly increased TLR3-mediated IL-6 and IL-10 production by exposed infants’ cells at birth and/or at 3 months of age runs exactly counter to the significant age-related decline in production of these same two cytokines occurring over precisely the same time period (Fig. 1). We also observed significantly increased TLR3-mediated TNF- $\alpha$  production by “exposed” 6-month-old infants’ cells, but this, in contrast to IL-6 and IL-10, is on a background of an increasing age-related production profile. Pertinent perhaps here is the fact that TLR3, among the panel of TLR that we investigated, is the only one expressed within T lymphocyte populations as well as in a prominent APC population (mDC), possibly implicating maternal infection-induced upregulation of TLR3 expression by fetal T cells. Further, we employed a TLR3 ligand, poly(I-C), that is also known to stimulate non-TLR pattern recognition receptors in mDC (39). We did not detect the pattern of TLR3/4-mediated reduced TNF- $\alpha$  and enhanced IFN- $\gamma$  production by cord blood cells associated with placental infection at delivery reported in a Gabonese study by Adegnika and colleagues (33). Although the agonists used were the same in both studies, the substantially different culture conditions used (purified cord mononuclear cells cultured for 3 days versus whole blood for 24 h) possibly explain the different outcomes.

Our findings relating to infants’ TLR7/8-mediated cytokine responses, although comparatively less pronounced in scope, echo those for TLR3 in the sense that, here again, none of the relevant published studies have thus far identified a *P. falciparum*-derived ligand for either TLR7 or -8. Despite this, maternal infection at delivery was associated with enhanced TLR7/8-mediated TNF- $\alpha$  responses in 6-month-old infants, as was also the case for TLR3. In the case of TLR9, for which there is a recognized parasite-derived ligand (57), the enhancing effects of maternal infection on cytokine responses in early life were even more prolonged, with significantly stronger IL-10 and TNF- $\alpha$  production apparent in 12-month-old infants.

The fact that only maternal *P. falciparum* infections occurring

close to or at delivery affected the innate immune responses we measured, while infections during the second or third trimester of pregnancy appeared to have no such influence, is intriguing for two main reasons. First, in cord blood innate immune ( $\gamma\delta$ ) T lymphocyte subsets, we have previously documented distinct “activated” phenotypes *ex vivo* associated with maternal infections that were successfully treated earlier in pregnancy but not with infections detected at delivery (58). These findings suggest that different components of the fetal innate immune response may be affected differently according to the timing, type, or duration of exposure to parasite-derived molecules. Second, our data imply that plasmodial infections acquired by mothers very late in pregnancy can have sustained effects on infants’ innate immune responses, raising the question of the possible implication of such changes in the increased frequency of nonplasmodial febrile illnesses with which such infants present (16).

Two other aspects of our results also deserve mention. First, we identified the impacts of *P. falciparum* infections occurring early (0 to 3 months of age) or late (6 to 12 months of age) during infancy that included, respectively, enhanced IL-6 or enhanced IL-10 responses after TLR7/8 ligation but, for infections occurring early in infancy, reduced IL-10 and TNF- $\alpha$  responses after TLR9 ligation. Inappropriately elevated IL-10 activity may contribute to sustaining infants’ susceptibility to infection by suppressing Th1-type responses, and, similarly, impaired responses to TLR9 activation may lead to increased susceptibility to pathogens that bind TLR9, such as DNA viruses (59–62). Second, we observed for the first time that premature newborns, upon TLR4 stimulation, produced more IL-10 and, upon TLR7/8 or TLR9 stimulation, produced more IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ . These data suggest upregulation of the MyD88-dependent pathway in preterm infants, which contrasts with previous findings in a non-African population (63).

In conclusion, we report the first prospective study to examine the influence of pregnancy-associated malaria on the maturation of TLR responses in infants. Notably, our results show the profound effects of maternal infection close to or at delivery on an infant’s innate immune responses and indicate that some of the immunological consequences of PAM we measured here are long-lasting. Further studies are needed to better define the consequences of the increased production of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 on adaptive T cell-mediated immunity and of the suppressive cytokine IL-10 on the development of regulatory T cells during the first year of life. In this same STOPPAM study, we have found that the frequency of circulating Treg during infancy of those born to mothers with placental infection at delivery is consistently higher than in infants born to uninfected mothers (N. Fievet, O. Nouatin, and S. Ibitokou, unpublished observations), suggesting but not proving causality *vis-à-vis* enhanced susceptibility to *P. falciparum* infection. How specific cells and the cytokines they produce in early life may also separately influence infants’ responses to routine infant and/or candidate malaria vaccines is an area that needs to be urgently addressed.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all women who participated in the study. We thank all the field and administration staffs of Akodeha, Comé Central, and Ouedémé Pedah health centers for their contribution. We particularly thank Jacqueline Affedjou, Jean-Claude Sagbo, Bernadette Gandounou, Gildas Gbaguidi, and all field staff members at the STOPPAM site for their hard work. We thank Bich-Tram Huynh, Sebastien Dechavanne, and

Valérie Briand for database management and Carine Agbowai, Aurax Fernando, Charles Ahouansou, Pépin Kounou, Honoré Kounou, and Darius Sossou for their lab contribution.

This paper describes work undertaken in the context of the STOPPAM project ([www.stoppam.org](http://www.stoppam.org)), a small- and medium-scale collaborative project supported by the European 7th Framework Programme under contract number 200889. This work was also supported by the Ministère des Affaires Étrangères of France (project reference no. 2006-22), SIDA/SAREC (Swedish International Development Cooperation Agency; grant to S.V.), and the Institut de Recherche pour le Développement, which contributed to the study financially and with research material. Financial support was also provided by the AIRD-DPF to S.I. (Ph.D. research scholarship).

K.G., S.V., S.I., A.M., P.D., M.T.-B., N.F., and A.J.F.L. conceived, designed, and coordinated the study. K.G., S.I., S.E., and O.N. participated in the sample collection and processing. K.G., S.I., S.V., N.F., and A.J.F.L. designed and supervised the immunoassays. P.H. and G.C. performed statistical analysis. K.G., S.I., O.N., S.E., and A.A. carried out the immunoassays. K.G., S.I., N.F., and S.V. drafted the first version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

- Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, Levy J, Marchant A. 2012. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect. Dis.* 12:330–340.
- Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. 2009. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e442. doi:10.1371/journal.pntd.0000442.
- Cuna WR, Choque AG, Passera R, Rodriguez C. 2009. Proinflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns. *J. Parasitol.* 95:891–894.
- Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, Alonso-Vega C, Carlier Y. 2000. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 68:5430–5434.
- Kurtis JD, Higashi A, Wu HW, Gundogan F, McDonald EA, Sharma S, PondTor S, Jarilla B, Sagliba MJ, Gonzal A, Olveda R, Acosta L, Friedman JF. 2011. Maternal *Schistosomiasis japonica* is associated with maternal, placental, and fetal inflammation. *Infect. Immun.* 79:1254–1261.
- Brabin BJ, Kalanda BF, Verhoeff FH, Chimsuku LH, Broadhead RL. 2004. Risk factors for fetal anaemia in a malarious area of Malawi. *Ann. Trop. Paediatr.* 24:311–321.
- Cot M, Deloron P. 2003. Malaria prevention strategies. *Brit. Med. Bull.* 67:137–148.
- Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. 2010. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med.* 7:e1000221. doi:10.1371/journal.pmed.1000221.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoia K, Brabin B, Newman RD. 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect. Dis.* 7:93–104.
- Rogerson SJ, Boeuf P. 2007. New approaches to pathogenesis of malaria in pregnancy. *Parasitology* 134:1883–1893.
- Bardaji A, Sigauque B, Sanz S, Maixenchs M, Ordi J, Aponte JJ, Mabunda S, Alonso PL, Menendez C. 2011. Impact of malaria at the end of pregnancy on infant mortality and morbidity. *J. Infect. Dis.* 203:691–699.
- Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyeme M, Boudin C, Deloron P. 1997. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am. J. Epidemiol.* 146:826–831.
- Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouedraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, Rachas A, Bouscaillou J, Bouraima A, Massougboji A, Fayomi B, Thiebaut A, Chandre F, Migot-Nabias F, Martin-Prevel Y, Garcia A, Cot M. 2011. Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and environmental factors. *PLoS One* 6:e27516. doi:10.1371/journal.pone.0027516.
- Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, Duffy PE. 2005. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med.* 2:e407. doi:10.1371/journal.pmed.0020407.
- Schwarz NG, Adegnik AA, Breitling LP, Gabor J, Agnandji ST, Newman RD, Lell B, Issifou S, Yazdanbakhsh M, Luty AJ, Kremsner PG, Grobusch MP. 2008. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. *Clin. Infect. Dis.* 47:1017–1025.
- Rachas A, Le Port A, Cottrell G, Guerra J, Choudat I, Bouscaillou J, Massougboji A, Garcia A. 2012. Placental malaria is associated with increased risk of nonmalaria infection during the first 18 months of life in a Beninese population. *Clin. Infect. Dis.* 55:672–678.
- Broen K, Brustoski K, Engelmann I, Luty AJ. 2007. Placental *Plasmodium falciparum* infection: causes and consequences of *in utero* sensitization to parasite antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151:1–8.
- Bisseye C, van der Sande M, Morgan WD, Holder AA, Pinder M, Ismaili J. 2009. *Plasmodium falciparum* infection of the placenta impacts on the T helper type 1 (Th1)/Th2 balance of neonatal T cells through CD4(+)CD25(+) forkhead box P3(+) regulatory T cells and interleukin-10. *Clin. Exp. Immunol.* 158:287–293.
- Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, Luty AJ. 2006. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J. Infect. Dis.* 193:146–154.
- Brustoski K, Moller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, Bongartz M, Kremsner PG, Luty AJ, Krzych U. 2005. IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Immunol.* 174:1738–1745.
- Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, Townend J, Miles DJ, van der Sande M, Whittle H, Rowland-Jones S. 2010. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur. J. Immunol.* 40:1062–1072.
- Mackroth MS, Malhotra I, Mungai P, Koech D, Muchiri E, King CL. 2011. Human cord blood CD4+CD25hi regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to *Plasmodium falciparum* antigens. *J. Immunol.* 186:2780–2791.
- Malhotra I, Dent Mungai AP, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, Muchiri E, Tisch DJ, King CL. 2009. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med.* 6:e1000116. doi:10.1371/journal.pmed.1000116.
- Mazzoni A, Segal DM. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* 75:721–730.
- Levy O. 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. Rev. Immunol.* 7:379–390.
- Marshak-Rothstein A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6:823–835.
- Zhang X, Deriaud E, Jiao X, Braun D, Leclerc C, Lo-Man R. 2007. Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* 204:1107–1118.
- Burl S, Townend J, Njie-Jobe J, Cox M, Adetifa UJ, Touray E, Philbin VJ, Mancuso C, Kampmann B, Whittle H, Jaye A, Flanagan KL, Levy O. 2011. Age-dependent maturation of Toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants. *PLoS One* 6:e18185. doi:10.1371/journal.pone.0018185.
- Corbett NP, Blimkie D, Ho KC, Cai B, Sutherland DP, Kallos A, Crabtree J, Rein-Weston A, Lavoie PM, Turvey SE, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB, Hajjar AM, Fortunato ES, III, Kollmann TR. 2010. Ontogeny of Toll-like receptor mediated cytokine responses of human blood mononuclear cells. *PLoS One* 5:e15041. doi:10.1371/journal.pone.0015041.
- Lisciandro JG, Prescott SL, Nadal-Sims MG, Devitt CJ, Pomat W, Siba PM, Tulic MC, Holt PG, Strickland D, van den Biggelaar AH. 2012. Ontogeny of Toll-like and NOD-like receptor-mediated innate immune responses in Papua New Guinean infants. *PLoS One* 7:e36793. doi:10.1371/journal.pone.0036793.
- Breitling LP, Fendel R, Mordmueller B, Adegnik AA, Kremsner PG, Luty AJ. 2006. Cord blood dendritic cell subsets in African newborns exposed to *Plasmodium falciparum in utero*. *Infect. Immun.* 74:5725–5729.
- Fievet N, Varani S, Ibitokou S, Briand V, Louis S, Perrin RX, Massougboji A, Hosmalin A, Troye-Blomberg M, Deloron P. 2009. *Plasmodium*

- falciparum* exposure *in utero*, maternal age and parity influence the innate activation of foetal antigen presenting cells. *Malar. J.* 8:251.
33. Adegnik AA, Kohler C, Agnandji ST, Chai SK, Labuda L, Breitling LP, Schonkeren D, Weerdenburg E, Issifou S, Luty AJ, Kreamsner PG, Yazdanbakhsh M. 2008. Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood. *J. Infect. Dis.* 198:928–936.
  34. Franklin BS, Parroche P, Ataide MA, Lauw F, Ropert C, de Oliveira RB, Pereira D, Tada MS, Nogueira P, da Silva LH, Bjorkbacka H, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2009. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:5789–5794.
  35. McCall MB, Netea MG, Hermesen CC, Jansen T, Jacobs L, Golenbock D, van der Ven AJ, Sauerwein RW. 2007. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J. Immunol.* 179:162–171.
  36. Erdman LK, Finney CA, Liles WC, Kain KC. 2008. Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 162:105–111.
  37. Huynh BT, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guezo-Mevo B, Massougoudji A, Ndam NT, Deloron P, Cot M. 2011. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85:214–220.
  38. Kalilani L, Mofolo I, Chaponda M, Rogerson SJ, Meshnick SR. 2010. The effect of timing and frequency of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy on the risk of low birth weight and maternal anemia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104:416–422.
  39. Perrot I, Deauvieu F, Massacrier C, Hughes N, Garrone P, Durand I, Demaria O, Viaud N, Gauthier L, Blery M, Bonnefoy-Berard N, Morel Y, Tschopp J, Alexopoulou L, Trinchieri G, Paturel C, Caux C. 2010. TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J. Immunol.* 185:2080–2088.
  40. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31:3388–3393.
  41. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998–6004.
  42. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wylie DH, Dower SK, Segal DM. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166:249–255.
  43. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195:1507–1512.
  44. Cros J, Cagnard N, Woillard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshou D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. 2010. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375–386.
  45. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP. 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J. Immunol.* 174:1259–1268.
  46. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engemann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce large amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31:3026–3037.
  47. Levy O, Suter EE, Miller RL, Wessels MR. 2006. Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. *Blood* 108:1284–1290.
  48. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. 2004. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J. Immunol.* 173:4627–4634.
  49. Nguyen M, Leuridan E, Zhang T, De Wit D, Willems F, Van Damme P, Goldman M, Goriely S. 2010. Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. *PLoS One* 5:e10407. doi:10.1371/journal.pone.0010407.
  50. Desmet CJ, Ishii KJ. 2012. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* 12:479–491.
  51. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, Siegrist CA. 2011. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat. Immunol.* 12:189–194.
  52. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.* 9:725–732.
  53. Robinson LJ, D'Ombrain MC, Stanicic DI, Taraika J, Bernard N, Richards JS, Beeson JG, Tavul L, Michon P, Mueller I, Schofield L. 2009. Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical *Plasmodium falciparum* malaria in children from Papua New Guinea. *Infect. Immun.* 77:3033–3043.
  54. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK, Szein MB. 2004. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect. Immun.* 72:5630–5637.
  55. Hartgers FC, Obeng BB, Voskamp A, Larbi IA, Amoah AS, Luty AJ, Boakye D, Yazdanbakhsh M. 2008. Enhanced Toll-like receptor responsiveness associated with mitogen-activated protein kinase activation in *Plasmodium falciparum*-infected children. *Infect. Immun.* 76:5149–5157.
  56. Gowda DC. 2007. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* 23:596–604.
  57. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT. 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:1919–1924.
  58. Engelmann I, Santamaria A, Kreamsner PG, Luty AJ. 2005. Activation status of cord blood gamma delta T cells reflects *in utero* exposure to *Plasmodium falciparum* antigen. *J. Infect. Dis.* 191:1612–1622.
  59. Nordstrom I, Eriksson K. 2012. HHV-6B induces IFN-lambda1 responses in cord plasmacytoid dendritic cells through TLR9. *PLoS One* 7:e38683. doi:10.1371/journal.pone.0038683.
  60. Sorensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, Bartholdy C, Thomsen AR, Paludan SR. 2008. TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J. Immunol.* 181:8604–8612.
  61. Varani S, Cederarv M, Feld S, Tammik C, Frascaroli G, Landini MP, Soderberg-Naucler C. 2007. Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 179:7767–7776.
  62. West JA, Gregory SM, Sivaraman V, Su L, Damania B. 2011. Activation of plasmacytoid dendritic cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 85:895–904.
  63. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, Pollak A, Spittler A, Forster-Waldl E. 2007. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J. Infect. Dis.* 195:296–302.

## **ARTICLE 2: Infants' Peripheral Blood Lymphocyte composition reflects both maternal and post-natal infection with *Plasmodium falciparum***

Odilon Nouatin<sup>1,2</sup>✉, Komi Gbédandé<sup>1,2</sup>✉, Samad Ibitokou<sup>1,2</sup>, Bertin Vianou<sup>1,2</sup>, Parfait Hounbégnon<sup>1,2</sup>, Sem Ezinmegnon<sup>1,2</sup>, Sophie Borgella<sup>1,3</sup>, Carine Akplogan<sup>1,2</sup>, Gilles Cottrell<sup>3,4</sup>, Stefania Varani<sup>5</sup>, Achille Massougbodji<sup>1</sup>, Kabirou Moutairou<sup>2</sup>, Marita Troye-Blomberg<sup>6</sup>, Philippe Deloron<sup>3,4</sup>, Adrian J. F. Luty<sup>7</sup>‡, Nadine Fievet<sup>1,3,4</sup>‡\*

**Journal: PLoS One 2015; Volume: 10; DOI: 10.1371/journal.pone.0139606**

### **Présentation au congrès:**

- November 2012: **ASTMH 61st Annual Meeting, Atlanta, USA**. Posters
- October 2013: **MIM congress « Pan-African Malaria Conference » in Durban, South Africa. Oral**

Dans l'article précédent, nous avons montré que l'exposition *in utero* aux antigènes du paludisme serait associé à une altération des réponses TLR pendant la première année de vie des nouveau-nés. Aussi, l'exposition *in utero* pourrait induire un phénomène de tolérance immunologique ou d'anergie pendant la petite enfance. Les Treg jouent un rôle important pour le maintien l'homéostasie et le contrôle des réponses immunitaires contre les pathogènes [267, 268]. Ainsi les cellules Treg seraient nécessaires pendant la petite enfance pour le contrôle des réponses inflammatoires excessives. Ainsi nous avons caractérisé les différentes sous population lymphocytaire (Treg, T effecteurs, NKT) et les cellules NK chez les 222 nouveau-nés du projet STOPPAM.

L'immunophénotypage a été réalisé avec des anticorps monoclonaux et l'acquisition a été faite par cytométrie en flux. L'analyse des cellules Treg et des T effecteurs a été faite sur 158 enfants alors que celle des cellules NK et NKT porte sur 150 enfants. Les effectifs différents entre l'étude de l'immunité innée (article précédent) et l'étude de l'immunité adaptative (article décrit ici) s'expliquent par la quantité de sang collecté qui pouvait être insuffisante et nous avons donné la priorité à l'immunophénotypage des Treg par rapport aux autres tests.

En fonction de l'âge, nous avons observé une diminution de la fréquence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, des cellules NK et NKT d'une part et une augmentation de la fréquence des Treg et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de la naissance à 12 mois de vie indépendamment de l'infection palustre. L'infection palustre de la mère à l'accouchement (et pas avant) affecte

significativement le profil des cellules immunitaires du nouveau-né avec une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et Treg, ainsi qu'avec une diminution de la fréquence des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et NKT. A l'inverse des tendances observées avec l'infection maternelle, l'infection palustre durant l'enfance est associée à une fréquence élevée des cellules T CD4<sup>+</sup> et à une diminution des Treg et des cellules T CD8<sup>+</sup>.

En conclusion, l'infection palustre maternelle à l'accouchement affecterait la composition de la fréquence des différentes cellules immunitaires chez les nouveau-nés pendant la petite enfance. En relation avec l'article précédent, l'infection palustre à l'accouchement est associée à une fréquence élevée des Treg et aussi à une forte production de l'IL-10 chez les mêmes enfants à 3 mois de vie. Cela suggère la mise en place d'une tolérance immunitaire suite à une exposition *in utero* et aussi un contrôle ou une orientation des réponses immunitaires des nouveau-nés exposés *in utero* vis à vis du paludisme.



RESEARCH ARTICLE

# Infants' Peripheral Blood Lymphocyte Composition Reflects Both Maternal and Post-Natal Infection with *Plasmodium falciparum*

Odilon Nouatin<sup>1,2</sup>✉, Komi Gbédandé<sup>1,2</sup>✉, Samad Ibitokou<sup>1,2</sup>, Bertin Vianou<sup>1,2</sup>, Parfait Houngbégnon<sup>1,2</sup>, Sem Ezinmegnon<sup>1,2</sup>, Sophie Borgella<sup>1,3</sup>, Carine Akplogan<sup>1,2</sup>, Gilles Cottrell<sup>1,3,4</sup>, Stefania Varani<sup>5</sup>, Achille Massougbodji<sup>1</sup>, Kabirou Moutairou<sup>2</sup>, Marita Troye-Blomberg<sup>6</sup>, Philippe Deloron<sup>3,4</sup>, Adrian J. F. Luty<sup>7</sup>‡, Nadine Fievet<sup>1,3,4</sup>\*✉



**1** Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin, **2** Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin, **3** Institut de Recherche pour le Développement, MERIT UMR D216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Paris, France, **4** PRES Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris, France, **5** Unit of Microbiology, Department of Diagnostic, Experimental and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy, **6** Department of Molecular Biosciences, the Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm, Sweden, **7** Department of Medical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: IRD MERIT UMR D216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

‡ These authors also contributed equally to this work.

\* [fievet.nadine@ird.fr](mailto:fievet.nadine@ird.fr)

OPEN ACCESS

**Citation:** Nouatin O, Gbédandé K, Ibitokou S, Vianou B, Houngbégnon P, Ezinmegnon S, et al. (2015) Infants' Peripheral Blood Lymphocyte Composition Reflects Both Maternal and Post-Natal Infection with *Plasmodium falciparum*. PLoS ONE 10(11): e0139606. doi:10.1371/journal.pone.0139606

**Editor:** Georges Snounou, Université Pierre et Marie Curie, FRANCE

**Received:** April 22, 2015

**Accepted:** September 14, 2015

**Published:** November 18, 2015

**Copyright:** © 2015 Nouatin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Ethical approval of this study does not allow for public deposition of the individual-level data. Due to these ethical restrictions, the data are available upon request from the corresponding author pending ethical approval.

**Funding:** This paper describes work undertaken in the context of the STOPPAM project, 'Strategies To Prevent Pregnancy Associated Malaria' ([www.stopmam.org](http://www.stopmam.org)), a Small & Medium Scale Collaborative Project supported by the European 7th Framework Programme under contract number 200889. This work was also supported by the Ministère des

## Abstract

Maternal parasitoses modulate fetal immune development, manifesting as altered cellular immunological activity in cord blood that may be linked to enhanced susceptibility to infections in early life. *Plasmodium falciparum* typifies such infections, with distinct placental infection-related changes in cord blood exemplified by expanded populations of parasite antigen-specific regulatory T cells. Here we addressed whether such early-onset cellular immunological alterations persist through infancy. Specifically, in order to assess the potential impacts of *P. falciparum* infections either during pregnancy or during infancy, we quantified lymphocyte subsets in cord blood and in infants' peripheral blood during the first year of life. The principal age-related changes observed, independent of infection status, concerned decreases in the frequencies of CD4<sup>+</sup>, NK<sup>dim</sup> and NKT cells, whilst CD8<sup>+</sup>, Treg and Teff cells' frequencies increased from birth to 12 months of age. *P. falciparum* infections present at delivery, but not those earlier in gestation, were associated with increased frequencies of Treg and CD8<sup>+</sup> T cells but fewer CD4<sup>+</sup> and NKT cells during infancy, thus accentuating the observed age-related patterns. Overall, *P. falciparum* infections arising during infancy were associated with a reversal of the trends associated with maternal infection i.e. with more CD4<sup>+</sup> cells, with fewer Treg and CD8<sup>+</sup> cells. We conclude that maternal *P. falciparum* infection at delivery has significant and, in some cases, year-long effects on

Affaires Etrangères of France (project REFS No. 2006-22), the Institut de Recherche pour le Développement, which contributed to the study financially and with research material. Financial support was also provided by the AIRD-DPF to SI and KG (PhD research scholarship) and the French Embassy to KG (PhD research scholarship). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** ANV, antenatal visit; CERPAGE, research center for pregnancy associated malaria and children; HIV, human immunodeficiency virus; IRD, Research Institute for Development; LMM, linear mixed models; PAM, pregnancy associated malaria; *P. falciparum*, *Plasmodium falciparum*; RDT, rapid diagnostic test; STOPPAM, Strategies TO Prevent Pregnancy Associated Malaria; TBS, thick blood smear.

the composition of infants' peripheral blood lymphocyte populations. Those effects are superimposed on separate and independent age- as well as infant infection-related alterations that, respectively, either match or run counter to them.

## Introduction

Infectious diseases during pregnancy affect infants' responses to vaccination [1, 2] their susceptibility to postnatal infection [3] and their development of immunopathological disorders such as allergy [4]. These detrimental and long-lasting outcomes are the result of exposures *in utero* that alter foetal immune responses. Examples of diseases known to have such effects include the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, the cause of Chagas' disease, *Schistosoma* spp that cause bilharzia, and *Wuchereria bancrofti*, one of the species of nematode worm responsible for filariasis [5–8].

Malaria due to *P. falciparum* causes an estimated 584 000 deaths per year in African children and is also responsible for severe morbidity in pregnant women (WHO 2014). Sequestration and massive accumulation of infected erythrocytes in the placenta is the primary pathological phenomenon that characterizes pregnancy-associated malaria (PAM) [9]. PAM leads to a higher risk of maternal and foetal anemia, intra-uterine growth retardation, low birth weight and prematurity [10].

It is now well-established that *P. falciparum* infection of the mother during pregnancy will also impact subsequent weight and growth development in early life [11, 12]. PAM also influences susceptibility to malaria [13, 14] and to other infections [15] in early life, suggesting long-lasting post-natal effects of PAM. The immunological mechanisms that establish and maintain what has been termed the 'tolerant phenotype' phenomenon with respect to PAM and malaria in infancy are not well understood [1]. That PAM does demonstrably affect immune functions in the newborn has nevertheless been reported in several studies, characterized by

1. modulation of immunological responses at birth (in cord blood) as well as during infancy and childhood in those born to mothers with placental infection at delivery [16–18];
2. the presence of parasite antigen-specific memory and regulatory T cells in cord blood from exposed children [19–21],
3. larger populations of T regulatory CD4<sup>+</sup> cells (Treg) in cord blood from offspring of women with PAM when compared with those of uninfected women [19, 22].

During childhood, the proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells increases, attaining a profile resembling that of adults by 5 years of age [23]). CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cells are mainly involved in the activation of other immune cells to construct an immune response, while CD8<sup>+</sup> T cells actively eliminate infected cells through their cytotoxic properties. An increased proportion of CD4<sup>+</sup> T cells (comprising mostly CD8<sup>+</sup> cells) before the age of 5 years, whilst the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells was stable during this period, has also been reported [24]. These fluctuations in the relative numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells during early life may be a reflection of a continuous redistribution among these subsets throughout life [25].

Treg suppress antigen-specific responses *in vivo* and *in vitro* and are involved in the control of autoimmune responses. The frequency of Treg has been reported to increase in *P. falciparum*-infected adults with a dose-dependent effect of parasite load [26–29]. During foetal and

early life, the development of Treg is also crucial to suppress foetal anti-maternal immunity and in the maintenance of foetal self-tolerance [30]. These cells produce large amounts of IL-10 [31] [32], and inhibit the production of Th1 cytokines in monocytes, macrophages, T cells and natural killer (NK) cells. Treg have also been shown to play a role in the downmodulation of NK cells' activities [33].

In humans, two distinct NK cell populations have been identified based on differential CD16 and CD56 expression. The majority of NK cells in peripheral blood are NK<sup>dim</sup> (CD56<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup>) with cytotoxicity as their main effector function. The minor population is defined as NK<sup>bright</sup> (CD56<sup>high</sup> CD16<sup>low</sup>) and favours cytokine production [34]. It has been shown that NK cells from cord blood are phenotypically and functionally mature [35] and able to produce interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and proliferate in response to IL-2, in a manner comparable to those of adults. NK cells purportedly play an important role in early immunity against malaria, being among the first cells in peripheral blood to produce protective IFN- $\gamma$  in response to *P. falciparum*-infected erythrocytes [36, 37]. Further, IFN- $\gamma$ -producing NK cells in the placenta have been reported to exert a protective role against PAM [38]. The expansion of a subset of T cells expressing NK cell markers, NKT cells [39], has been reported in peripheral blood during severe *P. falciparum* infection [40] and in the livers of mice in a rodent model of malaria infection, where these cells were also associated with anti-parasitic activity [41]. NKT cells are normally present in very low numbers in peripheral blood, but they are activated *in utero* [42], likely contributing to the control of foetal Th2 responses [43].

Thus, different cellular components of the innate immune system, including Treg, NK and NKT cells, are known to be associated with putatively protective responses against *P. falciparum*. However, prospective studies of the impact of PAM on the profile and function of these cells in infants have yet to be reported. The aim of the study described here was thus to determine the phenotypic profiles of different circulating lymphocyte populations of infants born to mothers with or without PAM and to evaluate prospectively whether *P. falciparum* infection of the mother during pregnancy or of the infant would affect the profiles of these cells during the first year of life.

## Materials and Methods

### Ethics statement

The study was approved by the ethics committees of the Faculty of Health Sciences (University of Abomey-Calavi, Benin) and of the Research Institute for Development (IRD) in France. Written informed consent was obtained from all women or guardians on behalf of the minors/children included in the study.

### Study design

The STOPPAM project (Strategies to Prevent Pregnancy Associated Malaria) was carried out in Benin and Tanzania between November 2008 and April 2011. Detailed descriptions of the study sites, demographics of study populations, study design and conduct have been published previously [44]. In Benin, the study took place in a high malaria transmission area located 70 km west of the commercial capital, Cotonou. The entomological inoculation rate estimated in a neighbouring area is 35–60 infective bites per person per year [45]. Three dispensaries were involved in enrolling pregnant women with a gestational age less than 24 weeks: Come, Akodeha and Ouedeme Pedah. Women enrolled in the study had monthly clinical and parasitological follow-up assessments until delivery, and received intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine during scheduled antenatal visits, according to national policy in Benin. Women with a diagnosis of clinical malaria (temperature  $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$  and positive malaria



rapid diagnostic test, RDT) received a treatment regimen of quinine. In case of clinical symptoms between antenatal visits (ANV), women were encouraged to attend the maternity clinic to receive care.

As part of the STOPPAM project, 217 pregnant women were selected on the basis of their *P. falciparum* infection histories (uninfected during pregnancy,  $n = 99$ ; infected during pregnancy but uninfected at delivery,  $n = 71$ ; infected at delivery,  $n = 47$ ); following delivery, the infants of these mothers were followed-up every two weeks from birth to 12 months of age. The follow-up of infants included routine tests to detect *P. falciparum*, clinical assessments and growth measurements, details of all of which have been published previously (Fig 1) [46]. To perform immunological studies, 10 ml of cord blood were collected at delivery, while 2 ml peripheral blood samples were obtained at 3, 6 and 12 months of age. Samples were processed at the laboratory of the Research Center for Malaria in Pregnancy and Infancy (CERPAGE). Infants for whom fewer than 3 blood samples were collected during the follow-up period were excluded from the study as well as infants whose mothers tested positive for HIV or had an unknown HIV serostatus.

### *P. falciparum* infection status

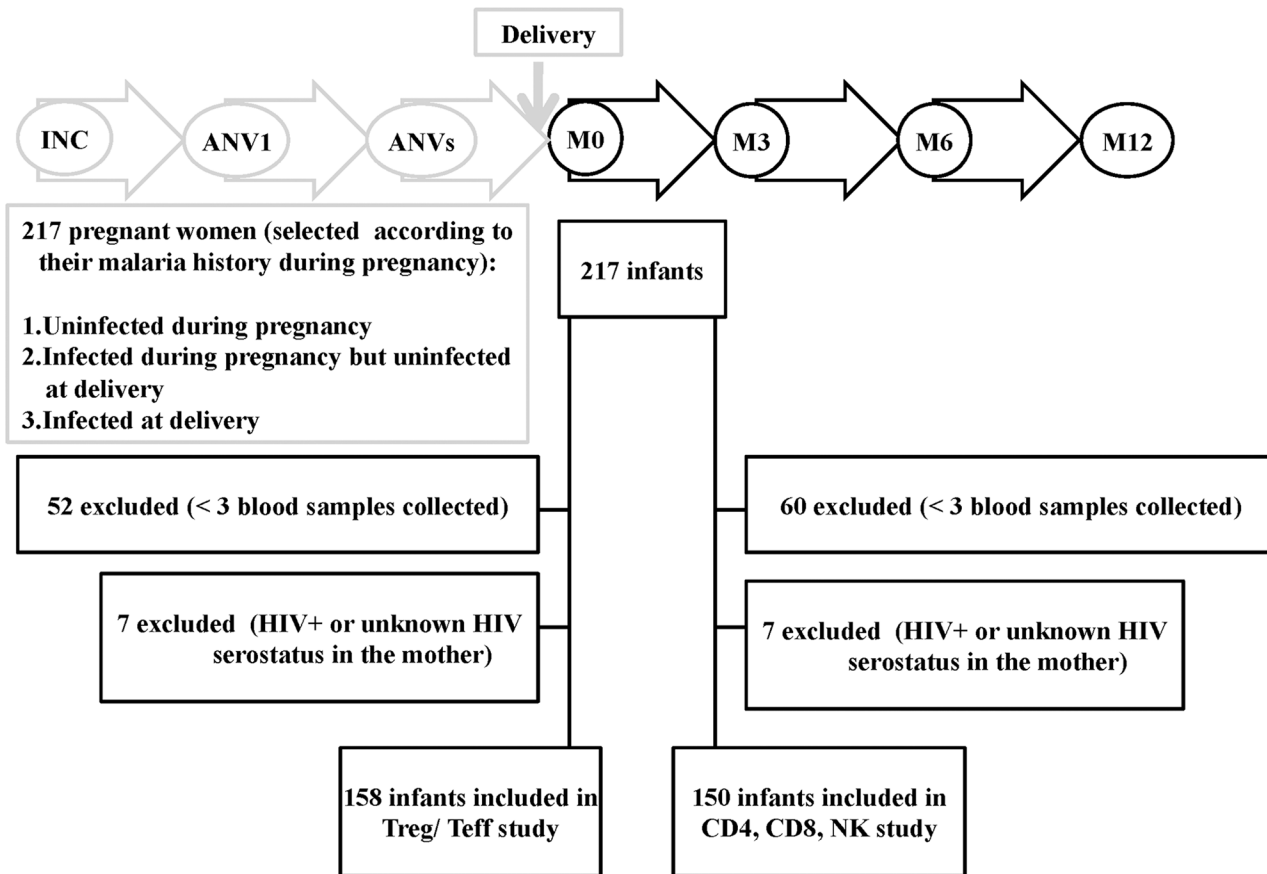
Clinical and parasitological assessments were performed at each ANV in mothers and during the follow-up of infants. Parasites were detected by thick blood smear (TBS). Briefly, smears were prepared, stained with Giemsa and examined by two experienced laboratory technicians for the presence and density of parasites. Smears were considered negative if no asexual stage *Plasmodium* parasite was detected by counting 500 leucocytes. Parasites were counted against 200 leukocytes and parasite density was estimated assuming 8000 leukocytes/ $\mu\text{l}$  of blood. At delivery, TBS were made from peripheral, placental and cord blood samples. Infection with *P. falciparum* in the mothers at delivery was defined by the presence of parasites in placental and/or maternal peripheral blood.

### Immunophenotyping

The monoclonal antibodies (mAb) used for T- and NK-cell labeling were the following: anti-CD8-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD3-APC, anti-CD56-PE antibodies (all BD Biosciences). For Treg and CD4<sup>+</sup> T effector cell (Teff) labeling anti-CD4-PerCP, anti-CD25-FITC, anti-CD127-PE and anti-Foxp3-APC monoclonal antibodies were used (BD Biosciences and eBioscience).

In a first step, 5 $\mu\text{l}$  of FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) were added to 100 $\mu\text{l}$  of whole blood *ex vivo* and incubated for 15 min at 4°C. Cells were then specifically labeled by adding 5 $\mu\text{l}$  of each mAb, lightly vortexed and then incubated for 30 min at 4°C in the dark. Two ml of FACS Lysing buffer (BD Biosciences) were then added and cells incubated for a further 15 min at room temperature, in the dark. After spin-washing twice with PBS 3% FCS, at least 200,000 cells were then acquired on a flow cytometer (BD FACS Calibur).

Treg and Teff labeling was performed according to the manufacturer's recommendation (eBioscience). Briefly, 1 ml whole blood *ex vivo* was washed with PBS-3% Foetal Bovin Serum (FBS). After washing, 8  $\mu\text{l}$  of anti-CD25-FITC, 6  $\mu\text{l}$  of anti-CD127-PE and 6 $\mu\text{l}$  of anti-CD4-PerCP antibodies were added. Cells were incubated for 25 min at 4°C. Red blood cells were then lysed by adding FACS Lysing buffer and cells incubated for 15 min in the dark. After spin-washing with PBS, cells were incubated overnight with Fix-Perm buffer (eBioscience), then washed with Perm-Wash Buffer (eBioscience). Cells were then incubated in Perm-Wash Buffer with 2% rat serum (eBioscience) for 15 minutes in the dark, followed by the addition of



**Fig 1. Flow diagram of birth cohort study.** 217 pregnant women were enrolled under 24 weeks of gestation and their infants were longitudinally followed-up from birth to 12 months of age. For the Treg/Teff part: 59 newborns were excluded (52 newborns < 3 blood samples collected and 7 newborns HIV+ or unknown HIV serostatus in the mother). Data from 158 infants were included for analyses. For the CD4, CD8, NK part: 67 newborns were excluded (60 newborns < 3 blood samples collected and 7 newborns HIV+ or unknown HIV serostatus in the mother). Data from 150 infants were included for analyses.

doi:10.1371/journal.pone.0139606.g001

10µl of anti-Foxp3-APC and incubated for a further 15 minutes in the dark. After two spin-washes with Perm-Wash Buffer and PBS 3% FCS, at least 1,000,000 cells were acquired.

Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) and Teff (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) cells were gated from the whole lymphocyte population (S1 Fig). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> were gated on CD3<sup>+</sup> cells, whilst NK cells were characterized as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells and NKT cells were defined as CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells. For the purposes of our study, NK<sup>dim</sup> cells were defined as CD3<sup>-</sup> cells with weak expression of CD56, whereas NK<sup>bright</sup> cells were also CD3<sup>-</sup> but with strong expression of CD56. Levels of expression of Foxp3 were evaluated with a relative value (RV) corresponding to the MFI of Foxp3 in the Treg (or Teff) divided by the MFI of FoxP3 in the naïve T cell population (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>)

### Statistical analysis

The association between T- and NK-cell frequencies and infant age was investigated by using analyses of variances for repeated measures.

To examine the contribution of PAM and/or infant plasmodial infection to T- and NK-cell frequencies, the first set of analyses proceeded as follows: for each phenotype frequency we

built a multivariate linear mixed model (LMM) that takes into account the correlation between repeated measurements as well as other potential confounders in the relationship between infection and the phenotype frequency. We proceeded in two steps; first a univariate model investigated the association between baseline characteristics and T-/NK-cell frequencies. Baseline characteristics were gravidity, maternal anaemia (Hb < 11 g/dl), prematurity (<37 weeks), low birth weight (< 2500 g) and infant gender. Variables showing a p-value < 0.2 were selected for the multivariate model (second step).

We built 3 variables related to maternal plasmodial infections as follows: (i) infection before the third trimester of pregnancy, (ii) infection during the third trimester of pregnancy but more than 10 days before delivery, (iii) infection from 10 days prior to delivery up to and including delivery. Designation of the latter group was based on the premise that infections detected during an emergency visit occurring 10 days or less before delivery, and therefore treated, were too close in time to delivery to be separable from it, and because most of those concerned were also found to be infected at delivery.

We also built 3 variables related to infections during infancy as follows: (i) those occurring before three months of age, (ii) those occurring between 3 and 6 months of age, (iii) those occurring between 6 and 12 months of age. All the variables related to *P. falciparum* infection were included in the multivariate model with the baseline characteristics selected at the univariate step. The final multivariate model retained all the variables related to *P. falciparum* infection along with the baseline characteristics showing significance at the 0.05 level.

To graphically illustrate the predicted effect of maternal infection on the phenotype frequencies of infants, we then computed the mean predicted phenotype frequencies of infants born from uninfected mothers at each time-point, as well as those of the same infants if they were born to an infected mother.

In a second set of analyses, the impact of infant *P. falciparum* infection on their T-/NK-cell frequencies was examined through three questions. Does infant *P. falciparum* infection before 3 months of age have a significant effect on the T-/NK-cell responses at 3 months? Does infant *P. falciparum* infection between 3 and 6 months of age have a significant effect on their T-/NK-cell responses at 6 months? Does infant *P. falciparum* infection between 6 and 12 months of age have a significant effect on the T-cell/NK-cell responses at 12 months? To answer each question we employed three linear regression models (at 3 months, 6 months and 12 months). The final models were obtained after adjusting for maternal *P. falciparum* infection, gravidity, sex, prematurity and LBW.

In a third set of analyses we aimed to identify whether T-/NK-cell frequencies could affect the occurrence of infection during the ensuing months. To achieve this aim we employed a logistic mixed model where the dependent variable was the time-dependent binary variable “occurrence of infection between 2 consecutive measurement of the T-/NK-cell frequencies” (i.e. infection arising before 3 months of age, infection occurring between 3 and 6 months of age, and infection occurring between 7 and 12 months of age). This dependent variable was regressed on the T-/NK-cell frequencies in 2 different ways: in a first model we determined whether phenotype frequencies at birth were associated with the occurrence of infection during the first 12 months of age; in this model the dependent “infection occurrence” variable was regressed on the T-/NK-cell frequencies in cord blood. In a second model, we built a time-dependent covariate “T-cell/NK-cell frequencies at the previous measurement”, so that, for infection occurring prior to 3 months of age, we considered the T-/NK-cell frequencies in cord blood cells, for occurrence of infection between 3 and 6 months of age we considered T-/NK-cell frequencies in blood cells obtained at 3 months of age and for occurrence of infection between 7 and 12 months of age we considered T-/NK-cell frequencies in blood cells obtained at 6 months of age. As in the previous analyses, potential confounders were first analyzed in a

univariate model and then in a multivariate model. The models allowed estimation of the adjusted values of the phenotype frequencies (for any set of covariates) of all infants at each time-point.

Statistical significance in all multivariate analyses was considered if  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the R statistical package (R Development Core Team; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>) and graphs made with graphPad (Prism 5.0).

## Results

### Characteristics of the study population

Between November 2008 and April 2011, 217 mother/infant pairs were enrolled in the study (Fig 1) but of these 59 were excluded due to insufficient numbers of blood samples (52) and HIV sero-status (7 either HIV+ or unknown). The characteristics of the 158 pairs retained for the analysis presented here are presented in Table 1. Women had a mean age of 26.8 years (95% CI 25.9–27.7), whilst 27 (17.1%) were primigravidae and 18 (11.4%) had anemia (Hb<11g/dL) at delivery.

Infections before the third trimester of pregnancy were detected in 50 (32%) women, whilst 32 (20%) were infected during the third trimester of pregnancy, and in 38 (24%) women infections occurred within 10 days of or at delivery. The latter group of women infected 10 days before or at delivery comprised women infected at delivery and women shown to be infected close to delivery when attending an emergency visit; most of the women belonging to the

**Table 1. Characteristics of the study population (n = 158 mother/infant pairs).**

Mother		n (%)
Age (years)	≤ 20	34 (21.5)
	21–25	45 (28.5)
	26–30	41 (26)
	≥ 31	38 (24)
Gravidity status	Primigravidae	27 (17.1)
	Multigravidae	131 (82.9)
Anemia at delivery (Hb<11g/dl)		18 (11.4)
Infected before 3 <sup>rd</sup> trimester of pregnancy		50 (31.6)
Infected during 3 <sup>rd</sup> trimester of pregnancy up until 10 days before delivery		32 (20.3)
Infected 10 days before or at delivery		38 (24.1)
No sign of infection		38 (24.1)
Infected placenta		29 (18.8)
Infant		
Sex	Female	76 (48.1)
Prematurity (gestational age ≤ 37 weeks)		12 (7.6)
Residence location	Rural	44 (27.8)
	Semi-rural	114 (72.2)
Low birth weight (< 2500 g)		19 (12)
Infected before 3 months of age		6 (3.8)
Infected between 3 and 6 months of age		20 (12.7)
Infected between 6 and 12 months of age		47 (29.7)
No sign of infection		85 (53.9)

doi:10.1371/journal.pone.0139606.t001

latter group were also found to be infected at delivery. Babies' mean birth weight was 3053g (2987–3119).

## Variations in T- and NK cell frequencies according to age in the first year of life

There was a significant effect of infant age on the T lymphocyte profiles during the first year of life. Thus the frequency of CD4<sup>+</sup> cells was higher at birth and decreased with age, while the frequency of CD8<sup>+</sup> cells was lower at birth and increased with age; the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio consequently decreased with age (Fig 2). Despite the overall decline in CD4<sup>+</sup> cells, the frequencies of Treg and of Teff increased between 0 and 12 months of age, although the Treg/Teff ratio decreased with infant's age, suggesting that Teff increased more rapidly than Treg (Fig 2). Foxp3 was detected in Treg and to a lesser extent in Teff, with a clearly higher level of expression in Treg. The subset of Treg with the highest levels of expression of CD25 expressed the highest levels of Foxp3 (Fig 2), a key transcription factor that is required for development, maintenance, and function of these cells [47], suggesting a Treg cell subpopulation with specific immune function. With increasing age, the relative expression of Foxp3 increased in Teff and decreased Treg. In the CD25<sup>high</sup> subpopulation of Treg the relative level of Foxp3 expression increased from birth to 6 months of age but declined thereafter (Fig 2). The frequencies of all NK cell subpopulations decreased with age (Fig 2). With the exception of the CD25<sup>high</sup> subpopulation of Treg all of these age-dependent variations were shown to be statistically significant ( $p < 0.001$ ) firstly in analyses of variance for repeated measures (Fig 2), and subsequently in multivariate analyses (Tables 2 and 3).

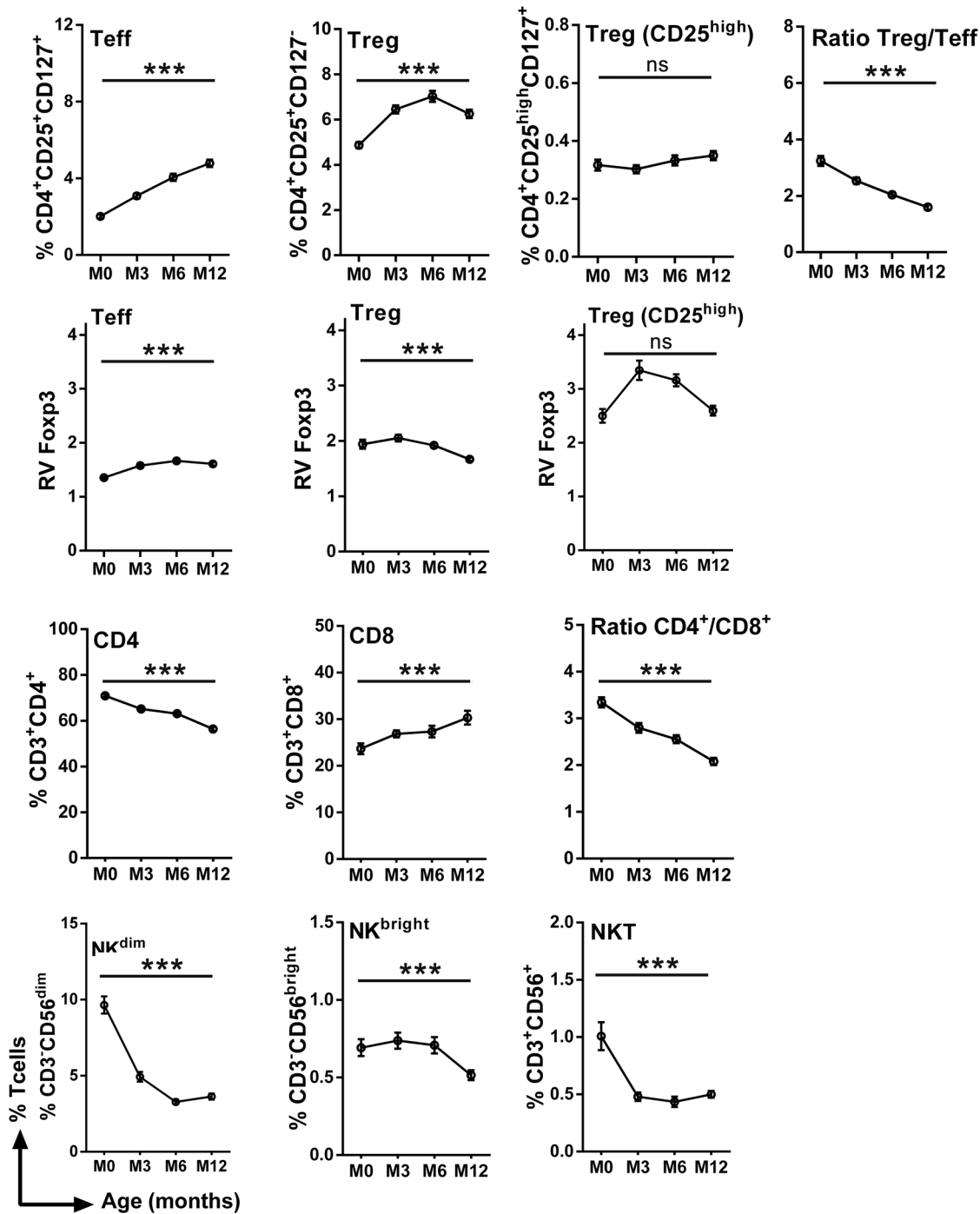
Thus, we observed variations in the frequency of T- and NK-cell subsets within the first year of life, with an overall decrease of CD4, NK<sup>dim</sup> and NKT cells and an increase of CD8, Treg and Teff over time.

## Maternal *P. falciparum* infection at delivery influences the immune cell profile of infants

Next, we examined whether maternal *P. falciparum* infection could influence the frequencies of lymphocytes in the offspring.

Univariate analyses showed that *P. falciparum* infection before the third trimester of pregnancy was associated only with a decreased frequency of NK<sup>dim</sup> in infants (data not shown), whilst infection during the third trimester of pregnancy had no effect on any parameter (data not shown). In contrast, maternal *P. falciparum* infection at delivery was associated with several alterations in infant's lymphocyte populations (S1 Table, Fig 3). Most notable were the increased frequencies of both Treg and of CD8<sup>+</sup> cells throughout infancy but, conversely, reduced frequencies of both CD4<sup>+</sup> and NKT cells (Fig 3). Further, maternal infection at delivery was associated with an increased frequency of infant NK<sup>dim</sup> cells at birth, but no effect was seen on NK<sup>bright</sup> frequencies.

The results of multivariate analyses of the effects of maternal infection at delivery are illustrated in Tables 2 and 3 with a graphical depiction in Fig 4 of an adjusted model, based on the multivariate LMM analysis. The significantly increased frequencies of CD8<sup>+</sup> cells in infants at birth, 3 and 6 months of age as well as increased proportions of Treg in infants at 3 months of age were confirmed in the multivariate analyses (Fig 4). In addition, the significantly reduced frequencies of CD4<sup>+</sup> cells in infants at 3 and 6 months of age and lower NKT cell frequencies at birth, 6 and 12 months of age (Fig 4) were also confirmed. A significant increase in the frequency of infant NK<sup>dim</sup> cells was shown at birth, but significantly lower frequencies were present at 3 months of age (Fig 4).



**Fig 2. Frequencies of cell subsets in infants' peripheral blood during the first year of life.** Curves include dots representing mean with SEM (standard error of the mean). The statistical significance of differences indicated refers to analyses of variances for repeated measures. \*\*\*,  $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0139606.g002

In summary, maternal infection at delivery had a significant effect on the profile of immune cells of the infant, with increased frequencies of Treg and CD8<sup>+</sup> cells and a reduced percentage of CD4<sup>+</sup> and NKT cells. Accordingly, the CD4/CD8 ratio was also reduced over time in infants born to mothers that were infected close to or at delivery.

**Table 2. Multivariate (LMM) analyses of alterations in circulating T- and NK-cell subset frequencies in peripheral blood as a function of infants' age and of *P. falciparum* infection at delivery.**

		Treg			Teff			Treg (CD25 <sup>high</sup> )			Ratio Treg/Teff		R FoxP3 in Treg		R FoxP3 in Teff		R FoxP3 in Treg (CD25 <sup>high</sup> )						
		Regression	p		Regression	p		Regression	p		Regression	p	Regression	p	Regression	p	Regression	p					
		coef, (SD) <sup>D</sup>			coef, (SD)			coef, (SD)			coef, (SD)		coef, (SD)		coef, (SD)		coef, (SD)						
Infant age <sup>A</sup>	3 months	1,45	0,26	<0.01	0,97	0,22	<0.01	-0,02	0,03	ns	-0,64	0,18	<0.01	0,16	0,09	ns	0,23	0,05	<0.01	0,92	0,21	<0.01	
	6 months	2,18	0,26	<0.01	1,99	0,23	<0.01	0,00	0,03	ns	-1,10	0,18	<0.01	-0,03	0,10	ns	0,32	0,05	<0.01	0,74	0,21	<0.01	
	12 months	1,35	0,26	<0.01	2,73	0,22	<0.01	0,03	0,02	ns	-1,64	0,18	<0.01	-0,27	0,09	<0.01	0,23	0,05	<0.01	0,09	0,21	ns	
<i>P. falciparum</i> maternal infection	at delivery <sup>B</sup>	& 0 M	0,47	0,43	ns	-0,11	0,36	ns	-0,01	0,04	ns	0,31	0,29	ns	0,18	0,13	ns	-0,04	0,07	ns	0,48	0,31	ns
		& 3 M	1,10	0,44	<0.05	0,44	0,37	ns	0,04	0,04	ns	0,07	0,29	ns	-0,04	0,14	ns	-0,07	0,08	ns	0,17	0,31	ns
		& 6 M	0,38	0,44	ns	0,05	0,37	ns	0,04	0,04	ns	-0,03	0,29	ns	0,20	0,14	ns	-0,09	0,08	ns	0,13	0,31	ns
		& 12 M	0,52	0,43	ns	0,02	0,36	ns	0,00	0,04	ns	0,27	0,29	ns	0,16	0,14	ns	0,08	0,08	ns	0,47	0,30	ns

<sup>A</sup> The reference values used for comparison are those recorded in cord blood (M0);

<sup>B</sup> denotes the influence of infection at delivery/≤ 10 days prior to delivery on neonatal/infant responses measured at designated time-points; M0: cord blood, M3, M6, M12: blood drawn at 3, 6 & 12 months of age;

<sup>C</sup> denotes the influence of infection at time-points in the infant on the composition of neonatal/infant peripheral blood lymphocyte subsets.

<sup>D</sup> Positive/negative coefficients indicate cell subset frequencies above/below control (uninfected) levels; SD: standard deviation. All the data were adjusted on *P. falciparum* infection history of mother, gravidity, infant age, low birth weight

doi:10.1371/journal.pone.0139606.t002

**Table 3. Multivariate (LMM) analyses of alterations in circulating T- and NK-cell subset frequencies in peripheral blood as a function of infants' age and of *P. falciparum* infection at delivery.**

		CD4		CD8		Ratio CD4/CD8		NKT		NK <sup>dim</sup>		NK <sup>bright</sup>								
		Regression coef. (SD)	p	Regression coef. (SD)	p	Regression coef. (SD)	p	Regression coef. (SD)	p	Regression coef. (SD)	p	Regression coef. (SD)	p							
Infant age <sup>A</sup>	3 months	-0,08	0,02	<0.01	0,11	0,03	<0.01	-0,55	0,12	<0.01	-0,70	0,09	<0.01	-0,48	0,09	<0.01	0,36	0,15	<0.05	
	6 months	-0,11	0,02	<0.01	0,15	0,03	<0.01	-0,79	0,12	<0.01	-0,79	0,09	<0.01	-0,84	0,09	<0.01	0,34	0,15	<0.05	
	12 months	-0,25	0,02	<0.01	0,28	0,03	<0.01	-1,34	0,12	<0.01	-0,54	0,09	<0.01	-0,75	0,10	<0.01	0,01	0,15	ns	
<i>P. falciparum</i> maternal infection	at delivery <sup>B</sup>	& 0 M	-0,02	0,03	ns	0,15	0,06	<0.05	-0,61	0,21	<0.01	-0,54	0,14	<0.01	0,44	0,14	<0.01	0,31	0,22	ns
		& 3 M	-0,08	0,03	<0.05	0,17	0,06	<0.05	-0,65	0,22	<0.01	-0,18	0,14	ns	-0,28	0,14	<0.05	-0,24	0,23	ns
		& 6 M	-0,07	0,03	<0.05	0,14	0,06	<0.05	-0,55	0,22	<0.05	-0,28	0,14	<0.05	0,00	0,14	ns	-0,11	0,22	ns
		& 12 M	-0,01	0,04	ns	0,05	0,06	ns	-0,25	0,22	ns	-0,31	0,14	<0.05	-0,09	0,15	ns	0,30	0,23	ns

<sup>A</sup> The reference values used for comparison are those recorded in cord blood (M0);

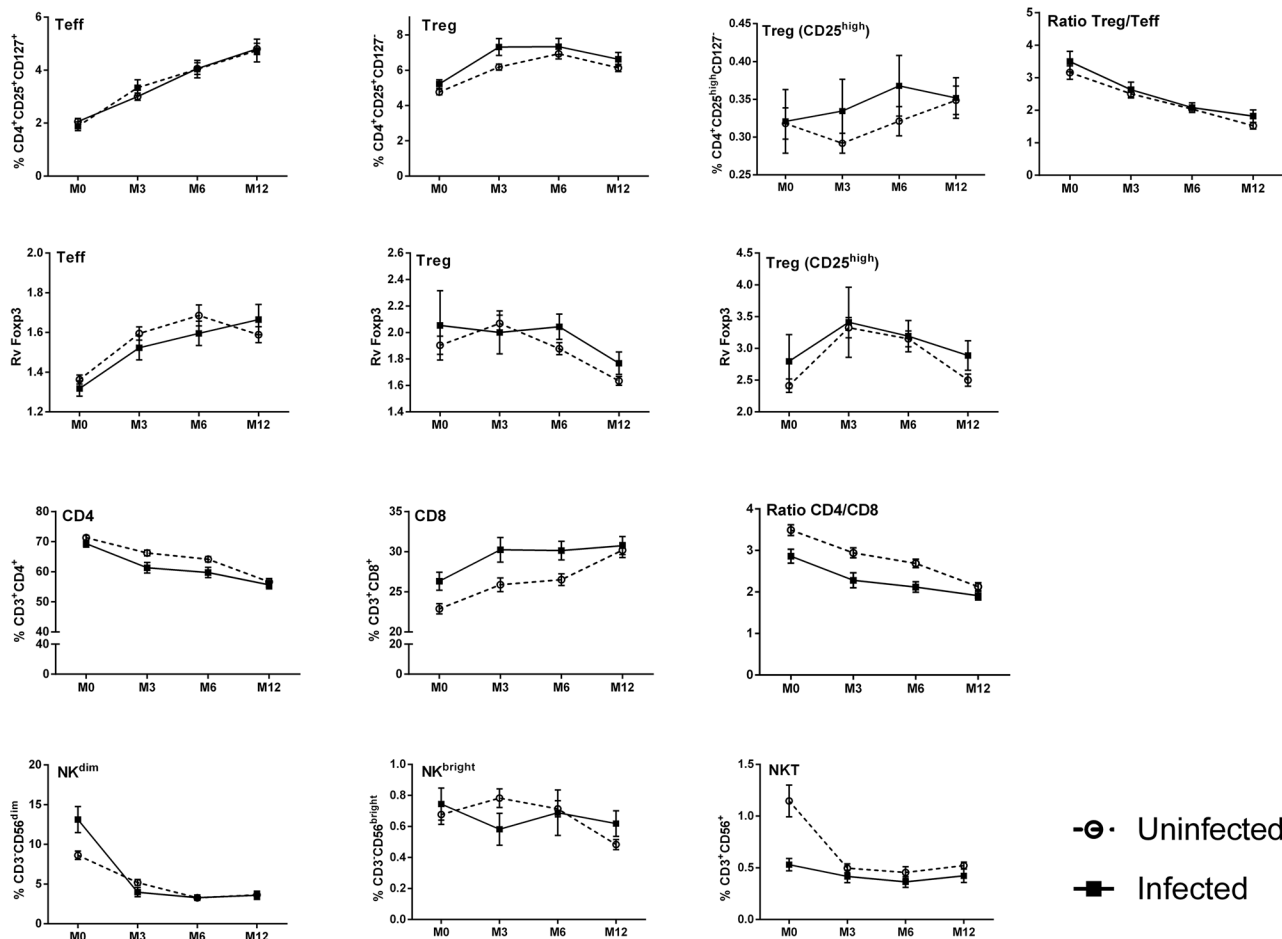
<sup>B</sup> denotes the influence of infection at delivery/≤ 10 days prior to delivery on neonatal/infant responses measured at designated time-points; M0: cord blood, M3, M6, M12: blood drawn at 3, 6 & 12 months of age;

<sup>C</sup> denotes the influence of infection at time-points in the infant on the composition of neonatal/infant peripheral blood lymphocyte subsets.

<sup>D</sup> Positive/negative coefficients indicate cell subset frequencies above/below control (uninfected) levels; SD: standard deviation. All the data were adjusted on *P. falciparum* infection history of mother, gravidity, infant age, low birth weight

doi:10.1371/journal.pone.0139606.t003



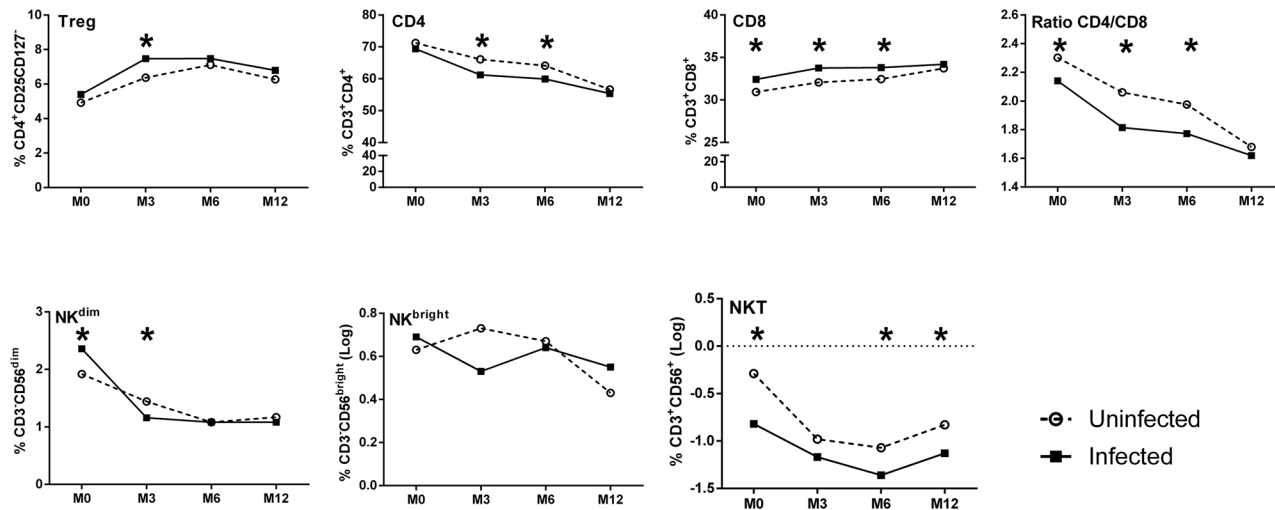


**Fig 3. Frequencies of cell subsets in infants' peripheral blood over time segregated on the basis of presence or absence of maternal infection at delivery.** (white for negative and hatched for maternal infection). Curves include dots representing mean with SEM (standard error of the mean).

doi:10.1371/journal.pone.0139606.g003

### *P. falciparum* infection in infants impacts on the immune cell profile

We next evaluated the effect of *P. falciparum* infections in infants on their immune cell profile during the first year of life. (S1 Table & Table 4). We observed that infants infected before 3 months of age had higher frequencies of CD4<sup>+</sup> and lower frequencies of CD8<sup>+</sup> cells than those not infected in the same period. In addition, infants infected between 3 and 12 months of age exhibited a lower frequency of Treg than those uninfected in the same period as well as a lower frequency of Treg expressing CD25<sup>high</sup> in infants infected between 3 and 6 months of age by univariate analysis (S1 Table). In the logistic mixed model (Table 4), the impact of infant *P. falciparum* infection on their T-/NK-cell frequencies was examined prospectively according to their infection histories 3 months prior to blood sampling at 3, 6 and 12 months. At 3 months, those infected previously had more CD4<sup>+</sup> and fewer CD8<sup>+</sup> cells. At 6 months, infants infected previously had lower relative values of FoxP3 in Treg and in TregCD25<sup>high</sup>. At 12 months infants infected previously had a tendency towards higher frequencies of NKT cells but lower frequencies of Treg (Table 4).



**Fig 4. Adjusted profiles of lymphocyte frequencies in infants during the first year of life according to *P. falciparum* exposure in utero.** Values are derived from residuals in the multivariate LMM model. The statistical significance of differences indicated refers to those presented in Tables 2 and 3. \*, p < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0139606.g004

### Immunological predictors of the occurrence of *P. falciparum* in infants

Finally, we wanted to determine whether the varying frequencies of the cell populations we investigated were associated with a higher probability of *P. falciparum* infection in infancy.

Firstly, we assessed whether cord blood cell frequencies were predictive of *P. falciparum* infection during infancy. In univariate analysis, lower cord blood Teff but higher CD4<sup>+</sup> cell

**Table 4. A logistic mixed model to evaluate the impact of infant *P. falciparum* infection on the frequencies of circulating lymphocyte sub-types.**

		Impact of infant malaria between 0-3M on cellular responses at 3M		Impact of infant malaria between 3-6M on cellular responses at 6M		Impact of infant malaria between 6-12 M on cellular responses at 12M	
		Estimate (SD)	p-value	Estimate (SD)	p-value	Estimate (SD)	p-value
Treg	Infected	-0.88 (0.9)	0.33	-0.59 (0.73)	0.422	-0.91 (0.4)	0.024
Teff	Infected	0.26 (0.65)	0.685	-0.38 (0.55)	0.491	-0.44 (0.42)	0.295
Treg CD25 <sup>high</sup>	Infected	0.03 (0.07)	0.637	-0.07 (0.05)	0.198	-0.02 (0.03)	0.576
Treg/Teff ratio	Infected	-0.85 (0.57)	0.136	0.03 (0.25)	0.896	-0.31 (0.2)	0.127
FoxP3 RV in Treg	Infected	-0.18 (0.31)	0.575	-0.34 (0.12)	0.006	0.06 (0.07)	0.402
FoxP3 RV in Teff	Infected	-0.04 (0.15)	0.765	-0.13 (0.13)	0.299	-0.08 (0.08)	0.325
FoxP3 RV in Treg CD25 <sup>high</sup>	Infected	-0.21 (0.91)	0.819	-0.89 (0.32)	0.006	0.14 (0.20)	0.482
CD4 <sup>+</sup>	Infected	9.66 (4.12)	0.02	3.60 (2.83)	0.21	-1.91 (2.27)	0.4
CD8 <sup>+</sup>	Infected	-9.58 (3.66)	0.01	-3.34 (2.24)	0.14	1.37 (1.89)	0.47
NK <sup>dim</sup>	Infected	-1.92 (1.56)	0.22	0.26 (0.55)	0.64	0.33 (0.51)	0.52
NK <sup>bright</sup>	Infected	0.37 (0.25)	0.15	-0.03 (0.19)	0.87	0.01 (0.08)	0.91
NKT	Infected	0.00 (0.18)	0.99	0.08 (0.16)	0.61	0.14 (0.07)	0.06

Estimate: Positive/negative coefficients indicate cell subsets frequencies above/below control (uninfected) levels. All the data were adjusted on *P. falciparum* infection history of mother, gravidity, infant age, low birth weight. SD: standard deviation

doi:10.1371/journal.pone.0139606.t004

**Table 5. T and NK cell cord blood frequencies as immunological predictors of malaria in infants.**

	Univariate			Multivariate		
	OR	IC 95%	p-value	Adjusted OR	IC 95%	p-value
Treg	0.90	[0.66; 1.22]	ns	1.14	[0.80; 1.61]	0.47
Teff	0.55	[0.31; 1.00]	0.04	0.49	[0.26; 0.92]	0.02
CD4 <sup>+</sup>	1.07	[1.00; 1.15]	0.04	1.03	[0.89; 1.18]	0.69
CD8 <sup>+</sup>	0.94	[0.87; 1.01]	0.09	0.97	[0.83; 1.13]	0.68
NK (NK <sup>dim</sup> + NK <sup>bright</sup> )*	0.98	[0.92; 1.05]	ns	0.99	[0.92; 1.06]	0.73

Data were adjusted on the *P. falciparum* infection history of the mother, gravidity, infant age, low birth weight.

\*Results cumulate both NK<sup>dim</sup> and NK<sup>bright</sup> to avoid introducing two variables that are highly correlated into the model.

doi:10.1371/journal.pone.0139606.t005

frequencies were associated with an increased risk of *P. falciparum* infection during the first year of life (Table 5). In multivariate analysis, only the association with a significantly lower frequency of Teff remained.

We next examined the impact of cell frequencies at specific time-points on the occurrence of *P. falciparum* infection in the ensuing months of infancy. Univariate analysis showed that higher proportions of Treg, Teff and CD8<sup>+</sup> cells and lower proportions of CD4<sup>+</sup> and NK cells were significantly associated with an increased risk of *P. falciparum* infection in the first year of life. Multivariate analysis showed that lower proportions of Teff, CD4<sup>+</sup>, NK cells and higher proportions of CD8<sup>+</sup> cells were significantly associated with an increased risk of developing *P. falciparum* infection during the first year of life (Table 6).

## Discussion

The characterization of factors associated with increased susceptibility of infants to *P. falciparum* infection during the first year of life is a priority in the development of a vaccine against malaria. Here, we performed a longitudinal study of immune cell profiles in the first year of life of a large cohort of infants born to mothers with varying histories of infection during pregnancy.

**Table 6. T-/NK-cell frequencies and the occurrence of malaria during the first 12 months of life.**

	Univariate			Multivariate Model		
	OR	IC 95%	p-value	Adjusted OR	IC 95%	p-value
Treg	1.20	[1.08; 1.33]	<0.001			
Teff	1.29	[1.18; 1.42]	<0.001	0.85	[0.74; 0.97]	<0.001
CD4 <sup>+</sup>	0.95	[0.93; 0.97]	<0.001			
CD8 <sup>+</sup>	1.05	[1.02; 1.08]	<0.001	1.07	[1.02; 1.11]	<0.01
NK (NK <sup>dim</sup> + NK <sup>bright</sup> )*	0.87	[0.83; 0.91]	<0.001	0.79	[0.73; 0.87]	0.02

Data were adjusted on the *P. falciparum* infection history of the mother, gravidity, infant age, low birth weight

\*Results cumulate both NK<sup>dim</sup> and NK<sup>bright</sup> to avoid introducing two variables that are highly correlated into the model.

doi:10.1371/journal.pone.0139606.t006

We observed significant age-related changes in the frequencies of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Treg, Teff, NK and NKT cells from birth to 12 months of age. Those age-related changes were thus taken into consideration in multivariate analyses assessing the impact of *P. falciparum* exposure *in utero* or infection during the first year of life on infants' immune cell frequencies.

It was, firstly, notable that the CD4<sup>+</sup> cell frequency was highest at birth and then declined over the ensuing 12 months whilst the reverse was seen for CD8<sup>+</sup> cell frequencies. The decline of CD4<sup>+</sup> cell frequency in relation to age contrasts with the stable numbers reported by some [24], but is consistent with the decline seen in older-age children (1–13 years) reported by others [48, 49]. Similarly, the increasing CD8<sup>+</sup> cell frequency during the first 12 months of life is consistent with some but not all previous reports [24, 49]. The disparities in reported findings may simply reflect heterogeneity of the different study populations. Mechanistically, declining numbers of CD4<sup>+</sup> T cells during the first year of life may be explained by apoptosis [50] an age-dependent phenomenon, as cord blood lymphocytes are less sensitive to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis than aged T cells [51]. Alternatively or additionally, it could reflect migration of Treg out of the circulation to the gut, which is the primary site of Treg stimulation in responses to exogenous antigens during the first 18 month of life through specific homing receptors expressed specifically at birth [52]. Also, it has been reported that neonatal CD8<sup>+</sup> T cells proliferate more than CD4<sup>+</sup> T cells as CD8<sup>+</sup> T cells are more sensitive to IL-7 than CD4<sup>+</sup> T cells, a process that decreases during the first years of life [53–55].

The fact that the frequencies of Treg and Teff increased from birth to 12 months of age—is marked contrast to the overall decline of CD4<sup>+</sup> T cells, it should be noted—is likely an indication of the development of infant immunity through the first year of life. The increased Treg frequency and increased relative expression of FoxP3 in the CD25<sup>high</sup> subpopulation of Treg during the first year of life are in line with studies reporting increased proportions of FoxP3 T cells in peripheral blood soon after birth compared to cord blood [52, 56]. Treg maturation and their suppressive function is FoxP3-dependent. It has been demonstrated that cord blood cells express lower levels of Foxp3 compared to adult cells and that this contributes to the immature nature of neonatal immunity [57–59].

The two functionally distinct NK-cell subpopulations, cytotoxic CD56<sup>dim</sup> NK cells and cytokine-producing CD56<sup>bright</sup> NK cells, showed contrasting profiles, with a gradual decrease of the NK CD56<sup>dim</sup> and increasing NK CD56<sup>bright</sup> during the first year of life. Others have reported similar findings [24]. NK cells play a major role in innate immune responses that are relatively more important in early life when adaptive immunity has yet to develop, possibly explaining the high frequency of cytotoxic NK<sup>dim</sup> cells present at birth. NKT cells are present at comparable frequencies in cord blood and adult peripheral blood mononuclear cells [60]. We have not found data other than our own concerning the gradual decrease in NKT frequencies from birth to 6 months of age. NKT cells *in utero* are unique in acquiring a memory-activated phenotype through a contact with a natural ligand [42], suggesting that these NKT cells already exert an important immune regulatory function before birth and in self tolerance. Decreased post-natal NKT frequencies may be related to the overall change in the frequency distribution of different lymphocyte phenotypes.

In the context of the influence of maternal infection with *P. falciparum* on neonatal profiles, perhaps the most notable finding concerns the changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells. Children born to mothers infected at delivery exhibited a skewed profile of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell subsets, with an increased frequency of CD8<sup>+</sup> and a reduced frequency of CD4<sup>+</sup> cells at 3 and 6 months of age and consequently a continuous decline in the CD4/CD8 ratio between birth and 12 months of age. These patterns, as indicated earlier, are superimposed on the age-related trends—going in the same direction—for these same two cell types, suggesting possible additive effects of age and maternal infection on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell profiles during infancy. CD4<sup>+</sup> T cells are

considered essential triggers of early and effective NK-cell IFN- $\gamma$  responses upon contact with *P. falciparum*-infected erythrocytes [61]. They are, furthermore, required for generation and maintenance of protective antibody-mediated responses to *P. falciparum* and other pathogens [62]. Excessive loss of such cells during infancy may therefore play a pivotal role in the enhanced susceptibility to infection suffered by those born to mothers with placental infection.

The Treg and Teff frequencies were similar in cord blood of newborns born to mothers with *P. falciparum* infection compared to those born to uninfected mothers, again consistent with some previous studies [22, 63] but not with others [20, 64, 65]. *In utero* exposure to *P. falciparum* at delivery was nevertheless associated with significantly higher frequencies of Treg at three months of age. Persistence of Treg following *in utero* contact with non-self antigens is a reported phenomenon [30, 66]. Several studies have shown that *ex vivo* stimulation of cord blood cells with *P. falciparum* blood stage antigens reveals populations of CD4<sup>+</sup> T cells with a Treg phenotype [67]. Such cells, in cord blood of offspring born to women with placental malaria, have been shown to produce more IL-10 compared to cells of those born to mothers without placental malaria [64, 65]. Compatible with these findings, others have shown that a soluble extract of *P. falciparum*-infected red blood cells induces the differentiation of polyclonally-activated Treg CD4<sup>+</sup> T cells with strong suppressive activity, and that this activation was mediated by membrane bound TGF- $\beta$  on the Treg cells leading to immune evasion and reduced pro-inflammatory responses [29].

Resource constraints meant that we were unable to assess the functional characteristics of the different T cell subsets that we quantified, but we hypothesize that higher numbers of Treg in infants born to mothers infected at delivery would be associated with enhanced immunoregulatory activity and with concomitantly reduced pro-inflammatory responses. Such a profile would likely contribute to the increased susceptibility to infections observed in children born to infected mothers [13–15, 20]. Treg induced during infection are thought to limit the magnitude of subsequent parasite-specific IFN- $\gamma$  responses [68]. Prenatal exposure to plasmodial blood-stage antigens induces Treg that, in some newborns, primarily suppress Th1-type recall responses [2, 20]. Thus, the persistence of such Treg post-natally may affect the susceptibility of children both to *P. falciparum* and to other infections. We did not observe any alteration of the relative expression of FoxP3 in Treg or Teff. It could have been more informative to determine the expression of other functional markers such as CTLA-4 and/or TNFR1. It is known that Treg can dampen NK-cell activation/proliferation and cytotoxic activity [69, 70] as well as NKT cell proliferation and cytokine production [39]. In line with these observations, and in association with the increased Treg frequency in infants born to mothers infected at delivery, we found a reduced frequency of circulating NKT cells in infants of mothers infected with *P. falciparum* close to or at delivery as compared to the other group at birth. Further, maternal infection close to or at delivery was associated with an increased frequency of infant NK<sup>dim</sup> cells at birth, and to lower frequencies of these cells at 3 months of age. These observations are suggestive of an early inflammatory response being needed to protect against plasmodial parasites. Relatively diminished pro-inflammatory activity—as reflected by cord plasma cytokine profiles—is associated with more severe clinical outcomes of infection with *P. falciparum* during infancy [71, 72]. Assessing plasma cytokine profiles in our cohort of infants is thus of obvious interest in the context of the findings we present here as well as those we have previously reported [73].

Infection with *P. falciparum* in infancy also altered the immune cell profile, with infants infected before 3 months of age having a higher frequency of CD4<sup>+</sup> T cells and a lower frequency of CD8<sup>+</sup> T cells. It should be stressed that this, again, is a pattern superimposed on what is, in this case, the markedly contrasting background of an overall age-related decline in CD4<sup>+</sup> cells and an increase in CD8<sup>+</sup> cells, a pattern that, as was noted earlier, placental

infection at delivery further exacerbated. Again, we have no specific functional data on which to base any interpretation of this observation. It is nevertheless plausible to suppose that any infection-induced expansion of a population of CD4<sup>+</sup> T cells in such infants will primarily comprise atypical, transitional cells that have not undergone full maturation. Theory suggests that such effector-type cells induced in infancy remain in a state of anergy with little if any functional anti-pathogen activity [74].

Reduced Treg frequencies were observed in infants who were infected between 6 and 12 months of age, and the relative expression of FoxP3 in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> subpopulation was reduced in infants who were infected between 3 and 6 months of age. These findings contrast with the increase in number of Treg in the peripheral blood of older children and adults during *P. falciparum* infections [26–29]. The data we present here comprise observations after the infection event, however, and may thus simply reflect the physiological contraction of pathogen-induced responses following clinical recovery and clearance of the parasite.

One of the major limitations of our study concerns the absence of data with respect to co-infections such as, for example, chronic maternal helminth infections. Such infections are known to affect anti-plasmodial immune responses [75–77]. Furthermore, contact *in utero* with maternally-derived filariasis antigens reportedly modifies cord blood cell responses such that they display a predominantly anti-inflammatory profile [78]. On the other hand, the prevalence of (soil-transmitted) helminth infections in the first 12 months of life is likely less than 10% [79], and thus any possible influence on the lymphocyte profiles we observed here is likely to have been minimal.

In conclusion, we have found that maternal infection with *P. falciparum* at delivery, but not earlier in pregnancy profoundly affects the immune cell profile of their babies, with, in some cases, effects lasting at least 1 year. Cells of both the innate and adaptive arms of the immune system are affected. These findings echo our observations on TLR-mediated innate immune responses of the same group of infants [73]. Infection at delivery, but not earlier in pregnancy, was associated with significantly higher TLR3-mediated IL-6 and IL-10 responses in the first 3 months of life, and with significantly higher TLR3-/TLR7/8-/TLR9-mediated TNF- $\alpha$  and TLR9-mediated IL-10 responses at 6 or 12 months of age. Whether those alterations, along with the maternal infection-related relative increase in CD8<sup>+</sup> cells and relative decrease in CD4<sup>+</sup> cells in the post-natal period that we report here, have a direct bearing on infants' immune response to infection remains an open question. Plausibly, such changes could form the basis for an explanation of the increased susceptibility to malaria of infants born to mothers with infections at delivery, but proof of causality awaits further study.

## Supporting Information

**S1 Fig. The gating strategies for Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) and Teff (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>).** Cell frequencies were determined as a percentage from the whole lymphocyte population, and relative FoxP3 expression level determined as a function of FoxP3 expression by naïve CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>).  
(TIFF)

**S1 Table. Univariate analysis of alterations in circulating T- and NK-cell subset frequencies in cord/infant blood as a function of *P. falciparum* infection detected either in the mother at delivery or during infancy**  
(DOCX)



## Acknowledgments

We are grateful to all women and infant who participated in the study. We thank all the field and administration staffs of Akodeha, Comé central and Ouedémé Pedah health centers for their valuable contribution. We particularly thank Jacqueline Affedjou, Jean-Claude Sagbo, Bernadette Gandounou, Gildas Gbaguidi and all field staff in the site of STOPPAM for their hard work and dedication to this study. We would like to thank Bich-Tram Huynh, Sebastien Dechavanne and Valérie Briand for database management, Aurax Fernando, Charles Ahouansou, Pépin Kounou, Honoré Kounou, and Darius Sossou for their lab contribution; Thor Theander and Nicaise Ndam for their contribution to the design of the study.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ON KG SI AM PD KM MTB AJFL NF. Performed the experiments: ON KG SI BV SE SB CA NF. Analyzed the data: PH GC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ON KG SI BV SE CA NF. Wrote the paper: ON KG SI SV MTB PD AJFL NF. Designed and supervised the immunoassays: ON KG SI AJFL NF. Carried out the immunoassays: ON KG SI BV SE CA NF.

## References

1. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS neglected tropical diseases*. 2009; 3(5):e442. Epub 2009/05/30. doi: [10.1371/journal.pntd.0000442](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000442) PMID: [19478847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19478847/); PubMed Central PMCID: PMC2682196.
2. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med*. 2009; 6(7):e1000116. Epub 2009/07/29. doi: [10.1371/journal.pmed.1000116](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000116) PMID: [19636353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19636353/); PubMed Central PMCID: PMC2707618.
3. 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. *The Lancet infectious diseases*. 2012; 12(4):330–40. Epub 2012/03/01. S1473-3099(11)70341-3 [pii] doi: [10.1016/S1473-3099\(11\)70341-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70341-3) PMID: [22364680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22364680/).
4. Thornton CA, Macfarlane TV, Holt PG. The hygiene hypothesis revisited: role of materno-fetal interactions. *Current allergy and asthma reports*. 2010; 10(6):444–52. Epub 2010/09/03. doi: [10.1007/s11882-010-0148-5](https://doi.org/10.1007/s11882-010-0148-5) PMID: [20809222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20809222/).
5. Cuna WR, Choque AG, Passera R, Rodriguez C. Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns. *J Parasitol*. 2009; 95(4):891–4. Epub 2009/01/24. GE-1927 [pii] doi: [10.1645/GE-1927.1](https://doi.org/10.1645/GE-1927.1) PMID: [19161249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19161249/).
6. Kurtis JD, Higashi A, Wu HW, Gundogan F, McDonald EA, Sharma S, et al. Maternal Schistosomiasis japonica is associated with maternal, placental, and fetal inflammation. *Infection and immunity*. 2011; 79(3):1254–61. Epub 2010/12/15. IAI.01072-10 [pii] doi: [10.1128/IAI.01072-10](https://doi.org/10.1128/IAI.01072-10) PMID: [21149589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21149589/); PubMed Central PMCID: PMC3067505.
7. Malhotra I, Mungai PL, Wamachi AN, Tisch D, Kioko JM, Ouma JH, et al. Prenatal T cell immunity to *Wuchereria bancrofti* and its effect on filarial immunity and infection susceptibility during childhood. *The Journal of infectious diseases*. 2006; 193(7):1005–13. Epub 2006/03/07. doi: [10.1086/500472](https://doi.org/10.1086/500472) PMID: [16518763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16518763/).
8. Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells To produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infection and immunity*. 2000; 68(9):5430–4. Epub 2000/08/19. PMID: [10948177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10948177/); PubMed Central PMCID: PMC101811.
9. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta—the role of malaria. *Placenta*. 2004; 25(5):359–78. Epub 2004/04/15. S0143400403003072 [pii]. PMID: [15081631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15081631/).
10. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoia K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *The Lancet infectious diseases*. 2007; 7(2):93–104. Epub 2007/01/26. S1473-3099(07)70021-X [pii] PMID: [17251080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251080/).
11. Kalanda BF, van Buuren S, Verhoeff FH, Brabin BJ. Catch-up growth in Malawian babies, a longitudinal study of normal and low birthweight babies born in a malarious endemic area. *Early human*

- development. 2005; 81(10):841–50. Epub 2005/08/20. doi: [10.1016/j.earlhumdev.2005.06.006](https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2005.06.006) PMID: [16109465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16109465/).
12. Walther B, Miles DJ, Crozier S, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, et al. Placental malaria is associated with reduced early life weight development of affected children independent of low birth weight. *Malar J*. 2010; 9:16. Epub 2010/01/16. doi: [10.1186/1475-2875-9-16](https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-16) PMID: [20074331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20074331/); PubMed Central PMCID: PMC2841609.
  13. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyeme M, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol*. 1997; 146(10):826–31. Epub 1997/12/31. PMID: [9384203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9384203/).
  14. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med*. 2005; 2(12):e407. Epub 2005/11/02. 05-PLMERA-0127R3 [pii] doi: [10.1371/journal.pmed.0020407](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020407) PMID: [16259531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16259531/); PubMed Central PMCID: PMC1277932.
  15. Rachas A, Le Port A, Cottrell G, Guerra J, Choudat I, Bouscaillou J, et al. Placental Malaria is Associated With Increased Risk of Nonmalaria Infection During the First 18 Months of Life in a Beninese Population. *Clin Infect Dis*. 2012. Epub 2012/05/23. cis490 [pii] doi: [10.1093/cid/cis490](https://doi.org/10.1093/cid/cis490) PMID: [22610927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610927/).
  16. Adegnikaa AA, Kohler C, Agnandji ST, Chai SK, Labuda L, Breitling LP, et al. Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood. *The Journal of infectious diseases*. 2008; 198(6):928–36. Epub 2008/08/08. doi: [10.1086/591057](https://doi.org/10.1086/591057) PMID: [18684097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18684097/).
  17. Fievet N, Varani S, Ibitokou S, Briand V, Louis S, Perrin RX, et al. *Plasmodium falciparum* exposure in utero, maternal age and parity influence the innate activation of foetal antigen presenting cells. *Malar J*. 2009; 8:251. Epub 2009/11/06. 1475-2875-8-251 [pii] doi: [10.1186/1475-2875-8-251](https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-251) PMID: [19889240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19889240/); PubMed Central PMCID: PMC2780449.
  18. Walther B, Miles DJ, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray ES, et al. Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. *BMC infectious diseases*. 2012; 12:6. Epub 2012/01/17. doi: [10.1186/1471-2334-12-6](https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-6) PMID: [22243970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22243970/); PubMed Central PMCID: PMC3274427.
  19. Broen K, Brustoski K, Engelmann I, Luty AJ. Placental *Plasmodium falciparum* infection: causes and consequences of in utero sensitization to parasite antigens. *Mol Biochem Parasitol*. 2007; 151(1):1–8. Epub 2006/11/04. S0166-6851(06)00286-6 [pii] doi: [10.1016/j.molbiopara.2006.10.001](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.10.001) PMID: [17081634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17081634/).
  20. Mackroth MS, Malhotra I, Mungai P, Koech D, Muchiri E, King CL. Human cord blood CD4+CD25hi regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to *Plasmodium falciparum* antigens. *J Immunol*. 2011; 186(5):2780–91. Epub 2011/02/01. jimmunol.1001188 [pii] doi: [10.4049/jimmunol.1001188](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001188) PMID: [21278348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278348/).
  21. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Ouma J, Sharma S, Kazura JW, et al. Distinct Th1- and Th2-Type prenatal cytokine responses to *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion ligands. *Infection and immunity*. 2005; 73(6):3462–70. Epub 2005/05/24. PMID: [15908375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15908375/); PubMed Central PMCID: PMC1111871.
  22. Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *European journal of immunology*. 2010; 40(4):1062–72. Epub 2009/12/30. doi: [10.1002/eji.200939638](https://doi.org/10.1002/eji.200939638) PMID: [20039298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20039298/).
  23. Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, Totterman T, Lydyard P, Yuksel F, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991; 60(2):190–208. Epub 1991/08/01. PMID: [1712687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1712687/).
  24. Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Karre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scandinavian journal of immunology*. 2007; 66(2–3):335–44. Epub 2007/07/20. SJ11980 [pii] doi: [10.1111/j.1365-3083.2007.01980.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01980.x) PMID: [17635811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17635811/).
  25. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint JP, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mechanisms of ageing and development*. 2006; 127(3):274–81. Epub 2005/12/15. S0047-6374(05)00275-7 [pii] PMID: [16352331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16352331/).
  26. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, et al. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS pathogens*. 2009; 5(4):e1000402. Epub 2009/04/25. doi: [10.1371/journal.ppat.1000402](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000402) PMID: [19390618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19390618/); PubMed Central PMCID: PMC2668192.
  27. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS pathogens*. 2009; 5(4):e1000364. Epub 2009/04/04. doi: [10.1371/journal.ppat.1000364](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000364) PMID: [19343213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19343213/); PubMed Central PMCID: PMC2658808.



28. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*. 2005; 23(3):287–96. Epub 2005/09/20. S1074-7613(05)00245-1 [pii] PMID: [16169501](#).
29. Clemente A, Caporale R, Sannella AR, Majori G, Severini C, Fadigati G, et al. Plasmodium falciparum soluble extracts potentiate the suppressive function of polyclonal T regulatory cells through activation of TGFbeta-mediated signals. *Cell Microbiol*. 2011; 13(9):1328–38. Epub 2011/06/28. doi: [10.1111/j.1462-5822.2011.01622.x](#) PMID: [21699642](#).
30. Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008; 322(5907):1562–5. Epub 2008/12/06. doi: [10.1126/science.1164511](#) PMID: [19056990](#); PubMed Central PMCID: PMC2648820.
31. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683–765. Epub 2001/03/13. 19/1/683 [pii] doi: [10.1146/annurev.immunol.19.1.683](#) PMID: [11244051](#).
32. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol*. 2001; 166(9):5530–9. Epub 2001/04/21. PMID: [11313392](#).
33. Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, et al. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of leukocyte biology*. 2007; 81(1):144–53. Epub 2006/09/09. PMID: [16959895](#).
34. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006; 20(3):123–37. Epub 2005/12/21. S0268-960X(05)00055-X [pii] PMID: [16364519](#).
35. Dalle JH, Menezes J, Wagner E, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, et al. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res*. 2005; 57(5 Pt 1):649–55. Epub 2005/02/19. 01.PDR.0000156501.55431.20 [pii] doi: [10.1203/01.PDR.0000156501.55431.20](#) PMID: [15718362](#).
36. Horowitz A, Newman KC, Evans JH, Korbel DS, Davis DM, Riley EM. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2010; 184(11):6043–52. Epub 2010/04/30. doi: [10.4049/jimmunol.1000106](#) PMID: [20427769](#).
37. Newman KC, Korbel DS, Hafalla JC, Riley EM. Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. *PLoS pathogens*. 2006; 2(12):e118. Epub 2006/12/13. PMID: [17154717](#); PubMed Central PMCID: PMC1687207.
38. Othoro C, Moore JM, Wannemuehler KA, Moses S, Lal A, Otiemo J, et al. Elevated gamma interferon-producing NK cells, CD45RO memory-like T cells, and CD4 T cells are associated with protection against malaria infection in pregnancy. *Infection and immunity*. 2008; 76(4):1678–85. Epub 2008/02/06. doi: [10.1128/IAI.01420-07](#) PMID: [18250175](#); PubMed Central PMCID: PMC2292852.
39. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer research*. 2003; 63(15):4516–20. Epub 2003/08/09. PMID: [12907625](#).
40. Watanabe H, Weerasinghe A, Miyaji C, Sekikawa H, Toyabe S, Mannor MK, et al. Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients. *Parasitology international*. 2003; 52(1):61–70. Epub 2003/01/25. PMID: [12543148](#).
41. Pied S, Roland J, Louise A, Voegtle D, Soulard V, Mazier D, et al. Liver CD4-CD8- NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *J Immunol*. 2000; 164(3):1463–9. Epub 2000/01/21. PMID: [10640763](#).
42. van Der Vliet HJ, Nishi N, de Gruijl TD, von Blomberg BM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, et al. Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood*. 2000; 95(7):2440–2. Epub 2000/03/25. PMID: [10733519](#).
43. Harner S, Noessner E, Nadas K, Leumann-Runge A, Schiemann M, Faber FL, et al. Cord blood Valpha24-Vbeta11 natural killer T cells display a Th2-chemokine receptor profile and cytokine responses. *PLoS one*. 2011; 6(1):e15714. Epub 2011/02/10. doi: [10.1371/journal.pone.0015714](#) PMID: [21305060](#); PubMed Central PMCID: PMC3031538.
44. Huynh BT, Fievet N, Gbaguidi G, Borgella S, Mevo BG, Massougboji A, et al. Malaria associated symptoms in pregnant women followed-up in Benin. *Malar J*. 2011; 10:72. Epub 2011/04/02. 1475-2875-10-72 [pii] doi: [10.1186/1475-2875-10-72](#) PMID: [21453493](#); PubMed Central PMCID: PMC3076273.
45. Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouedraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, et al. Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and environmental factors. *PLoS one*. 2011; 6(11):

- e27516. Epub 2011/11/19. doi: [10.1371/journal.pone.0027516](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027516) PONE-D-11-02896 [pii]. PMID: [22096588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22096588/); PubMed Central PMCID: PMC3214070.
46. Borgella S, Fievet N, Huynh BT, Ibitokou S, Hounguevou G, Affedjou J, et al. Impact of pregnancy-associated malaria on infant malaria infection in southern Benin. *PLoS one*. 2013; 8(11):e80624. Epub 2013/11/16. doi: [10.1371/journal.pone.0080624](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080624) PMID: [24236190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24236190/); PubMed Central PMCID: PMC3827421.
  47. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Advances in immunology*. 2003; 81:331–71. Epub 2004/01/09. PMID: [14711059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14711059/).
  48. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of pediatrics*. 1997; 130(3):388–93. Epub 1997/03/01. S0022-3476(97)70200-2 [pii]. PMID: [9063413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9063413/).
  49. Shahabuddin S, Al-Ayed I, Gad El-Rab MO, Qureshi MI. Age-related changes in blood lymphocyte subsets of Saudi Arabian healthy children. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998; 5(5):632–5. Epub 1998/09/08. PMID: [9729529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9729529/); PubMed Central PMCID: PMC95633.
  50. Gupta S, Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(5):1034–42. Epub 2005/03/04. S1357-2725(04)00340-1 [pii] PMID: [15743676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15743676/).
  51. Aggarwal S, Gollapudi S, Yel L, Gupta AS, Gupta S. TNF-alpha-induced apoptosis in neonatal lymphocytes: TNFRp55 expression and downstream pathways of apoptosis. *Genes and immunity*. 2000; 1(4):271–9. Epub 2001/02/24. PMID: [11196704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11196704/).
  52. Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Jarbrink M, Waldenstrom J, Adlerberth I, Wold AE, et al. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells. *J Immunol*. 2009; 183(7):4360–70. Epub 2009/09/08. *jimmunol.0901091* [pii] doi: [10.4049/jimmunol.0901091](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901091) PMID: [19734224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19734224/).
  53. Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol*. 2005; 174(11):6571–6. Epub 2005/05/21. PMID: [15905493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15905493/).
  54. Schonland SO, Zimmer JK, Lopez-Benitez CM, Widmann T, Ramin KD, Goronzy JJ, et al. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood*. 2003; 102(4):1428–34. Epub 2003/04/26. PMID: [12714521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12714521/).
  55. Smith NL, Wissink E, Wang J, Pinello JF, Davenport MP, Grimson A, et al. Rapid proliferation and differentiation impairs the development of memory CD8+ T cells in early life. *J Immunol*. 2014; 193(1):177–84. Epub 2014/05/23. doi: [10.4049/jimmunol.1400553](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400553) PMID: [24850719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24850719/); PubMed Central PMCID: PMC4065808.
  56. Fuchizawa T, Adachi Y, Ito Y, Higashiyama H, Kanegane H, Futatani T, et al. Developmental changes of FOXP3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations. *Clin Immunol*. 2007; 125(3):237–46. Epub 2007/10/06. PMID: [17916446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916446/).
  57. Fujimaki W, Takahashi N, Ohnuma K, Nagatsu M, Kurosawa H, Yoshida S, et al. Comparative study of regulatory T cell function of human CD25CD4 T cells from thymocytes, cord blood, and adult peripheral blood. *Clinical & developmental immunology*. 2008; 2008:305859. Epub 2008/09/26. doi: [10.1155/2008/305859](https://doi.org/10.1155/2008/305859) PMID: [18815628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18815628/); PubMed Central PMCID: PMC2547481.
  58. Tang J, Li BQ, Ruan J, Zhang LJ. [Expression of Foxp3 in CD4+CD25high Treg cells of neonatal cord blood]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2008; 24(4):365–7. Epub 2008/04/09. PMID: [18394345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18394345/).
  59. Hrdy J, Kocourkova I, Prokesova L. Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clinical and experimental immunology*. 2012; 170(1):10–7. Epub 2012/09/05. doi: [10.1111/j.1365-2249.2012.04630.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04630.x) PMID: [22943196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22943196/); PubMed Central PMCID: PMC3444712.
  60. D'Andrea A, Goux D, De Lalla C, Koezuka Y, Montagna D, Moretta A, et al. Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *European journal of immunology*. 2000; 30(6):1544–50. Epub 2000/07/18. PMID: [10898489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10898489/).
  61. Horowitz A, Riley EM. Activation of human NK cells by malaria-infected red blood cells. *Methods Mol Biol*. 2010; 612:429–46. Epub 2009/12/25. doi: [10.1007/978-1-60761-362-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6_29) PMID: [20033658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20033658/).
  62. Bisseye C, Yindom LM, Simpore J, Morgan WD, Holder AA, Ismaili J. An engineered Plasmodium falciparum C-terminal 19-kilodalton merozoite surface protein 1 vaccine candidate induces high levels of interferon-gamma production associated with cellular immune responses to specific peptide sequences in Gambian adults naturally exposed to malaria. *Clinical and experimental immunology*. 2011; 166(3):366–73. Epub 2011/11/09. doi: [10.1111/j.1365-2249.2011.04467.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04467.x) PMID: [22059995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22059995/); PubMed Central PMCID: PMC3232385.
  63. Soulard V, Amadouji Zin M, Fitting C, Ibitokou S, Oesterholt M, Luty AJ, et al. Placental malaria-associated suppression of parasite-specific immune response in neonates has no major impact on systemic

- CD4 T cell homeostasis. *Infection and immunity*. 2011; 79(7):2801–9. Epub 2011/04/27. IAI.00203-11 [pii] doi: [10.1128/IAI.00203-11](https://doi.org/10.1128/IAI.00203-11) PMID: [21518782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21518782/); PubMed Central PMCID: [PMC3191961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3191961/).
64. Bisseye C, van der Sande M, Morgan WD, Holder AA, Pinder M, Ismaili J. Plasmodium falciparum infection of the placenta impacts on the T helper type 1 (Th1)/Th2 balance of neonatal T cells through CD4(+)/CD25(+) forkhead box P3(+) regulatory T cells and interleukin-10. *Clinical and experimental immunology*. 2009; 158(3):287–93. Epub 2009/09/18. CEI4014 [pii] doi: [10.1111/j.1365-2249.2009.04014.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04014.x) PMID: [19758375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19758375/); PubMed Central PMCID: [PMC2792824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2792824/).
  65. Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, et al. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental Plasmodium falciparum infection. *The Journal of infectious diseases*. 2006; 193(1):146–54. Epub 2005/12/03. JID35185 [pii] PMID: [16323143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16323143/).
  66. Mold JE, McCune JM. Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man. *Advances in immunology*. 2012; 115:73–111. Epub 2012/05/23. doi: [10.1016/B978-0-12-394299-9.00003-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394299-9.00003-5) PMID: [22608256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22608256/).
  67. Brustoski K, Moller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, et al. IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *J Immunol*. 2005; 174(3):1738–45. Epub 2005/01/22. 174/3/1738 [pii]. PMID: [15661939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15661939/).
  68. Finney OC, Riley EM, Walther M. Phenotypic analysis of human peripheral blood regulatory T cells (CD4+FOXP3+CD127lo/-) ex vivo and after in vitro restimulation with malaria antigens. *European journal of immunology*. 2010; 40(1):47–60. Epub 2009/10/31. doi: [10.1002/eji.200939708](https://doi.org/10.1002/eji.200939708) PMID: [19877016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19877016/).
  69. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202(8):1075–85. Epub 2005/10/19. PMID: [16230475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16230475/); PubMed Central PMCID: [PMC2213209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2213209/).
  70. Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, Moewes B, Radbruch A, Moretta L, et al. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *European journal of immunology*. 2005; 35(8):2452–8. Epub 2005/07/06. PMID: [15997468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15997468/).
  71. Brickley EB, Wood AM, Kabyemela E, Morrison R, Kurtis JD, Fried M, et al. Fetal origins of malarial disease: cord blood cytokines as risk markers for pediatric severe malarial anemia. *The Journal of infectious diseases*. 2015; 211(3):436–44. Epub 2014/08/21. doi: [10.1093/infdis/jiu454](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu454) PMID: [25139023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25139023/); PubMed Central PMCID: [PMC4296172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4296172/).
  72. Kabyemela E, Goncalves BP, Prevots DR, Morrison R, Harrington W, Gwamaka M, et al. Cytokine profiles at birth predict malaria severity during infancy. *PloS one*. 2013; 8(10):e77214. Epub 2013/10/17. doi: [10.1371/journal.pone.0077214](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077214) PMID: [24130857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24130857/); PubMed Central PMCID: [PMC3795067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3795067/).
  73. Gbedande K, Varani S, Ibitokou S, Houngbegnon P, Borgella S, Nouatin O, et al. Malaria modifies neonatal and early-life toll-like receptor cytokine responses. *Infection and immunity*. 2013; 81(8):2686–96. Epub 2013/05/22. IAI.00237-13 [pii] doi: [10.1128/IAI.00237-13](https://doi.org/10.1128/IAI.00237-13) PMID: [23690399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23690399/); PubMed Central PMCID: [PMC3719572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3719572/).
  74. Chelimo K, Embury PB, Sumba PO, Vulule J, Ofulla AV, Long C, et al. Age-related differences in naturally acquired T cell memory to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1. *PloS one*. 2011; 6(9):e24852. Epub 2011/09/22. doi: [10.1371/journal.pone.0024852](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024852) PONE-D-11-07864 [pii]. PMID: [21935482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21935482/); PubMed Central PMCID: [PMC3174209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3174209/).
  75. Ateba Ngoa U, Zinsou JF, Kassa RF, Ngoune Feugap E, Honkpehedji YJ, Massinga-Loembe M, et al. Assessment of the effect of Schistosoma haematobium co infection on malaria parasites and immune responses in rural populations in Gabon: study protocol. *SpringerPlus*. 2014; 3:388. Epub 2014/08/15. doi: [10.1186/2193-1801-3-388](https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-388) PMID: [25120947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25120947/); PubMed Central PMCID: [PMC4128953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4128953/).
  76. Hartgers FC, Obeng BB, Kruijze YC, Dijkhuis A, McCall M, Sauerwein RW, et al. Responses to malarial antigens are altered in helminth-infected children. *The Journal of infectious diseases*. 2009; 199(10):1528–35. Epub 2009/04/28. doi: [10.1086/598687](https://doi.org/10.1086/598687) PMID: [19392626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19392626/).
  77. Wammes LJ, Hamid F, Wiria AE, de Gier B, Sartono E, Maizels RM, et al. Regulatory T cells in human geohelminth infection suppress immune responses to BCG and Plasmodium falciparum. *European journal of immunology*. 2010; 40(2):437–42. Epub 2010/01/12. doi: [10.1002/eji.200939699](https://doi.org/10.1002/eji.200939699) PMID: [20063313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20063313/).
  78. Ateba-Ngoa U, Mombo-Ngoma G, Zettlmeissl E, van der Vlugt LE, de Jong S, Matsiegui PB, et al. CD4+CD25hiFOXP3+ cells in cord blood of neonates born from filaria infected mother are negatively associated with CD4+Tbet+ and CD4+ROrgamma+ T cells. *PloS one*. 2014; 9(12):e114630. Epub 2014/12/23. doi: [10.1371/journal.pone.0114630](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114630) PMID: [25531674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25531674/); PubMed Central PMCID: [PMC4273973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4273973/).

79. Menzies SK, Rodriguez A, Chico M, Sandoval C, Broncano N, Guadalupe I, et al. Risk factors for soil-transmitted helminth infections during the first 3 years of life in the tropics; findings from a birth cohort. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014; 8(2):e2718. Epub 2014/03/04. doi: [10.1371/journal.pntd.0002718](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002718) PMID: [24587469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24587469/); PubMed Central PMCID: PMC3937274.

**ARTICLE 3: Infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy affect VAR2CSA DBL5 domain-specific T cell cytokine responses**

Gbédandé Komi<sup>1,2,3</sup>, Gilles Cottrell<sup>3,4</sup>, Bertin Vianou<sup>1</sup>, Samad Ibitokou<sup>1</sup>, Aurax Fernando<sup>1</sup>, Marita Troye-Blomberg<sup>5</sup>, Ali Salanti<sup>6</sup>, Kabirou Moutairou<sup>2</sup>, Achille Massougbodji<sup>1</sup>, Nicaise Tuikue Ndam<sup>1,3,4</sup>, Philippe Deloron<sup>3,4</sup>, Adrian J F Luty<sup>3,4</sup>†, Nadine Fievet<sup>1,3,4</sup>†

**Journal: Malar J 2016; Volume: 15; DOI: 10.1186/s12936-016-1525-x**

**Présentation au congrès:**

- October 2013 : **MIM congress « Pan-African Malaria Conference » in Durban, South Africa. Poster**
- November 2014: **ASTMH 63rd Annual Meeting, New Orleans, USA. Poster**
- November 2015: **6th Infectious Diseases in Africa Symposium: Biomarkers and correlates of immune control in HIV, TB and Malaria. Cape Town, South Africa. Poster**

L'ensemble des études sur l'immunité anti-VAR2CSA spécifique du PAG chez l'homme concerne exclusivement les réponses humorales. Des données similaires sur l'activité des cellules T spécifiques à la protéine VAR2CSA sont rares. La disponibilité de ces informations pourrait être un atout important pour le développement d'un vaccin contre le PAG. La génération des lymphocytes B mémoires produisant des anticorps spécifiques de forte affinité requière la participation et l'aide des lymphocytes T via les cytokines nécessaires à la stimulation des récepteurs cytokiniques des cellules B [269, 270]. Afin de mieux comprendre l'apport des lymphocytes T dans l'immunité anti-VAR2CSA, nous avons caractérisé les cellules T sécrétrices de l'IFN- $\gamma$  et aussi la mesure des cytokines dans les surnageants de culture spécifique à la protéine VAR2CSA-DBL5.

Pour des raisons techniques et financières, ce travail a été réalisé sur un sous échantillon des femmes enceintes incluses dans le projet STOPPAM, un suivi clinique et parasitologique de 1037 femmes enceintes de l'inclusion à l'accouchement. Pour l'étude des réponses des cellules T, 142 femmes ont été sélectionnées à l'inclusion et 125 à l'accouchement. Selon le statut infectieux palustre diagnostiqué par TDR et goutte épaisse, deux sous groupes (infecté et non infecté) ont été constitué au début de la grossesse alors qu'à l'accouchement, les 125 femmes ont été subdivisées en trois sous groupes selon l'histoire palustre durant la grossesse (non infecté, exposé et infecté). Les femmes infectées ont été ajustées selon l'âge gestationnel et la parité avec les femmes non infectées.

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées et stimulées avec la un mitogène, PHA et la protéine VAR2CSA-DBL5 afin de :

- caractériser les cellules T CDR4+ et CD8+ sécrétrices d' IFN- $\gamma$  par un marquage intracytoplasmique avec les anticorps monoclonaux (anti-CD4, anti-CD8, anti-IFN- $\gamma$ ) à l'aide de la cytométrie en flux
- mesurer les concentrations de cytokines (IFN- $\gamma$ , IL6, IL10, IL-13, IL17 et TNF- $\alpha$ ) dans le surnageants de culture après 20 heures de stimulation via la technique CBA.

L'infection palustre à l'inclusion est associée à une forte production de TNF- $\alpha$  en réponse à la PHA (non spécifique) alors que l'infection palustre à l'accouchement est associée à une faible production d'IL-10 en réponse à la PHA et au VAR2CSA-DBL5 (stimulation spécifique). L'infection palustre au cours de la grossesse est associée à une réponse proinflammatoire (spécifique et non spécifique) plus élevée à l'accouchement avec une forte production d'IFN- $\gamma$  en réponse à la PHA et au VAR2CSA. Les femmes ayant fait plusieurs infections palustres pendant la grossesse ont des fréquences de cellules T CD8 sécrétrices de l'IFN- $\gamma$  spécifique à la protéine VAR2CSA-DBL5 plus faibles alors que chez ces mêmes femmes le niveau d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants de culture est plus élevé en réponse à la PHA et VAR2CSA-DBL5. Une analyse prospective montre que l'augmentation d'une réponse proinflammatoire non spécifique (PHA) au début de la grossesse est associée à un risque plus élevé d'infection palustre au cours de grossesse.


Ces résultats sur l'évaluation quantitative et qualitative des réponses cellulaires spécifiques à la protéine VAR2CSA (candidat vaccin contre le PAG) contribueront à l'élaboration du candidat vaccin pour la prévention du paludisme associé à la grossesse.

RESEARCH

Open Access



# Infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy affect VAR2CSA DBL-5 domain-specific T cell cytokine responses

Komi Gbédandé<sup>1,2,3</sup> , Gilles Cottrell<sup>1,3,4</sup>, Bertin Vianou<sup>1</sup>, Samad Ibitokou<sup>1</sup>, Aurax Fernando<sup>1</sup>, Marita Troye-Blomberg<sup>5</sup>, Ali Salanti<sup>6</sup>, Kabirou Moutairou<sup>2</sup>, Achille Massougbodji<sup>1</sup>, Nicaise Tuikue Ndam<sup>1,3,4</sup>, Philippe Deloron<sup>3,4</sup>, Adrian J. F. Luty<sup>3,4†</sup> and Nadine Fievet<sup>1,3,4\*†</sup>

## Abstract

**Background:** Current knowledge of human immunological responses to pregnancy-associated malaria-specific *Plasmodium falciparum* protein VAR2CSA concerns almost exclusively B cell-driven antibody-mediated activity. Knowledge of VAR2CSA-specific T cell-mediated activity is minimal by comparison, with only a single published report of a study investigating VAR2CSA-derived peptide-specific T cell responses. The study described here represents an attempt to redress this balance.

**Methods:** Within the framework of a cohort study of 1037 pregnant Beninese, sub-groups were selected on the basis of the documented presence/absence of infection with *P. falciparum* and conducted detailed immunological assessments both at inclusion into the study and at delivery. Peripheral blood mononuclear cells were isolated, stimulated in vitro, and VAR2CSA DBL-5 domain-specific, IFN- $\gamma$ -secreting T-cell frequencies and cytokine responses were quantified using flow cytometric techniques. Multivariate analyses were used to determine primarily whether the T cell-mediated DBL5-specific activity measured was associated with infection by *P. falciparum* adjusted for gravidity, anaemia and other cofactors.

**Results:** Infections with *P. falciparum* detected at inclusion were associated with enhanced non-specific TNF responses, whilst diminished non-specific and DBL-5-specific IL-10 responses were associated with infections detected at delivery. Infections during pregnancy led to enhanced non-specific and DBL-5-specific IFN- $\gamma$  responses detectable at delivery but to concomitantly lower DBL-5-specific CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  responses. Prospective assessments indicated that non-specific pro-inflammatory responses detectable at inclusion in the study were associated with the occurrence of infections subsequently during pregnancy.

**Conclusions:** The findings represent a first step in elucidating the quantity and quality of cellular immunological responses to VAR2CSA, which will help in the development of the primary vaccine candidate for prevention of pregnancy-associated malaria.

**Keywords:** Malaria, Pregnancy, VAR2CSA, Cytokines, T cells

## Background

Pregnancy-associated malaria (PAM) due to infection with *Plasmodium falciparum* is a well-recognized,

preventable cause of morbidity and mortality that impacts maternal, neonatal and infant health [1, 2]. Prevention of PAM currently relies on the distribution of long-lasting insecticide-impregnated nets (LLINs) and use of the anti-malarial drug combination sulfadoxine-pyrimethamine (SP) for intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp). The World Health Organization (WHO) now recommends SP-IPTp given at

\*Correspondence: nadine.fievet@ird.fr

†Adrian J. F. Luty and Nadine Fievet contributed equally to this work

<sup>3</sup> Institut de Recherche pour le Développement, MERIT UMR D216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Paris, France

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



least three times with monthly spacing during pregnancy, beginning in the second trimester. Both those existing tools suffer from significant insufficiencies in distribution and uptake as well as from the fact that resistance of *Anopheles* mosquitoes to insecticides and of *P. falciparum* parasites to SP, is now widespread across sub-Saharan Africa [3]. A vaccine to prevent PAM would thus represent a valuable addition to the current set of tools available.

The study described here formed part of the EU FP7-funded STOPPAM project (strategies to prevent pregnancy-associated malaria). STOPPAM aimed to generate the information necessary to accelerate the development of a vaccine to prevent PAM by conducting in-depth longitudinal studies of large numbers of pregnant women in Benin and Tanzania. Malaria infection may occur any time during the 9 months of pregnancy. The STOPPAM cohort enabled to demonstrate that early infection during pregnancy is associated with higher risk of low birth weight and anemia at delivery [4, 5]. The results of those studies pointed strongly towards the existence of a naturally acquired antibody-mediated form of immunity that rendered multigravidae women significantly less at risk of PAM than first-time mothers [6], with the consensus that the primary target of the antibodies induced is a parasite-derived protein called VAR2CSA. Antibodies prevent the binding of infected erythrocytes, via the VAR2CSA expressed on their surface membranes, to their specific placental receptor, namely chondroitin sulphate A (CSA) expressed by syncytiotrophoblast [7, 8]. A wealth of information has been generated on multiple aspects of VAR2CSA-specific antibodies and the B cells responsible for their production [9–11]. Typically, VAR2CSA-specific IgG responses have been shown to display a strong gender- and gravidity-specific profile, pointing to the acquisition of protection against PAM during successive pregnancies [12–14]. Similar information on T cell-specific response to VAR2CSA is virtually non-existent.

The availability of such information could clearly be a valuable adjunct in the context of ongoing efforts to develop a vaccine to prevent PAM, since immunological memory requires the induction of antigen-specific T-cell cytokine-driven help for the efficient generation of B cells producing isotype-switched, affinity-matured, functionally active antibodies [15–17]. The VAR2CSA-DBL-5 domain displays highly strain-transcendent epitopes suggesting a role for additive or synergistic vaccine strategies that would combine both broad adhesion-blocking and opsonizing antibody responses to prevent high-density placental infections associated with disease [18].

The aim of the study described here was to investigate the T-cell responses to the DBL-5 domain (in 2008 it was considered one of the leading such candidates)

in a cohort of pregnant women naturally exposed to malaria during their pregnancies. The authors' hypothesis was that infections occurring during pregnancy versus infections occurring only at delivery would have differential impacts on immune responses. Within the well-documented STOPPAM cohort, the study focused on two specific sub-groups in order to investigate: (i) cellular immunological responses early in pregnancy as a predictor of *P. falciparum* infections during pregnancy; (ii) consequences of malaria and anaemia events during pregnancy and at delivery on immune responses at delivery.

## Methods

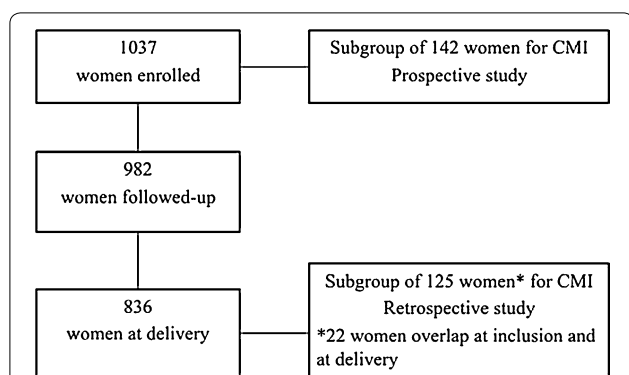
### Study design

The STOPPAM project 'strategies to prevent pregnancy associated malaria' was conducted in Benin and Tanzania between November 2008 and April 2011. In Benin, the study took place in the district of Come, Mono Province, located 70 km west of the economic capital, Cotonou. Malaria transmission in the area has two peaks during the rainy seasons (from April to July, and from September to November). The entomological inoculation rate is 35–60 infective bites per person per year [19]. The STOPPAM study design has been described in detail elsewhere [5]. Some 1037 women under 24 weeks of gestation were enrolled in three antenatal clinics: Come, Akodeha and Ouedeme Pedah. They were followed monthly with clinical and parasitological surveillance up to and including delivery. According to national policy at the time of the study, pregnant women received IPTp with SP during their scheduled antenatal clinic visits (ANV). Women diagnosed with a clinical malaria attack (axillary temperature  $\geq 37.5$  °C with a positive malaria rapid diagnostic test (RDT) and/or a positive TBS) received a full treatment course of quinine. In the case of clinical symptoms between ANV, mothers were encouraged to attend the maternity clinic to receive care.

For the study of CMI (cellular mediated immunity) to a recombinant protein corresponding to the DBL-5 domain of the PAM-associated parasite-derived VAR2CSA protein antigen in vitro described here, it was unrealistic to investigate all the women due primarily to cost considerations. The study, therefore, worked only on sub-groups of 142 women at inclusion and 125 at delivery selected within the 1037 women (the target figure was 150 at each time point) (Fig. 1).

1. First at inclusion, women were selected harbouring *P. falciparum* infections and a similar number of mothers with no infection.
2. At delivery, women were selected with the malaria history during pregnancy: (i) those who remained





**Fig. 1** Study design. Within the STOPPAM cohort, the study focused on two specific sub groups in order to investigate: (i) cellular immunological responses early in pregnancy as a predictor of *P. falciparum* infections during pregnancy; (ii) consequences of malaria and anaemia events during pregnancy and at delivery on immune responses at delivery. At inclusion, 142 women were selected harbouring *P. falciparum* infections and a similar number of mothers with no infection. At delivery, 125 women were selected with the malaria history during pregnancy: (i) those who remained uninfected throughout, (ii) those who had had at least one infection during pregnancy but who were not infected at delivery and a third group (iii) who were infected at delivery but who had varying histories of infection during pregnancy

uninfected throughout, (ii) those who had had at least one infection during pregnancy but who were not infected at delivery and (iii) a third group who were infected at delivery but who had varying histories of infection during pregnancy.

Only 22 women were represented in both the inclusion and delivery sub-groups.

**Blood collection, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) preparation**

Peripheral venous blood samples (10 ml) were collected at different times (inclusion and/or delivery) in tubes containing citrate phosphate dextrose adenine (CPDA). All samples were transported within 4 h to the laboratory of the research centre for malaria during pregnancy and infancy (CERPAGE). PBMC were immediately isolated by density gradient centrifugation on Ficoll (Fisher Scientific, UK) and freshly isolated cells were used for immunological assays.

***Plasmodium falciparum* infection status**

Clinical and parasitological data were collected from mothers at each ANV and also at delivery. Parasitological status with respect to *P. falciparum* infection was determined using a RDT (Parascreen; Zephyr Biomedical Systems), as well as through routine microscopical examination of thick blood smears (TBS) and quantitative PCR

(qPCR) on dried blood spots. Briefly, TBS were prepared, stained with Giemsa and examined by two experienced technicians for the presence and density of parasites. qPCR was performed after DNA extraction from blood spots dried on filter paper using the Chelex method, as described elsewhere [20]. At delivery, TBS were made from both peripheral and placental blood samples, such that maternal infection status at delivery was defined by the presence of parasites in either the placental and/or maternal peripheral blood.

Infection with *P. falciparum* was defined as a positive RDT and/or a positive TBS. Women with a positive PCR result but a negative blood smear and negative RDT result constituted a separate group identified as having sub-microscopic infections (SMI).

**PBMC stimulation and cytokine quantification**

$3 \times 10^5$  PBMC were cultured in 5 ml round-bottomed tubes (BD Biosciences) in 300  $\mu$ l of complete medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % L-glutamine, 50  $\mu$ g/ml gentamycin; Lonza) to which costimulatory receptors CD28/CD49d (2  $\mu$ l/ml, BD Biosciences, Grenoble, France) were added or were either left unstimulated or stimulated either with mitogen (PHA 5  $\mu$ g/ml, Sigma, France) or VAR2CSA DBL-5 antigen (5  $\mu$ g/ml, a gift from Ali Salanti, was cloned into Baculovirus Centre for Medical Parasitology, University of Copenhagen), as described [21]. Cell cultures were incubated for 20 h at 37 °C in an atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>. Cell-free culture supernatants (150  $\mu$ l) were collected after centrifugation of the tubes (at 450 g for 8 min) and subsequently stored in 50- $\mu$ l aliquots at -80 °C prior to thawing for cytokine measurements.

IL-10, IL-13, IL-17, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), and TNF were quantified in culture supernatants using a commercially available cytometric bead array (CBA soluble protein Flex set assay; BD Biosciences, Grenoble, France), conducted according to manufacturer’s instructions on a FACSCalibur 4-colour cytometer. The assay sensitivity was 0.13 pg/ml for IL-10, 0.6 pg/ml for IL-13, 0.3 pg/ml for IL-17, 0.8 pg/ml for IFN- $\gamma$ , and 1.2 pg/ml for TNF. When the cytokine concentration in a sample was below the detection limit of the test, an arbitrary value was assigned that corresponded to half of the sensitivity value for the specific cytokine concerned. Results were formatted using the BD CBA analysis software (FCAP array). The choice of these cytokines relies on their role in malaria immunity. The choice of these cytokines relies on their role in malaria immunity and the fact that the authors wished to target, as far as possible, cytokines produced exclusively or primarily by T cells. Placental malaria is associated with increased frequency of IFN- $\gamma$  and TNF producing T lymphocytes suggesting an

important role of those cells and cytokines in protection [22]. The concentrations of the IL-10, TNF, and IFN- $\gamma$  have been shown to be increased in placental or peripheral plasma in women with PAM [9, 23, 24].

#### Frequencies of IFN- $\gamma$ -secreting T cells assessed by flow cytometry

$1 \times 10^6$  PBMC were cultured in 1 ml of medium under the conditions described above except that, after 12 h of stimulation, secretion of proteins was inhibited by the addition of GolgiStop reagent (1  $\mu$ l for 1 ml of culture medium). After 20 h' incubation at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, cells were spin-washed with PBS-3 % FCS at 450 g for 8 min. IFN- $\gamma$  intra-cellular staining was performed according to manufacturer's recommendations (BD Biosciences), all incubation steps being done in the dark. Briefly, 5  $\mu$ l of FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) were added to cells from each culture condition. After incubating the cells for 15 min at 4 °C they were labelled by adding 5  $\mu$ l of anti-CD8-FITC (BD Biosciences), and 5  $\mu$ l of anti-CD4-PerCP (BD Biosciences). Cells were lightly vortexed and incubated for a further 30 min at 4 °C. After spin-washing once at 450 g for 8 min with PBS-3 % FCS, the cells were resuspended in Perm-Wash Buffer (BD Biosciences) for 20 min at 4 °C. After again spin-washing with Perm-Wash Buffer, 3  $\mu$ l anti-IFN- $\gamma$ -PE (BD Biosciences) were added and cells incubated at 4 °C for 30 min. Finally, cells were spin-washed again with Perm-Wash Buffer and acquired on the flow cytometer (BD FACS Calibur).

#### Statistical analysis

The associations between maternal characteristics or pregnancy outcomes and cytokine responses or frequencies of T cell secreting IFN- $\gamma$ , using univariate followed by multivariate linear regression, using robust variance estimation were investigated. The analyses were thus performed in two steps: first a univariate model which aimed to identify potential confounders and the crude associations between cytokine responses and the pregnancy outcomes using the non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. In a second step, association leading to a p value less than 0.2 were selected for the following multivariate model. The baseline characteristics subsequently selected for inclusion in the multivariate analyses were gravidity, maternal anemia (Hb < 11 g/dl), premature birth (<37 weeks) and *P. falciparum* infection (microscopic and sub-microscopic).

Following the hypothesis, the profile of DBL-5-specific cellular immunological responses observed at delivery should reflect exposure to *P. falciparum* infection during pregnancy, but that the presence of infection at delivery could alter or mask such profiles. The detailed infection

histories that were collected from STOPPAM mothers via the close surveillance conducted between inclusion into the study and delivery benefit to better elucidate these issues. Those histories allowed to split the delivery sub-group in three groups of women: (i) those who remained uninfected throughout; (ii) those who had had at least one infection during pregnancy but who were not infected at delivery; and a third group, and (iii) who were infected at delivery but had varying histories of infection during pregnancy.

Statistical significance in all multivariate analyses was considered if p values were <0.05. All analyses were performed using the Stata/MP 12.0 (StataCorp, College Station, TX, USA) and graphs were made with GraphPad (Prism 6.0).

## Results

### Characteristics of the study population

Table 1 gives an overview of the sub-groups' characteristics. In terms of their gravidity, their age distribution, as well as of the proportions of low birth weight (LBW) babies and of anaemic mothers, the sub-groups displayed broadly similar profiles. Since the presence of infection with *P. falciparum* was a criterion for entry into the sub-groups both at inclusion and at delivery, it is according to expectation that those parameters differ markedly between the sub-groups. In the sub-group selected at inclusion, 50 % were infected according to the results of examination of TBS whilst 19 % of the same individuals were found to be infected at delivery. In the sub-group

**Table 1 Study population characteristics**

	Inclusion sub-group (n = 142) <sup>a</sup>	Delivery sub-group (n = 125) <sup>a</sup>
Primigravid	38	23
Secundi-/multi-gravid	104	102
Age, mean (SD) in years	25 (6)	26 (6)
Gravidity score, mean (SD)	2.9 (1.9)	3.2 (1.9)
% Low birth weight (LBW: <2500 g)	13	15
% Anemic (Hb < 11 g/dl)		
At inclusion	70	60
At delivery	42	41
At inclusion		
<i>P. falciparum</i> infected, n (%)		
Microscopy	71 (50)	25 (14)
PCR	19 (13)	34 (25)
At delivery		
<i>P. falciparum</i> infected, n (%)		
Microscopy	20 (19)	37 (30)
PCR	36 (20)	37 (30)

<sup>a</sup> 22 women overlap at inclusion and at delivery

selected at delivery, 30 % were infected according to TBS whilst 14 % of the same individuals were found to be infected at inclusion. PCR-based detection consistently augmented the proportions found to be infected regardless of the sub-group or the time-point concerned. For reference purposes, one can note that in the whole STOP-PAM cohort infections were detected by microscopy (of TBS) and PCR in, respectively, 16 and 40 % mothers at inclusion, compared with 11 and 34 % at delivery [4]. All microscope-positive TBS were also PCR positive.

**Cytokine responses of PBMC at inclusion and at delivery**

PBMC from the two different sub-groups of pregnant women at inclusion and at delivery were stimulated with mitogen (PHA) or with the recombinant protein DBL-5. The cytokines IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF were quantified in culture supernatants. All data are presented after subtraction of cytokine concentrations in the supernatants of unstimulated PBMC from those in supernatants of stimulated cells (Table 2). Notably, IL-17 was present at low levels after mitogen stimulation but was undetectable in unstimulated and DBL-5-stimulated samples. The other cytokines quantified were present, as expected, at appreciable levels following mitogen stimulation, whilst DBL-5 stimulated appreciable production of both IL-10 and TNF, but comparatively little IFN- $\gamma$  or IL-13. Regardless of the mitogen stimulation, the concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13 and TNF and only for TNF after DBL-5 stimulation were consistently lower in supernatants of cultures of PBMC taken at delivery compared to those of PBMC taken at inclusion (Table 2; see Additional file 1). A similar pattern was evident with respect to the frequencies of T cells secreting IFN- $\gamma$  as detected by intracellular staining (Table 3). Thus, regardless of cell type (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) the frequencies of T cells producing IFN- $\gamma$  following mitogen stimulation of PBMC at delivery were significantly lower than the frequencies observed at inclusion (univariate analysis  $p = 0.0013$ ,  $p = 0.0002$  respectively), whilst the frequencies detected

following stimulation with the parasite-specific DBL-5 protein were similar at the two time-points (Table 3).

**The influence of maternal anaemia and gravidity on the cytokine responses of PBMC at inclusion and delivery**

Multivariate analyses showed anaemia at delivery to be associated with a significantly higher TNF response to PHA ( $p = 0.01$ ) at delivery, but no other associations were evident. Univariate analyses (Fig. 2), comparing PBMC at delivery of primigravidae with those of secundi-/multi-gravidae women ( $\geq$ two pregnancies), revealed higher frequencies of DBL-5-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells ( $p = 0.06$  and  $p = 0.019$ , respectively) in multigravid compared to primigravid women at delivery. Multivariate analyses controlling for maternal anaemia, premature birth and *P. falciparum* infection did not reveal significant associations with gravidity.

**The influence of current *P. falciparum* infections either at inclusion or at delivery on cytokine responses of PBMC on both inclusion and delivery sub-groups respectively**

Since there was no a priori knowledge of the possible effects of sub-microscopic *P. falciparum* infections (those identified solely by PCR) on the cellular immunological parameters were assessed, it was important to first determine whether the differences seen in those parameters were detectable as a function of the presence of such infections or not [4]. In univariate analyses comparing either cytokine concentrations in supernatants or the frequencies of IFN- $\gamma$ -producing T-cells, for both stimulus (PHA/DBL-5) and at either time-point, there were no discernible differences or marked trends that distinguished the groups with sub-microscopic infections from those either with microscopic or with no infections (data not shown). Nevertheless, for subsequent multivariate analyses those identified solely by PCR as being infected, i.e., truly sub-microscopic infections were considered separately as a group (SMI) for comparison of their

**Table 2 Cytokine concentrations in culture supernatants following in vitro stimulation of PBMC**

	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF	IL-13
Inclusion (n = 130) <sup>a</sup>				
PHA	643 (216–1291)	4807 (1759–9021)	8567 (5081–14,620)	684 (291–1205)
DBL-5	341 (0.06–847)	0.4 (0.4–259)	3710 (1643–6872)	0.3 (0.3–13)
Delivery (n = 109) <sup>a</sup>				
PHA	233 (0.06–1261) <sup>b</sup>	1303 (332–4326) <sup>b</sup>	6279 (3404–9470) <sup>b</sup>	364 (65–757) <sup>b</sup>
DBL-5	195 (0.06–712)	0.4 (0.4–0.4)	2568 (1521–4981) <sup>b</sup>	0.3 (0.3–0.3)

Values are median concentrations (IQR) in pg/ml

<sup>a</sup> Numbers are reduced due to insufficient quantities of PBMC to perform all assays

<sup>b</sup> Cytokine concentration significantly lower than corresponding concentration in supernatants of PBMC at inclusion ( $p < 0.05$  in all cases)

**Table 3** The frequencies of IFN- $\gamma$ -secreting cells following *in vitro* stimulation of PBMC

	% IFN- $\gamma$ secreting CD4 <sup>+</sup> T cells	% IFN- $\gamma$ secreting CD8 <sup>+</sup> T cells
Inclusion (n = 92) <sup>a</sup>		
PHA	6.95 (4.65–9.74)	6.37 (4.02–8.59)
DBL-5	1.44 (0.49–2.32)	1.71 (0.67–2.46)
Delivery (n = 61) <sup>a</sup>		
PHA	4.28 (2.85–7.08) <sup>b</sup>	3.34 (2.01–5.49) <sup>b</sup>
DBL-5	1.47 (0.65–2.02)	1.49 (0.98–2.27)

Values are median frequencies (IQR)

<sup>a</sup> Numbers are reduced due to insufficient quantities of PBMC to perform all assays

<sup>b</sup> Frequencies significantly lower than corresponding frequencies at inclusion ( $p < 0.001$  in both cases)

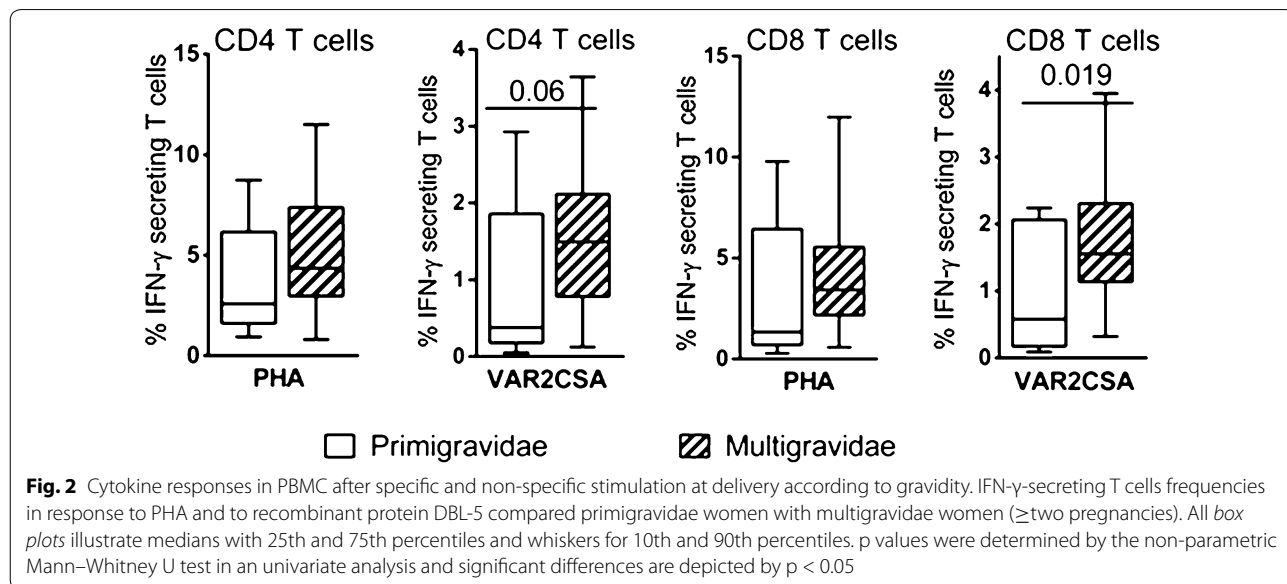
cytokine responses with those of the microscopically infected (MI) and the uninfected (UI) groups of women.

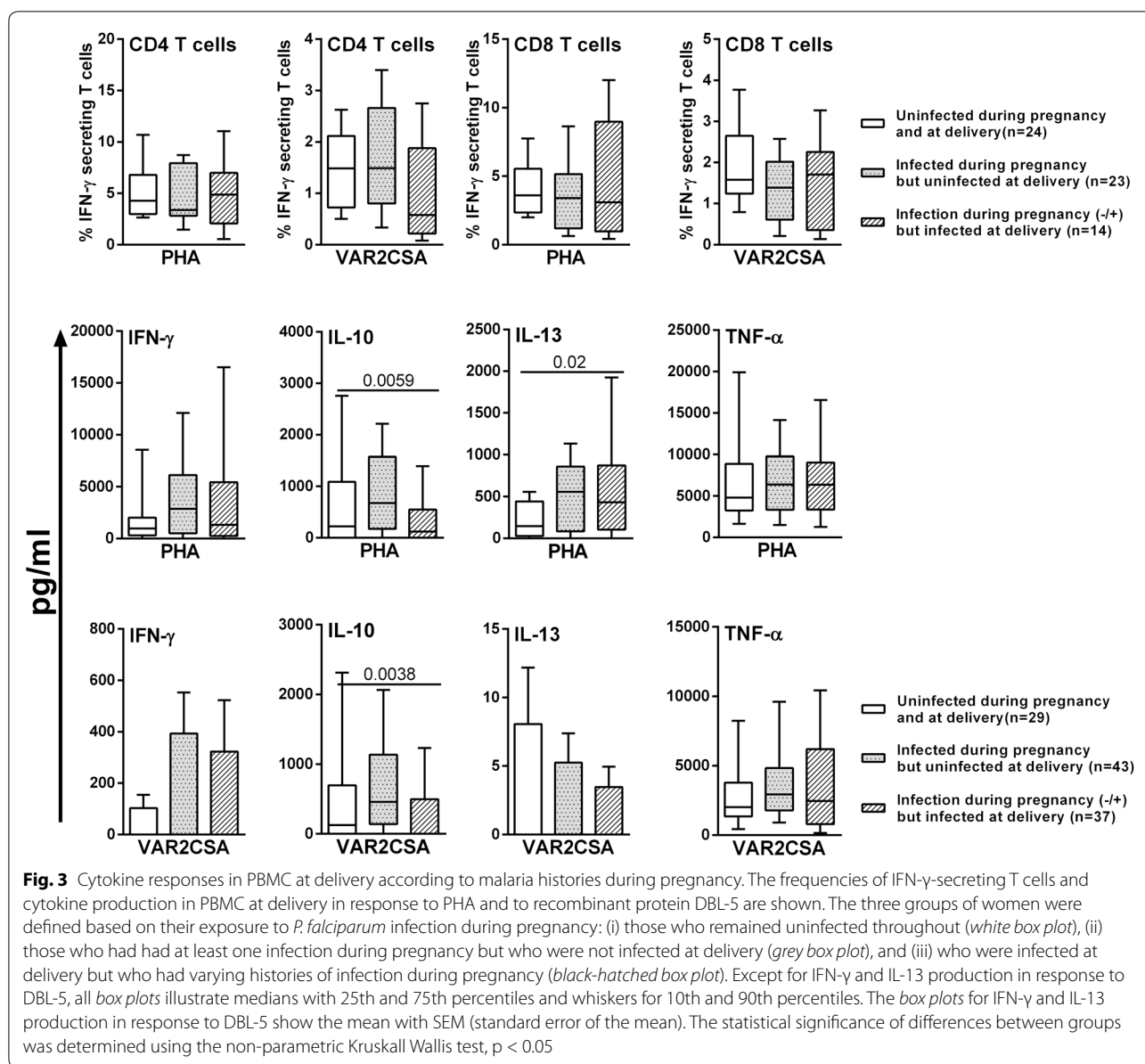
Univariate analyses of data from the inclusion sub-group revealed a significantly increased amount of mitogen-induced TNF from PBMC of the MI compared with the UI group, but this was the only difference observed between the groups UI versus MI versus SMI. For the delivery sub-group, infection at delivery was associated with a significantly diminished level of IL-10 in response to both PHA and DBL-5, as well as a significantly reduced frequency of DBL5-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells in MI versus UI. Multivariate analyses controlling for relevant confounders confirmed those observations concerning the differing profiles of production of TNF at inclusion and of IL-10 at delivery in PBMC of the MI group.

**The influence of *Plasmodium falciparum* infections during pregnancy and/or at delivery on cytokine responses of PBMC from the delivery sub-group**

The profile of DBL-5-specific cellular immunological responses observed at delivery was predicted to reflect exposure to *P. falciparum* infection during pregnancy, but the presence of infection at delivery could alter or mask such profiles. In order to better elucidate these issues use was made of the detailed infection histories that were collected from STOPPAM mothers via the close surveillance conducted between inclusion into the study and delivery. Those histories allowed identification of three groups of women described in the methods, (i) those who remained uninfected throughout, (ii) those who had had at least one infection during pregnancy but who were not infected at delivery and a third group (iii) who were infected at delivery but who had varying histories of infection during pregnancy. Figure 3 illustrates the cytokine responses of these three groups reflecting exposure or not to *P. falciparum* infection during pregnancy, revealing that infection at delivery is associated with a reduction in IL-10 responses both to mitogen and to DBL-5. Multivariate analyses showed that PBMC at delivery of mothers with a history of infection during pregnancy but who were uninfected at delivery displayed significantly increased production of IFN- $\gamma$  in response to both PHA and DBL-5 stimulation ( $p = 0.003$  and  $p = 0.037$ , respectively) as well as increased PHA-specific IL-13 ( $p = 0.001$ ) compared to PBMC of uninfected women (Fig. 4).

Separately, the relationships between the cumulated number of *P. falciparum* infections during pregnancy and the cytokine profile displayed by PBMC





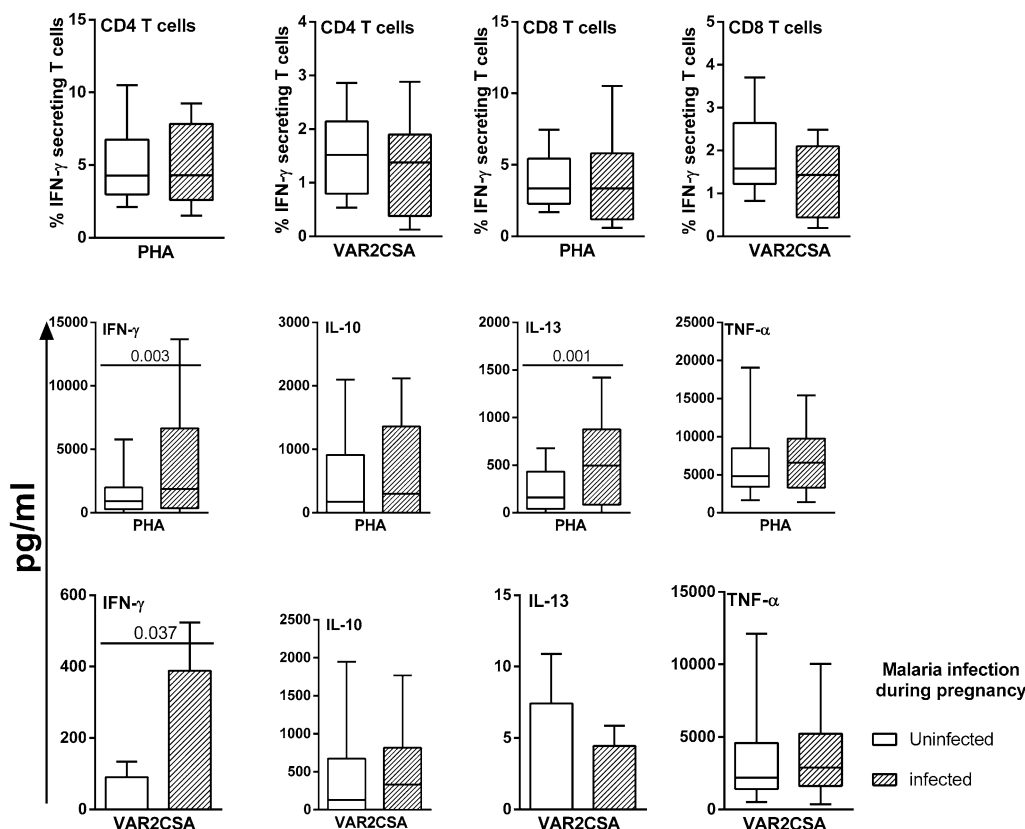
at delivery were also examined, segregating women into three groups: (i) uninfected during pregnancy, (ii) one *P. falciparum* infection during pregnancy, and (iii) two or more *P. falciparum* infections during pregnancy, excluding those with infections at delivery from these analyses. Multivariate analyses that adjusted for potential confounders (anaemia, gravidity, premature birth), revealed significantly higher levels of IFN- $\gamma$  ( $p = 0.004$ ) and IL-13 ( $p = 0.019$ ) in response to PHA and a significantly higher level of IFN- $\gamma$  ( $p = 0.04$ ) in response to DBL-5 of PBMC from mothers more often infected during pregnancy compared to uninfected mothers (data not shown). These analyses also

revealed a lower frequency of DBL-5-specific IFN- $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> T cells ( $p = 0.022$ ) as a function of increasing numbers of *P. falciparum* infections during pregnancy.

#### Cellular immunological responses at inclusion as a predictor of *Plasmodium falciparum* infections during pregnancy

Whether the cytokine responses or frequencies of IFN- $\gamma$ -secreting T cells upon in vitro stimulation at inclusion were predictive of *P. falciparum* infections during pregnancy were determined. Multivariate analysis revealed independent associations for an increased risk of *P.*





**Fig. 4** Cytokine responses of PBMC at delivery according to *P. falciparum* infections during pregnancy. The frequencies of IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and cytokine production in PBMC at delivery in response to PHA or to the recombinant protein DBL-5 are shown. Excluding malaria infections at delivery and according to malaria infection during pregnancy, two groups were defined with uninfected women (white) and infected women (black). Excepted for IFN- $\gamma$  and IL-13 production in response to DBL-5, all box plots illustrate medians with 25th and 75th percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles. The box plots for IFN- $\gamma$  and IL-13 production in response to DBL-5 indicate the mean with SEM (standard error of the mean). The statistical significance was determined using multivariate analysis model,  $p < 0.05$

*falciparum* infection during pregnancy with (i) higher TNF, and (ii) a higher frequency of IFN- $\gamma$  secreting CD8<sup>+</sup> T cells, both in response to PHA ( $p = 0.04$ ,  $p = 0.051$ , respectively), at enrolment.

**Discussion**

This study was designed to generate information to allow both prospective and retrospective analyses of the interactions between cellular immunological responses and infections with *P. falciparum* during pregnancy. The prospective analyses revealed two main findings concerning, on the one hand, non-specific CD8<sup>+</sup> T-cell IFN- $\gamma$  responses, and on the other, non-specific TNF responses. In the first case, women more likely to be re-infected during pregnancy were those in whom an elevated non-specific CD8<sup>+</sup> T-cell IFN- $\gamma$  response was detectable at inclusion. Notably here is the fact that, in retrospective analyses, antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell IFN- $\gamma$  responses declined as a function of increasing numbers

of re-infections. These findings could point to CD8<sup>+</sup> T cell IFN- $\gamma$  responses as being detrimental in the context of protection from *P. falciparum* infections during pregnancy. These observations in this context are novel and merit further investigation. Asexual blood stage parasite-antigen specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses are a documented feature of controlled human malaria infections in adults [25]. The function, if any, of such cells remains a paradox given that their potential targets, erythrocytes, do not express HLA Class I molecules. Based on studies in a mouse malaria model it is conjectured that they may have a ‘bystander’ role concerning activation of phagocytic activity [26].

The second finding from prospective analyses concerned elevated non-specific TNF responses at inclusion that were a prognostic marker for subsequent infections. This observation is clearly incompatible with the purported protective role against infection detected at delivery attributed to non-specific proinflammatory responses

measured at recruitment in a cohort of Papua New Guinean women [27]. Whether or not, in the context of the latter study, (i) the timing of recruitment and/or (ii) life-long exposure to both *P. vivax* and *P. falciparum* have any bearing on this issue remain open questions. The prospective analyses in that study, it should nevertheless be noted, did also show that lower non-specific Treg-IL-10 (anti-inflammatory) levels were associated with future *P. falciparum* infections. Taken on its own, that observation is not incompatible with a higher non-specific proinflammatory (e.g. TNF) response being associated with future infection, as was observed here. In all this, it seems to us clear that the issue of the quality of the cellular immunological response involved is likely to have as much importance as its quantity. Thus, a proinflammatory response generated via an antigen-specific interaction that is guided predominantly by IFN- $\gamma$  will almost certainly differ in quality from a proinflammatory response generated via a non-specific route that is guided predominantly by TNF. It is perhaps also instructive to note that in our own and others' studies the peripheral plasma levels of neither IFN- $\gamma$  nor TNF vary as a function of the presence of *P. falciparum* infections during pregnancy but that their placental plasma levels—measured at delivery—certainly do [28–30]. For obvious reasons the placental compartment, other than at delivery, remains uncharted territory for the sorts of studies that could help to answer some of the outstanding immunological questions in the context of an infection during pregnancy that is localised to the placenta itself. This is, then, the major limitation of the study presented here, since assessments of the responsiveness of circulating T cells may represent only an approximation of events localised to and focused on the placental space.

In retrospective analyses, the aim was to assess the impact of *P. falciparum* infections documented during pregnancy on the cellular immunological responses measured at delivery. The findings in this regard point clearly to the generation of an IFN- $\gamma$ -led antigen-specific T-cell memory response, measurable in peripheral blood samples at delivery, a type of response that is, as the data further show, augmented by re-infections during pregnancy in a manner that does not reflect the gravidity. As mentioned above, a concomitantly reduced antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell IFN- $\gamma$  response at delivery as a function of increasing numbers of infections during pregnancy was observed. A previously published study documented a significant gestational age-related decline in the overall frequency, ex vivo, of CD4<sup>+</sup> T cells between the second trimester and delivery, accompanied by increased frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells [31]. Those profiles contrast clearly with the in vitro stimulation-derived profiles

reported here. The latter suggest that pathogen antigen-specific responsiveness is maintained despite pregnancy-related alterations in lymphocyte populations.

Infection at the time of blood draw modified the cellular immunological responses detectable, and the nature of those modifications, furthermore, reflected the time-point (inclusion versus delivery). The authors noted elevated non-specific TNF at inclusion versus diminished specific/non-specific IL-10 at delivery. These findings are consistent with earlier observations showing altered ex vivo peripheral blood cell profiles on the one hand [32] and altered cytokine levels—primarily increased IL-10—on the other [31], as being associated with infection in these women. It is notable here that infection *per se* tends to generate T-cell-mediated cellular responses, whether specific or non-specific, that favour inflammation. In the context of a successful pregnancy, inflammatory activity needs to be counter-balanced by anti-inflammatory activity [33] which likely explains the elevated circulating plasma IL-10 levels consistently associated with *P. falciparum* infections during pregnancy. In the context of the latter, the data presented here suggest that the primary source of infection-related IL-10 is probably not T cells. Placental cells are the most likely source given that the infections are localized there.

Other than the impossibility of accessing the placental compartment during pregnancy, the study's shortcomings are primarily related to sub-group sizes that were necessarily limited both by resources and by cell numbers (blood volumes) available. A separate issue concerns the limited number of stimuli used, also again a reflection of resources available.

## Conclusions

The findings presented here represent a first step in documenting cellular immunological responses to the candidate vaccine antigen VAR2CSA and, in particular, how infection with *P. falciparum* during pregnancy modulates such responses. As such these observations contribute important information to the design of future evaluations in the specific context of VAR2CSA-based vaccine trials.

## Additional file

**Additional file 1.** Cytokines profile in response to PHA and to DBL-5 stimulation of PBMC at inclusion and at delivery. The frequencies of IFN- $\gamma$ -secreting T cells and cytokine production in PBMC at delivery in response to PHA or to the recombinant protein DBL-5 are shown. Except for IFN- $\gamma$  and IL-13 production in response to DBL-5, all box plots illustrate medians with 25th and 75th percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles. The box plots for IFN- $\gamma$  and IL-13 production in response to DBL-5 indicate the mean with SEM (standard error of the mean). The univariate statistical significance of differences between groups was determined using the nonparametric Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ .

## Abbreviations

ANV: antenatal visit; BD: Becton Dickinson; CBA: cytometric bead array; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; CERPAGE: *Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance*; CPDA: citrate phosphate dextrose adenine; HIV: human immunodeficiency virus; IFN- $\gamma$ : interferon gamma; IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; IL-13: interleukin-13; IL-17: interleukin-17; IPTp: intermittent preventive treatment during pregnancy; LLIN: long-lasting, insecticidal bed net; LBW: low birth weight; MI: microscopic infection; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; IRD: research institute for development; MI: microscopic infection; PHA: phytohemagglutinin; PAM: pregnancy-associated malaria; RDT: rapid diagnostic test; SMI: sub-microscopic infection; SP: sulfadoxine-pyrimethamine; STOPPAM: strategies to prevent pregnancy associated malaria; TBS: thick blood smear; TNF: tumor necrosis factor; UI: universal unit; WHO: World Health Organization.

## Authors' contributions

KG, SI, PD, AS, AM, AJFL and NF conceived, designed and coordinated the study. KG, BV, SI, AF, and NF participated in sample collection and processing. KG, BV and NF designed and supervised the immunoassays. GC performed statistical analysis. KG and NF carried out the immunoassays. KG, GC, AJFL, and NF drafted the first version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin. <sup>2</sup> Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin. <sup>3</sup> Institut de Recherche pour le Développement, MERIT UMR D216 Mère et enfant face aux infections tropicales, Paris, France. <sup>4</sup> COMUE Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France. <sup>5</sup> Department of Molecular Biosciences, the Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm, Sweden. <sup>6</sup> Department of International Health, Institute of International Health, Immunology and Microbiology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

## Acknowledgements

We are grateful to all women who participated in the study. We thank all the field and administration staffs of Akodeha, Comé central and Ouedémé Pedah health centres for their valuable contribution. We particularly thank Sophie Borgella, Bich-Tram Huynh, Sébastien Dechavanne and Valérie Briand for the database management; Jacqueline Affedjou, Jean-Claude Sagbo, Bernadette Gandonou, Gildas Gbaguidi and all field staff at the site of STOPPAM for their hard work during the follow-up. We thank Sem Ezinmegnon, Carine Agbowai, Firmine Vivami, Charles Ahouansou, Pépin Kounou, Honoré Kounou, and Darius Sossou for their laboratory contributions.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and material

The datasets during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committees of the Faculty of Health Sciences (University of Abomey-Calavi, Benin) and of the *Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique* of the Research Institute for Development (IRD) in France. Written informed consent was obtained from all women included in the study.

## Funding

This paper describes work undertaken in the context of the STOPPAM, 'Strategies To Prevent Pregnancy Associated Malaria', and the PlacMalVac 'Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine' projects, two small and medium-scale collaborative projects supported by the European 7th Framework Programme under Contracts 200889 and 304815. This publication was made possible through support provided by the *Ministère des Affaires Étrangères* of France and the *Institut de Recherche pour le Développement* AIRD-ARTS (Ph.D. research support for KG and SI).

Received: 22 June 2016 Accepted: 6 September 2016

Published online: 21 September 2016

## References

- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:93–104.
- Recker M, Bouma MJ, Bamford P, Gupta S, Dobson AP. Assessing the burden of pregnancy-associated malaria under changing transmission settings. *Malar J*. 2009;8:245.
- Pell C, Menaca A, Chatio S, Hodgson A, Tagbor H, Pool R. The acceptability of intermittent screening and treatment versus intermittent preventive treatment during pregnancy: results from a qualitative study in Northern Ghana. *Malar J*. 2014;13:432.
- Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJ, Cot M, Fievet N, Massougbdji A, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections are associated with maternal anemia, premature births, and low birth weight. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1481–8.
- Huynh BT, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guezo-Mevo B, et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:214–20.
- Ndam NT, Denoëud-Ndam L, Doritchamou J, Vivami F, Salanti A, Nielsen MA, et al. Protective antibodies against placental malaria and poor outcomes during pregnancy, Benin. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:813–23.
- Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*. 1996;272:1502–4.
- Tuikue Ndam NG, Fievet N, Bertin G, Cottrell G, Gaye A, Deloron P, NG. Variable adhesion abilities and overlapping antigenic properties in placental *Plasmodium falciparum* isolates. *J Infect Dis*. 2004;190:2001–9.
- Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol*. 1998;160:2523–30.
- Ricke CH, Staalsoe T, Koram K, Akanmori BD, Riley EM, Theander TG, et al. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J Immunol*. 2000;165:3309–16.
- Staalsoe T, Shulman CE, Dorman EK, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L. Intermittent preventive sulfadoxine-pyrimethamine treatment of primigravidae reduces levels of plasma immunoglobulin G, which protects against pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 2004;72:5027–30.
- Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 1998;395:851–2.
- Tuikue Ndam NG, Salanti A, Le-Hesran JY, Cottrell G, Fievet N, Turner L, et al. Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women. *J Infect Dis*. 2006;193:713–20.
- Salanti A, Dahlback M, Turner L, Nielsen MA, Barford L, Magistrado P, et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med*. 2004;200:1197–203.
- Jung K, Seo SK, Choi I. Endogenous V $\beta$ 5.4 negatively regulates the helper T cell-mediated antibody response. *Immunol Lett*. 2015;165:78–83.
- Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T, et al. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity*. 1996;4:275–81.
- Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*. 2010;120:214–22.
- Avril M, Cartwright MM, Hathaway MJ, Hommel M, Elliott SR, Williamson K, et al. Immunization with VAR2CSA-DBL5 recombinant protein elicits broadly cross-reactive antibodies to placental *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun*. 2010;78:2248–56.
- Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouedraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, et al. Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and environmental factors. *PLoS ONE*. 2011;6:e27516.



20. Diallo A, Ndam NT, Moussiliou A, Dos Santos S, Ndonky A, Borderon M, et al. Asymptomatic carriage of *Plasmodium* in urban Dakar: the risk of malaria should not be underestimated. *PLoS ONE*. 2012;7:e31100.
21. Avril M, Kulasekara BR, Gose SO, Rowe C, Dahlback M, Duffy PE, et al. Evidence for globally shared, cross-reacting polymorphic epitopes in the pregnancy-associated malaria vaccine candidate VAR2CSA. *Infect Immun*. 2008;76:1791–800.
22. Diouf I, Fievet N, Doucoure S, Ngom M, Andrieu M, Mathieu JF, et al. IL-12 producing monocytes and IFN-gamma and TNF-alpha producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by *Plasmodium falciparum*. *J Reprod Immunol*. 2007;74:152–62.
23. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J*. 2008;7:26.
24. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis*. 1999;180:1987–93.
25. Ishizuka AS, Lyke KE, DeZure A, Berry AA, Richie TL, Mendoza FH, et al. Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nat Med*. 2016;22:614–23.
26. Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, et al. Cytotoxic activities of CD8(+) T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. *Elife*. 2015;4:e0432.
27. Requena P, Barrios D, Robinson LJ, Samol P, Umbers AJ, Wangnapi R, et al. Proinflammatory responses and higher IL-10 production by T cells correlate with protection against malaria during pregnancy and delivery outcomes. *J Immunol*. 2015;194:3275–85.
28. Bostrom S, Ibitokou S, Oesterholt M, Schmiegelow C, Persson JO, Minja D, et al. Biomarkers of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy in women living in northeastern Tanzania. *PLoS ONE*. 2012;7:e48763.
29. Chene A, Briand V, Ibitokou S, Dechavanne S, Massougbojji A, Deloron P, et al. Placental cytokine and chemokine profiles reflect pregnancy outcomes in women exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Infect Immun*. 2014;82:3783–9.
30. Ibitokou SA, Bostrom S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21:859–66.
31. Ibitokou S, Brutus L, Vianou B, Oesterholt M, Massougbojji A, Deloron P, et al. Gestational age-related changes in the peripheral blood cell composition of sub-Saharan African women. *J Reprod Immunol*. 2013;98:21–8.
32. Ibitokou S, Oesterholt M, Brutus L, Borgella S, Agbowai C, Ezinmegnon S, et al. Peripheral blood cell signatures of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy. *PLoS ONE*. 2012;7:e49621.
33. Bachy V, Williams DJ, Ibrahim MA. Altered dendritic cell function in normal pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2008;78:11–21.

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

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

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



**ARTICLE 4: Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PlacMalVac: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae**

**Publication: article en préparation**

**Présentation au congrès:**

• November 2016: **ASTMH 65th Annual Meeting, Atlanta, USA. Poster**

Le paludisme associé à la grossesse (PAG) accroît le risque d'anémie maternelle et de petit poids de naissance du nouveau-né. Les populations à risque sont les sujets immuno-déprimés, les femmes enceintes et surtout les enfants de moins de cinq ans. Les enfants exposés *in utero* aux antigènes palustres sont plus susceptibles aux infections durant l'enfance. Il est donc nécessaire de protéger la femme enceinte contre le paludisme afin de réduire la morbidité et la mortalité maternelle et infantile. La prévention du PAG repose actuellement sur un traitement préventif intermittent au cours de la grossesse par la sulfadoxine-pyriméthamine et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide. Cependant, avec l'émergence des résistances des vecteurs aux insecticides et des parasites aux antimalariques, un vaccin serait une alternative essentielle pour la prévention du PAG. L'identification de l'antigène VAR2CSA de *P. falciparum* qui est impliqué dans la physiopathologie du PAG a conduit au développement d'un candidat vaccin ciblant les domaines ID1-DBL2-ID2a. Ce candidat vaccin a servi au développement du vaccin PAMVAC qui est actuellement en cours d'essai clinique de phase I. Le consortium européen et africain (Allemagne, Danemark, France et Bénin) travaille sur cet essai clinique dans le cadre du projet PlacMalVac/PAMVAC.

En amont de l'essai clinique, une étude de faisabilité et de préparation de la phase 2 a été mise en place au Bénin en 2014. L'étude des réponses mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a) a été réalisée chez les primigestes afin de suivre la construction naturelle de l'immunité spécifique du vaccin au cours de la première grossesse. A partir d'un suivi de 272 nulligestes chez qui les tests de grossesse ont été réalisés mensuellement, les 51 premières grossesses ont été suivies sur le plan clinique et parasitologique depuis le premier mois de la grossesse jusqu'à l'accouchement. L'étude de l'immunité cellulaire a été réalisée avec des PBMC isolées à partir du sang périphérique collecté à quatre moments au cours du suivi (au premier et au cinquième mois de la grossesse, à l'accouchement et à 6 mois après accouchement). Les cellules B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal et d'un autre antigène palustre, le CIRD, de la PPD et de la toxine

tétanique ont été quantifiées par la technique ELISPOT. Aussi les concentrations de 6 cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, l'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) ont été mesurées dans les surnageants de culture après stimulation avec l'antigène vaccinal, la PPD et la PHA par la technique CBA (Cytometric Bead array). Les analyses multivariées ont été réalisées en fonction des données cliniques et parasitologiques des femmes durant la grossesse.

Indépendamment de l'infection palustre, nos résultats montrent une augmentation de la fréquence des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal ainsi qu'à la toxine tétanique alors que la fréquence des cellules B mémoires spécifique du CIDR ne change pas au cours de la grossesse. L'infection palustre au cours de la grossesse est associée à une forte fréquence des cellules B mémoires spécifiques à l'antigène vaccinal ainsi qu'à la production non spécifique d'IL-6 et du TNF- $\alpha$  en réponse à la PHA.. Les analyses prospectives montrent que des productions non spécifiques d'IL-5 et IL-13 augmentées au début de la grossesse sont associées à un risque élevé d'infection palustre durant la grossesse.

Ces résultats suggèrent que l'induction de la mémoire anti-VAR2CSA pour la prévention du PAG pourrait se faire au cours de la première grossesse suite au contact avec l'antigène parasitaire VAR2CSA via des infections naturelles au cours de la grossesse.

1 **Title: Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PlacMalVac:**  
2 **Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae**

3  
4 Komi Gbédandé<sup>1,2,4</sup>, Nadine Fievet<sup>1,3,4,#</sup>, Firmine Viwami<sup>1</sup>, Sem Ezinmegnon<sup>1</sup>, Saadou Issifou<sup>1</sup>,  
5 Jean-Philippe Chippaux<sup>1,3,4</sup>, Yannelle Dossou<sup>1</sup>, Kabirou Moutairou<sup>2</sup>, Achille Massougbodji<sup>1</sup>,  
6 Nicaise Ndam<sup>3,4</sup>, Ali Salanti<sup>5</sup>, Morten Nielsen<sup>5</sup>, Benjamin Mordmüller<sup>6</sup>, Philippe Deloron<sup>3,4</sup>, Adrian  
7 J. F. Luty<sup>1,3,4</sup>

8  
9 <sup>1</sup> Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance  
10 (CERPAGE), Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Benin.

11 <sup>2</sup> Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques,  
12 Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

13 <sup>3</sup> Institut de Recherche pour le Développement, MERIT UMR D216 Mère et enfant face aux  
14 infections tropicales, Paris, France.

15 <sup>4</sup> COMUE Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, France.

16 <sup>5</sup> Department of International Health, Institute of International Health, Immunology and  
17 Microbiology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

18 <sup>6</sup> Institut für Tropmedezin, Tübingen, Germany,

19  
20 # Corresponding author, current affiliation and contact details:

21 Fievet Nadine, CERPAGE /IRD MERIT UMR D216 Mère et enfant face aux infections  
22 tropicales, 08 BP 841 Cotonou, Benin. Tel. +22994614208 Fax +22921308860 e-mail :  
23 nadine.[fievet@ird.fr](mailto:nadine.fievet@ird.fr)

24 Keywords : Malaria, Pregnancy, VAR2CSA, vaccine, Cytokines, T & B cells,

25  
26 **Abstract**

27 Pregnancy associated malaria (PAM) is a major public health problem associated with poor  
28 pregnancy outcomes that commonly include maternal anaemia and fetal growth alterations, whilst  
29 neonatal and infant health can also be affected. A malaria vaccine that targets the pre-erythrocytic  
30 stages of the parasite will not prevent the consequences of PAM. The identification of the parasite  
31 antigen VAR2CSA that is implicated in the pathophysiology of PAM has led to the development of  
32 a vaccine candidate by an EU-funded consortium (PlacMalVac project: German, Danish, French  
33 and Beninese Partners). We quantified B and T cell memory responses to the VAR2CSA sub-unit  
34 vaccine candidate in a cohort of pregnant primigravid Beninese who were followed up throughout  
35 pregnancy.

36 Clinical and parasitological data were collected every month from primigravid women recruited at  
37 the beginning of their pregnancies who were followed through to delivery. Mononuclear cells from  
38 peripheral blood collected on 4 occasions (first and fifth month of pregnancy, at delivery and 6  
39 months post-delivery) were isolated and cryopreserved under liquid nitrogen. The concentrations of  
40 the cytokines IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  produced in response to the vaccine  
41 antigen, to PPD and to PHA were quantified in supernatants of stimulated cells using cytometric  
42 bead array. The frequencies of antigen-specific antibody-secreting memory B cells to the vaccine  
43 candidate, to tetanus toxoid and to a non-vaccine plasmodial antigen (PfEMP1-CIDR1a) were  
44 evaluated in the same cell samples using standard ELISPOT assays.

45 Our data showed that the profile of vaccine-specific B cell populations increased as a function of  
46 women's *P. falciparum* infection histories, whilst tetanus toxoid-specific B cell frequencies  
47 increased following tetanus vaccine boosts administered according to national guidelines.

48 Infections during pregnancy were associated with enhanced non-specific IL-5 and IL-13 responses  
49 detectable at delivery.

50

## 51 **Background**

52 Malaria caused by the parasite *Plasmodium falciparum* remains a major public health problem in  
53 endemic areas and is associated with high mortality. Pregnant women and infants represent the  
54 population segments most at risk of malaria [1]. *P. falciparum* infection occurring at any time  
55 during pregnancy alters maternal, fetal and newborn health, leading to low birth weight, abortion,  
56 maternal anaemia during pregnancy and increased susceptibility to *P. falciparum* in childhood [2-  
57 7].

58 Infection with *P. falciparum* leads to different disease syndromes as a result of the expression of  
59 parasite-derived antigens on the surface of infected erythrocytes (IE) that result in their adherence to  
60 the vascular lining. This adhesive interaction is mediated by a family of proteins called *P.*  
61 *falciparum* erythrocyte membrane protein1 [8] (PfEMP1), encoded by *var* genes, of which there are  
62 about 60 in each genome. Naturally acquired protective antibodies block the binding between IE and  
63 receptors on vascular endothelium [9, 10]. Pregnancy is associated with an increased susceptibility  
64 to infection due to selection of IE that specifically adhere to placental tissues via their expression of  
65 chondroitin sulphate A (CSA).

66 VAR2CSA, a member of the PfEMP1 protein family, plays a crucial role in the binding of IE to  
67 CSA that increases the risk of placental malaria mainly during first pregnancies [11]. Thus women  
68 who have acquired immunity against malaria during childhood nevertheless become susceptible to  
69 malaria again during their first pregnancies. VAR2CSA expressing parasites are implicated in  
70 placental malaria and anti-VAR2CSA antibody responses increase with gravidity [12, 13].

71 VAR2CSA was therefore identified as the prime candidate for the development of a vaccine for  
72 malaria during pregnancy.

73 The vaccine for malaria during pregnancy attempt to mimic the phenomenon of naturally acquired  
74 protection by antibodies. Naturally acquired immunity to Pregnancy associated malaria (PAM) is  
75 associated with the development of immunoglobulin G (IgG) antibodies that inhibit the binding  
76 between IE and placental tissue, a likely mechanism of protection [10, 12, 14].

77 Antibody responses to the recombinant protein ID1-DBL2Xa and to the ID1-ID2a domains of  
78 VAR2CSA's N terminal domain efficiently blocked adhesion of IE to CSA at a level similar to that  
79 of antibodies raised against the entire VAR2CSA extracellular domain [15, 16].

80 In this context, we evaluated specific cellular memory B and T cell responses to the VAR2CSA  
81 sub-unit vaccine candidate ID1-DBL2-ID2a, targeting malaria during pregnancy, in a cohort of  
82 pregnant primigravid Beninese who were followed up throughout pregnancy.

83

## 84 **Methods**

### 85 **Study design**

86 The PLACMALVAC "Placental Malaria Vaccine" project was conducted in Benin between  
87 September 2013 and April 2016. The study took place in the district of So-Ava located 30 Km north  
88 of Cotonou. Malaria transmission in the area has two peaks during the rainy seasons (from April to  
89 July, and from September to November). The PLACMALVAC team conducted a follow-up study  
90 of a cohort of 278 nulligravid women (primary cohort) in whom the first pregnancy (secondary  
91 cohort) will be systematically screened in order to measure the acquisition of natural immunity  
92 against placental stages of the malaria parasite in primigravid women (time of appearance of  
93 protective immunity, and their response to VAR2CSA). Clinical and parasitological surveillance  
94 data were collected beginning in the first month of the pregnancy right through to delivery and  
95 again 6 months post delivery in a total of 68 primigravid women enrolled in the secondary cohort.  
96 According to national policy, pregnant women received IPTp with SP during their scheduled  
97 antenatal clinic visits (ANV). Women diagnosed with a clinical malaria attack (temperature  $\geq 37.5$   
98 °C and a positive malaria rapid diagnostic test [17] and/or a positive TBS) received a full treatment  
99 course of quinine or artemisinin combination (Coartem) according to the national guidelines for  
100 malaria treatment during pregnancy. In the case of clinical symptoms between ANV, mothers were  
101 encouraged to attend the maternity clinic to receive care.

102 The PLACMALVAC study was approved by the ethics committee of the Health Sciences Faculty  
103 of the University of Abomey-Calavi, Benin, and by the ethics committee of the Research Institute  
104 for Development, in France. Written informed consent was obtained from all mothers, who  
105 additionally provided consent for their babies, prior to inclusion in the study.

106

### 107 ***Plasmodium falciparum* infection status**

108 Clinical and parasitological data were collected from mothers at each ANV, at delivery and also 6  
109 months post delivery. Parasitological status with respect to *P. falciparum* infection was determined  
110 using a RDT (Parascreen; Zephyr Biomedical Systems), as well as through routine microscopical  
111 examination of thick blood smears (TBS) and quantitative PCR (qPCR) on dried blood spots.  
112 Briefly, TBS were prepared, stained with Giemsa and examined by two experienced technicians for  
113 the presence and density of parasites. At delivery, TBS were made from both peripheral and  
114 placental blood samples, such that maternal infection status at delivery was defined by the presence  
115 of parasites in either the placental and/or maternal peripheral blood. Infection with *P. falciparum*  
116 was defined as a positive TBS.

117

### 118 **Blood collection and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) preparation**

119 Peripheral venous blood samples (20 ml) were collected in tubes containing citrate phosphate  
120 dextrose adenine (CPDA) at 4 different times during the follow-up (first and fifth month of  
121 pregnancy, at delivery and 6 months post-delivery). All samples were transported within 4 h to the  
122 laboratory of the Research Centre for Malaria during Pregnancy and Infancy (CERPAGE). PBMC  
123 were immediately isolated by density gradient centrifugation on Ficoll (Fisher scientific, UK).  
124 Those PBMC were cryopreserved in liquid nitrogen with 90% fetal calf serum (FCS) (GE  
125 healthcare) supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (SIGMA).  $5 \cdot 10^6$  to  $10 \cdot 10^6$  cells  
126 were frozen slowly at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 12 hours, then transferred to liquid nitrogen.

127 Cryoperved PBMC were thawed quickly in a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath and diluted slowly with warm  
128 complete medium ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Those PBMC were washed two times with warm complete medium  
129 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) to remove DMSO. The viable PBMC after thawing were counted and suspended at  $10^6$   
130 cells/ml for the quantification of memory B and T cell responses to different antigens.

131 Complete medium for memory B cell quantification was prepared with RPMI 1640 without L-  
132 Glutamine (Sigma), 5mL Sodium pyruvate 100 mM (Fischer), 1% MEM non essential Amino  
133 Acids 100x (Fischer), 1% L-glutamine 200 mM (Fischer), 1% Penicilline 10000 IU/ml,  
134 Streptomycine 10000  $\mu\text{g/ml}$  (Fischer), 50  $\mu\text{M}$  2-mercapto-ethanol (Fischer) and 10% heat-  
135 inactivated FCS. For T cell activity, complete medium was prepared with RPMI 1640 without L-  
136 Glutamine (Sigma), 10% heat-inactivated FCS, 1% L-glutamine 200 mM (Fischer) and 1%  
137 Penicilline 10000 IU/ml/Streptomycine 10000  $\mu\text{g/ml}$  (Fischer)

138

### 139 **Antigens**

140 The candidate vaccine antigen was prepared and supplied by the PLACMALVAC project  
141 Consortium partner Express2ion in Denmark. It comprises a recombinant protein representing the  
142 ID1-DBL2-ID2a sequence of VAR2CSA of the FCR3 strain. A second PfEMP1-derived antigen  
143 (CIDR1a) with no association with placental malaria, supplied by Dr Louise Turner (University of  
144 Copenhagen, Copenhagen, Denmark), was produced in Baculovirus-infected insect cells. Tetanus  
145 toxoid (TT) was procured from Statens Serum Institut (<http://www.ssi.dk>) and total anti-human IgG  
146 antibody were used as control antigens for memory B cell activity. PHA (Phytohemagglutinin) and  
147 PPD a purified protein derivative of tuberculosis (Statens Serum Institut (<http://www.ssi.dk>)) were  
148 used as positive control for T cell immune response evaluations.

149

### 150 **PBMC stimulation and cytokine quantification**

151  $2 \times 10^5$  PBMC were cultured in 96 well plates (Dutscher) in 200  $\mu$ l of complete medium (RPMI, 10%  
152 FCS, 1% L-glutamine, 1% Penicilline 10000 IU/ml, Streptomycine 10000  $\mu$ g/ml; Fischer, France).  
153 Cells were either left unstimulated or were stimulated either with mitogen (PHA-L 1 $\mu$ g/ml, Sigma,  
154 France) or PPD (10  $\mu$ g/ml) or recombinant ID1-DBL2-ID2a (10  $\mu$ g/ml). Cell cultures were  
155 incubated for 72 hours at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell-free culture supernatants  
156 (150  $\mu$ l) were collected after centrifugation of the plate (at 450 g for 8 minutes) and subsequently  
157 stored in 50  $\mu$ l aliquots at -80°C prior to thawing for cytokine measurements.

158 We quantified interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 and TNF- $\alpha$  in culture  
159 supernatants using a commercially available cytometric bead array (CBA soluble protein Flex set  
160 assay; BD Biosciences, Grenoble, France), conducted according to the manufacturer's instructions  
161 on a FACSCalibur 4-color cytometer. The assay sensitivity was 0.8 pg/ml for IFN- $\gamma$ , 1.1 pg/ml for  
162 IL-5, 1.6 pg/ml for IL-6, 0.13 pg/ml for IL-10, 0.6 pg/ml for IL-13 and 1.2 pg/ml for TNF- $\alpha$ . When  
163 the cytokine concentration in a sample was below the detection limit of the test, an arbitrary value  
164 was assigned that corresponded to half of the sensitivity value for the specific cytokine concerned.  
165 Results were formatted using the BD CBA analysis software (FCAP array). The choice of these  
166 cytokines relies on their role in malaria immunity. Placental malaria is associated with increased  
167 frequency of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  producing T lymphocytes suggesting an important role of those cells  
168 and cytokines in protection [18]. The concentrations of the IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  have been  
169 shown to be increased in placental or peripheral plasma in women with PAM [19-21].

### 170 **Frequencies of specific antibody-secreting B cells assessed by ELISPOT**

171  $1 \times 10^6$  PBMC were cultured in 1 ml of complete medium under the conditions described above, after  
172 6 days of stimulation with CpG ODN2006 (2.5  $\mu$ g/ml) and IL-15 (2  $\mu$ g/ml) for B cells  
173 differentiation into antibody secreting cells. On the 6<sup>th</sup> day, Those PBMC were harvested by



174 pipetting and washed in warm complete medium in preparation for plating into antigen-coated  
175 plates.

176 The antigens VAR2CSA (10 µg/ml), CIDR1a (10 µg/ml), TT (5 µg/ml) and anti-IgG (5 µg/ml)  
177 were added to separate wells of pre-wetted ELISPOT plates (Millipore Multiscreen France), and the  
178 plates were incubated overnight (4°C). After overnight incubation, the plate was washed twice and  
179 blocked with 3% BSA (bovine serum albumin) (Sigma, France) in sterile PBS for 30 min at room  
180 temperature. After blocking, the plate was washed twice with sterile PBS. Stimulated PBMC were  
181 then plated for each antigen as follows:  $2.10^5$  PBMC in five wells for VAR2CSA and CIDR  
182 antigens,  $2.10^5$  PBMC in four wells for TT,  $2.10^5$  PBMC in duplicate in blank wells as a negative  
183 control and  $10^4$  PBMC in duplicate for total cells producing IgG. Seven serial dilutions (1:2) were  
184 performed for the duplicate IgG wells. Plates with cells were incubated overnight in the incubation  
185 chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). After five washes with wash buffer (PBS with 3% BSA and 0.5%  
186 Tween-20), goat anti-human IgG biotin (Sigma) diluted 1/500 in PBS/3% BSA was added to the  
187 wells and incubated for 2 hours at room temperature. Plates were washed five times again with  
188 washing buffer and ExtrAvidin (Sigma) diluted 1/600 in PBS/3% BSA was added to wells. After 1-  
189 hour incubation, the plate was washed three times with PBS before developing with AEC substrate  
190 for 10 min incubation. The plate was finally washed in deionized water to stop the reaction. Plates  
191 were scanned and the number of spots representing antigen-specific memory B cells quantified  
192 using an ImmunoSpot® S6 Ultra-V analyzer I (CTL Europe GmbH).

### 193 **Statistical analysis**

194 Firstly raw cytokine data are described with minimum, maximum, mean, standard deviation and  
195 median or presented by graphs. Secondly we calculated mean and standard deviation by group  
196 (women infected/women uninfected) to appreciate the variability of data in each of these two  
197 groups. Finally the non-parametric Kruskal-Wallis and the Mann-Whitney' tests were used to  
198 identify the differences in median cytokine levels or B cell frequencies, respectively, in the groups  
199 during pregnancy and between infected women and uninfected women with *P. falciparum*. For each  
200 test, a p value of <0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using  
201 the Stata/MP 12.0 (StataCorp, College Station, TX, USA) and GraphPad (Prism 6.0).

202

## 203 **Results**

### 204 **Characteristics of the study population**

205 Sixty-eight primigravid women were enrolled in the study and were under active clinical and  
206 parasitological surveillance at each antenatal monthly visit. The characteristics of the cohort and the  
207 pregnancy outcomes are: 17 women were excluded due to abortion or refusal. The mean age of the  
208 study population with standard deviation ( $\pm$ SD) was 20.96 ( $\pm$  3.54) years. Babies' mean birth

209 weight was  $2.95 \pm 0.48$  kg (mean  $\pm$  SD). At delivery, 8.6% of babies from those women had a low  
210 birth weight (<2500 g) and 13.5% were born premature. Taking into account the availability of  
211 clinical and parasitological data and the outcomes of the pregnancy, immunological analyses were  
212 possible with samples from 49 women at the first and fifth month of pregnancy, on 36 women at  
213 delivery and on 21 women six months post-delivery. *P. falciparum* infections before the fifth month  
214 of pregnancy were identified in 25 women by thick smear, while 28 altogether were infected during  
215 pregnancy (between first month of pregnancy and delivery).

216 The flow chart of the study population is describe in the **Figure 1**

217

### 218 **Cytokine responses of PBMC and the frequencies of specific memory B cells during** 219 **pregnancy and post delivery**

220 PBMC from primigravid women at four different occasions first and fifth month of pregnancy, at  
221 delivery and 6 months post-delivery were stimulated with PHA or PPD or the recombinant protein  
222 ID1-DBL2-ID2a (VAR2CSA). At all time points, the cytokines IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  and  
223 TNF were quantifiable in culture supernatants and were present in amounts that were higher than  
224 those spontaneously secreted by unstimulated PBMC. All data from stimulated cells (PHA, PPD  
225 and VAR2CSA) are presented after subtraction of cytokine concentrations in the supernatants of  
226 unstimulated PBMC from those in supernatants of stimulated cells. With the exception of IL-6 and  
227 TNF production in response to PHA that increased from the first month of pregnancy to delivery  
228 (all  $p < 0.05$ ), all cytokine responses for all stimulation were unchanged during pregnancy (data not  
229 shown). The frequencies of total IgG-secreting B cells, and of those secreting antibody specific for  
230 CIDR1a, did not change significantly during the whole study period. In contrast, the frequencies of  
231 B cells secreting antibody with specificity for VAR2CSA and TT increased significantly compared  
232 with data derived from cells at the beginning of pregnancy whether delivery was considered the  
233 end-point ( $p=0.01$ ) or the whole study period was considered ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 2**).

234

### 235 **The influence of *Plasmodium falciparum* infections during pregnancy on memory immune** 236 **responses (frequencies of memory B cells and cytokine responses)**

237 We first examined the effect of *P. falciparum* infection before the first five months of pregnancy on  
238 in vitro immune responses quantified after five months of the pregnancy. With the exception of  
239 higher IL-13 ( $p=0.004$ ) production in response to PHA, *P. falciparum* infection before the fifth  
240 month of pregnancy did not affect the magnitude of cytokine responses or the frequency of memory  
241 B cells (data not shown).

242 We next examined whether *P. falciparum* infection during pregnancy influenced cytokine responses  
243 or memory B cell frequencies at delivery or 6 month post delivery. PBMC at delivery in mothers

244 with a history of infection during pregnancy displayed significantly increased production of IL-5  
245 and IL-13 (**Figure 4**) in response to PHA stimulation ( $p=0.04$  and  $p=0.008$ , respectively) as well as  
246 increased frequencies of VAR2CSA-antibody secreting memory B cells ( $p=0.036$ ) compared to  
247 PBMC of uninfected women (**Figure 5**). Responses quantified 6 months after delivery did not vary  
248 as a function of infections arising during pregnancy.

249

### 250 **Immune responses in early pregnancy as a predictor of *Plasmodium falciparum* infections** 251 **during pregnancy**

252 We next wished to determine whether the cytokine responses or frequencies of antibody-secreting B  
253 cells upon *in vitro* stimulation at the beginning of pregnancy were predictive of *Plasmodium*  
254 *falciparum* infections during pregnancy. Our data revealed independent associations for an  
255 increased risk of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy with higher PHA-stimulated  
256 IL-5 and IL-13 production ( $p=0.02$  &  $p=0.03$ , respectively) present at the beginning of pregnancy.

257

### 258 **Discussion**

259 In summary, in our study we evaluated T and B cell responses in the context of malaria during  
260 pregnancy reflected by cytokine responses and the frequencies of memory B cells secreting  
261 antibodies with specificity for the vaccine candidate VAR2CSA currently under development.

262 Since the use of the B cell ELISPOT assay is comparatively rare in a malaria research context, it is  
263 worthwhile emphasizing here that the profiles of responses obtained with the control antigens  
264 (TT/CIDR1a) offer appropriate reassurance in terms of the overall conclusions we draw from our  
265 data. Thus, as would be expected, B cell memory responses to TT were augmented early in  
266 pregnancy, reflecting the fact that mothers are routinely given tetanus booster vaccinations at first  
267 ANV as part of the standard primary health care package, and consistent with a published study  
268 from Ghana [22]. The responses to TT, furthermore, were not modified by mothers' *P. falciparum*  
269 infection status and this is reassuring in a general public health context. B cell responses to the 'non-  
270 PAM-specific' CIDR1a antigen, again somewhat as expected, were present at a similar unchanged  
271 level throughout the study, and were also unaffected by mothers' infection status. Finally, the non-  
272 specific positive control that quantified the overall frequency of IgG-producing B cells, did not vary  
273 at all throughout the study, again giving the appropriate reassurance that the cryopreservation and  
274 assay conditions were maintained at consistent levels throughout.

275 The frequency of vaccine antigen-specific antibody-secreting B cells increased throughout  
276 pregnancy, reaching a peak at delivery with, notably, a significant difference between the  
277 frequencies in those infected during pregnancy versus those uninfected. This is clearly indicative of  
278 VAR2CSA-specific stimulation that, most likely, is modified - presumably augmented - by the fact

279 that mothers would have routinely received 2 radical curative doses of the anti-malaria sulfadoxine-  
280 pyrimethamine that comprised the intermittent preventive treatment package during pregnancy at  
281 the time of the study. The data are also consistent with the enhanced VAR2CSA domain-specific  
282 IgG responses observed at delivery in mothers infected during pregnancy that was documented in  
283 our earlier study in Benin [23]. Further study will elucidate whether the vaccine antigen-specific  
284 antibody responses induced by infection display any functional (IE adhesion inhibitory) activity.

285 Cytokine responses - as a reflection of memory T cell responses - were globally less informative  
286 than the profiles of memory B cell responses in terms of the delineation between infected and  
287 uninfected women, with some exceptions as discussed below. We did not observe any marked  
288 vaccine antigen-specific profiles as a function of infection. Although at delivery the trend was  
289 towards enhanced pro-inflammatory (IFN- $\gamma$ /TNF) responses in mothers who had been infected  
290 during pregnancy. These findings echo those we recently reported in the context of cytokine  
291 responses to the DBL5 domain of VAR2CSA [24]. In that study we also reported an association of  
292 infection with elevated non-specific (mitogen-induced) IL-13 responses. Here we again observed  
293 that the level of mitogen-induced IL-13, as well as that of IL-5, also a classical Th2-type cytokine,  
294 was elevated at delivery in mothers who had been infected during pregnancy. Notable also was the  
295 fact that, in our prospective analyses, elevated mitogen-induced IL-5 and IL-13 responses present at  
296 the beginning of pregnancy were associated with a significantly greater risk of infection during  
297 pregnancy. We speculate that the basis for this apparent Th2 bias may lie in the overall infection  
298 status of the women in our study. We do not have specific information, for example, on their  
299 helminth infection status, but a separate study in the same site has recorded 72% prevalence of  
300 *Schistosoma haematobium*, for example, in a cohort of women of reproductive age (V Briand  
301 unpublished observations). It is well known that helminths modulate T cell responses heavily in  
302 favour of Th2-type activity. Regardless of the immunological basis for the Th2 bias we observed,  
303 the clear suggestion of our data is that such a bias is detrimental in the sense that it favours  
304 subsequent infection with *P. falciparum*.

305 The conclusions we can draw here are unfortunately limited by the sample size that declined from  
306 the beginning to the end of the study. The data nevertheless reveal the fact that vaccine antigen-  
307 specific memory B cell responses are both induced and maintained during and after pregnancy in  
308 primigravid women who had had documented infections with *P. falciparum* during pregnancy.

309

### 310 **Ethics statement**

311 The study was approved by the ethics committees of the Faculty of Health Sciences (University of  
312 Abomey-Calavi, Benin) and of the “Comité Consultatif de Déontologie et d’Ethique” of the

313 Research Institute for Development (IRD) in France. Written informed consent was obtained from  
314 all women included in the study.

315

### 316 **Competing interests**

317 There is no conflict of interest applying to the article's authors

318

### 319 **Funding**

320 This paper describes work undertaken in the context of the PlacMalVac "Clinical development of a  
321 VAR2CSA-based placental malaria vaccine" projects, two Small & Medium Scale Collaborative  
322 Project supported by the European 7th Framework Programme under contract number 304815. This  
323 publication was made possible through support provided by the Ministère des Affaires Etrangères  
324 of France and the Institut de Recherche pour le Développement AIRD-ARTS (Ph.D. research  
325 support for KG).

326

327

- 328 1. WHO: **World Malaria Report**. <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2015/en/>  
329 2015.
- 330 2. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, Fletcher KA, Owens S,  
331 D'Alessandro U, Nosten F, et al: **The sick placenta-the role of malaria**. *Placenta* 2004, **25**:359-378.
- 332 3. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJF, Cot M, Fievet N, Massougbdji A, Deloron P, Ndam NT:  
333 **Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Are Associated With Maternal Anemia,**  
334 **Premature Births, and Low Birth Weight**. *Clinical Infectious Diseases* 2015, **60**:1481-1488.
- 335 4. Guyatt HL, Snow RW: **Malaria in pregnancy as an indirect cause of infant mortality in sub-Saharan**  
336 **Africa**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, **95**:569-576.
- 337 5. Guyatt HL, Snow RW: **The epidemiology and burden of Plasmodium falciparum-related anemia**  
338 **among pregnant women in sub-Saharan Africa**. *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**:36-44.
- 339 6. Umbers AJ, Boeuf P, Clapham C, Stanisic DI, Baiwog F, Mueller I, Siba P, King CL, Beeson JG, Glazier  
340 J, Rogerson SJ: **Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor**  
341 **axis of fetal growth regulation**. *J Infect Dis* 2011, **203**:561-569.
- 342 7. Wort UU, Hastings I, Mutabingwa TK, Brabin BJ: **The impact of endemic and epidemic malaria on**  
343 **the risk of stillbirth in two areas of Tanzania with different malaria transmission patterns**. *Malar J*  
344 2006, **5**:89.
- 345 8. Fried M, Duffy PE: **Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human**  
346 **placenta**. *Science* 1996, **272**:1502-1504.
- 347 9. Salanti A, Dahlback M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P, Jensen AT, Lavstsen T, Ofori  
348 MF, Marsh K, et al: **Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria**. *J*  
349 *Exp Med* 2004, **200**:1197-1203.
- 350 10. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Le-Hesran JY, Cottrell G, Fievet N, Turner L, Sow S, Dangou JM,  
351 Theander T, Deloron P: **Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of**  
352 **senegalese pregnant women**. *J Infect Dis* 2006, **193**:713-720.
- 353 11. Duffy PE, Fried M: **Malaria in the pregnant woman**. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, **295**:169-  
354 200.
- 355 12. Duffy PE: **Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly**  
356 **preeclampsia**. *Parasitology* 2007, **134**:1877-1881.
- 357 13. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW: **Malaria in pregnancy: pathogenesis and**  
358 **immunity**. *Lancet Infect Dis* 2007, **7**:105-117.

- 359 14. Gangnard S, Tuikue Ndam NG, Gnidehou S, Quiviger M, Juillerat A, Faure G, Baron B, Viwami F,  
360 Deloron P, Bentley GA: **Functional and immunological characterization of the var2CSA-**  
361 **DBL5epsilon domain of a placental Plasmodium falciparum isolate.** *Mol Biochem Parasitol* 2010,  
362 **173:115-122.**
- 363 15. Bigey P, Gnidehou S, Doritchamou J, Quiviger M, Viwami F, Couturier A, Salanti A, Nielsen MA,  
364 Scherman D, Deloron P, Ndam NT: **The NTS-DBL2X Region of VAR2CSA Induces Cross-Reactive**  
365 **Antibodies That Inhibit Adhesion of Several Plasmodium falciparum Isolates to Chondroitin**  
366 **Sulfate A.** *Journal of Infectious Diseases* 2011, **204:1125-1133.**
- 367 16. Doritchamou J, Bigey P, Nielsen MA, Gnidehou S, Ezinmegnon S, Burgain A, Massougbdji A,  
368 Deloron P, Salanti A, Ndam NT: **Differential adhesion-inhibitory patterns of antibodies raised**  
369 **against two major variants of the NTS-DBL2X region of VAR2CSA.** *Vaccine* 2013, **31:4516-4522.**
- 370 17. Khattab A, Reinhardt C, Staalsoe T, Fievet N, Krensner PG, Deloron P, Hviid L, Klinkert MQ: **Analysis**  
371 **of IgG with specificity for variant surface antigens expressed by placental Plasmodium falciparum**  
372 **isolates.** *Malar J* 2004, **3:21.**
- 373 18. Diouf I, Fievet N, Doucoure S, Ngom M, Andrieu M, Mathieu JF, Gaye A, Thiaw OT, Deloron P: **IL-12**  
374 **producing monocytes and IFN-gamma and TNF-alpha producing T-lymphocytes are increased in**  
375 **placentas infected by Plasmodium falciparum.** *J Reprod Immunol* 2007, **74:152-162.**
- 376 19. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE: **Maternal antibodies block malaria.** *Nature*  
377 1998, **395:851-852.**
- 378 20. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE: **Maternal peripheral**  
379 **blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria.** *Malar J* 2008, **7:26.**
- 380 21. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, Meshnick SR: **Malaria**  
381 **and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth**  
382 **retardation.** *J Infect Dis* 1999, **180:1987-1993.**
- 383 22. Ampomah P, Stevenson L, Ofori MF, Barfod L, Hviid L: **Kinetics of B cell responses to Plasmodium**  
384 **falciparum erythrocyte membrane protein 1 in Ghanaian women naturally exposed to malaria**  
385 **parasites.** *J Immunol* 2014, **192:5236-5244.**
- 386 23. Ndam NT, Denoeud-Ndam L, Doritchamou J, Viwami F, Salanti A, Nielsen MA, Fievet N,  
387 Massougbdji A, Luty AJ, Deloron P: **Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor**  
388 **Outcomes during Pregnancy, Benin.** *Emerg Infect Dis* 2015, **21:813-823.**
- 389 24. Gbedande K, Cottrell G, Vianou B, Ibitokou S, Fernando A, Troye-Blomberg M, Salanti A, Moutairou  
390 K, Massougbdji A, Ndam NT, et al: **Infections with Plasmodium falciparum during pregnancy**  
391 **affect VAR2CSA DBL-5 domain-specific T cell cytokine responses.** *Malar J* 2016, **15:485.**

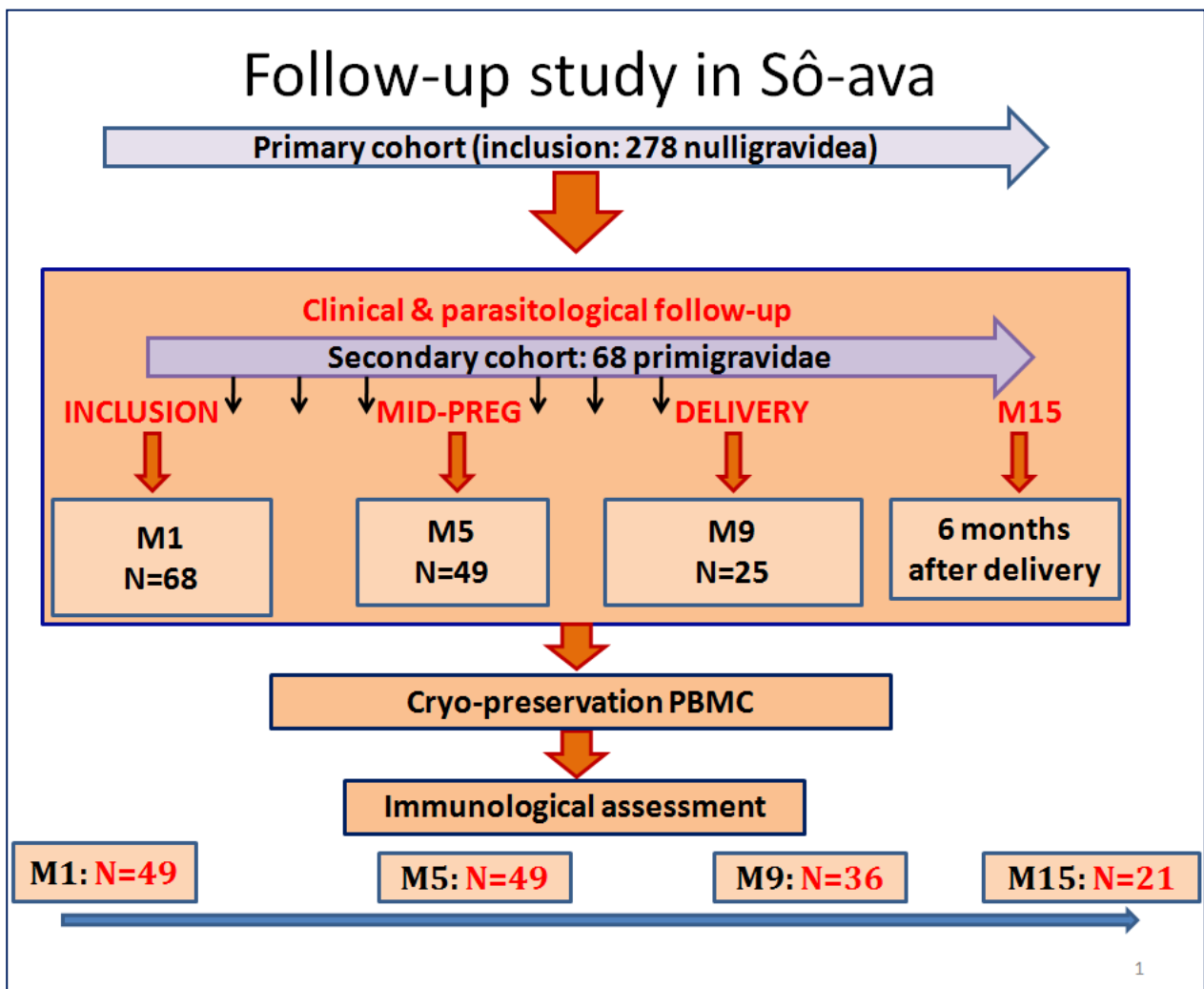
392

393

394 **Figures legend**

395 **Fig. 1 Study design**

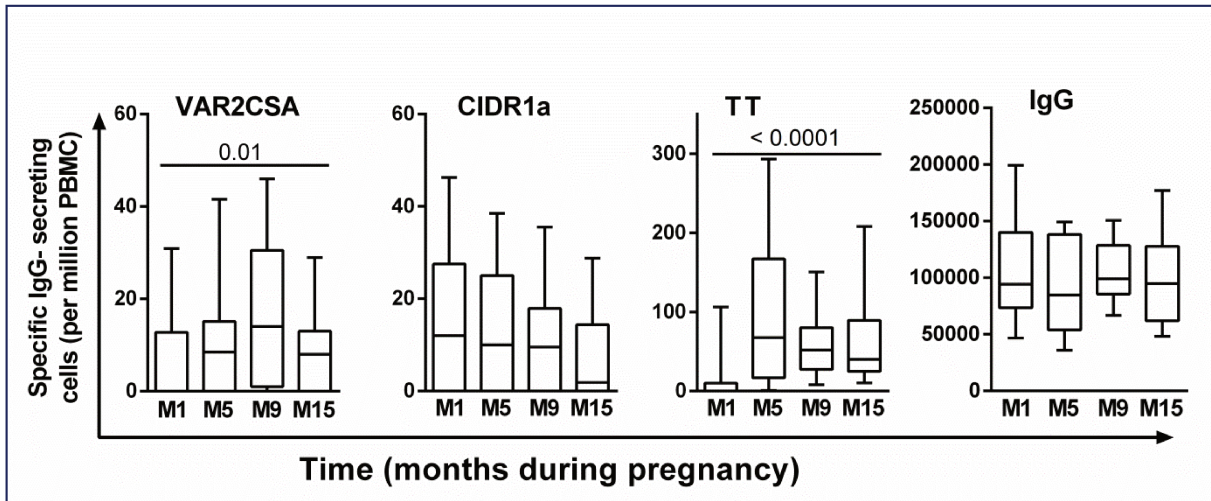
396 Within the PlacMalVac cohort, we focused on sixty-eight primigravid women enrolled in the study  
397 with active clinical and parasitological surveillance at each antenatal monthly visit: cellular  
398 immunological responses were quantified at 4 different times during the follow-up: i) first month of  
399 pregnancy (M1), ii) fifth month of pregnancy (M5), iii) at delivery (M9) and 6 months post-delivery  
400 (M15).



401

402 **Figure 1:** flow chart of the study population

403 **Fig. 2** Frequencies of specific memory B cells during pregnancy and post delivery  
404 IgG-secreting B cells frequencies in response to VAR2CSA, CIDR1a, TT and total IgG during  
405 pregnancy and post delivery are shown. All box plots illustrate medians with 25th and 75th  
406 percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles. p-values were determined by the non-  
407 parametric Kruskal-Wallis test in an univariate analysis and significant differences are depicted by  
408  $p < 0.05$ .

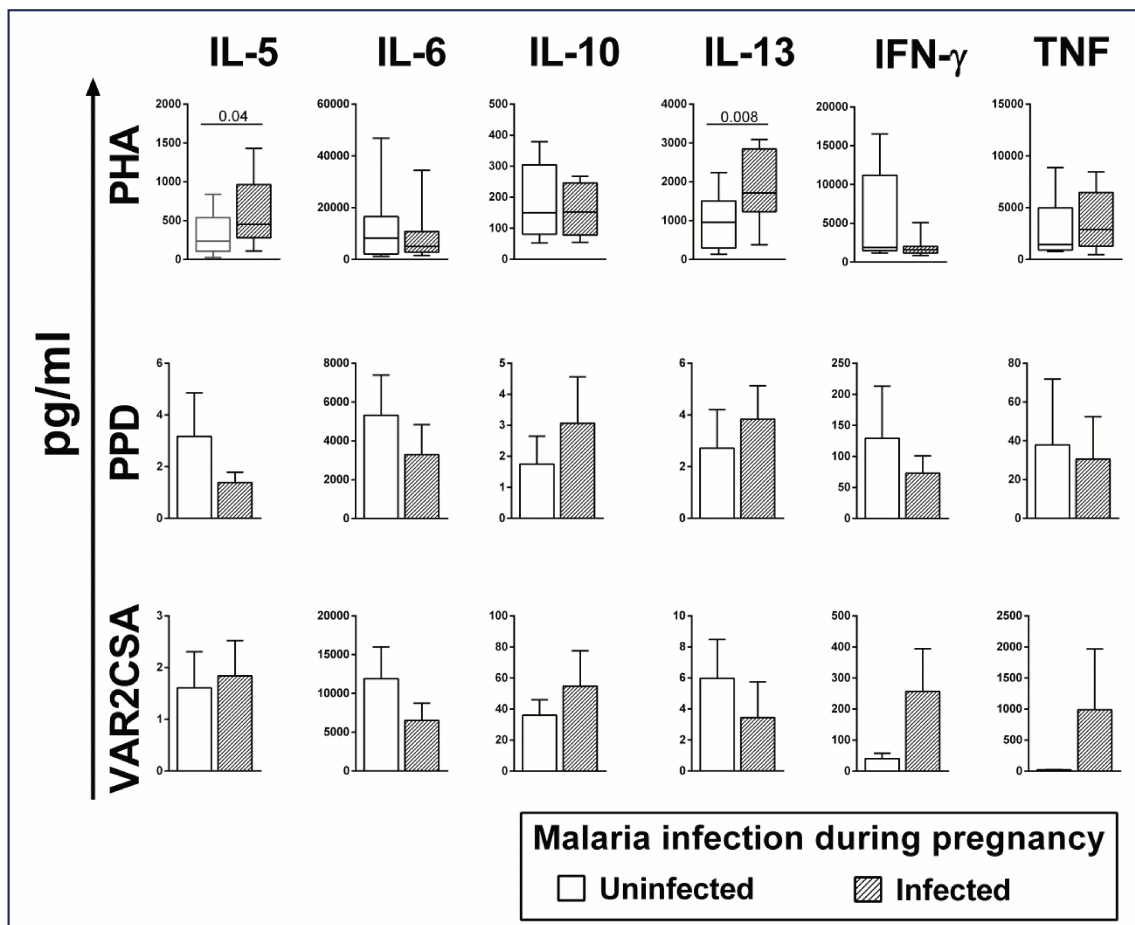


409  
410 **Figure 2: Frequencies of specific memory B cells during pregnancy and post delivery**

411



412 **Fig. 3 Cytokines responses in PBMC at delivery (M9) according to malaria histories during**  
 413 **pregnancy.** Cytokines production in PBMC at delivery in response to PHA, PPD and VAR2CSA  
 414 are shown. The two groups of women were defined based on their exposure to *Plasmodium*  
 415 *falciparum* infection during pregnancy: i) those who remained uninfected throughout (white box  
 416 plot), ii) those who had had at least 1 infection during pregnancy but who were not infected at  
 417 delivery (black-hatched box plot). Cytokine production in response to PHA is illustrated by  
 418 medians with 25th and 75th percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles. The box plots  
 419 for cytokines production in response to PPD and VAR2CSA show the mean with SEM (standard  
 420 error of the mean). The statistical significance of differences between groups was determined using  
 421 the non-parametric Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ .

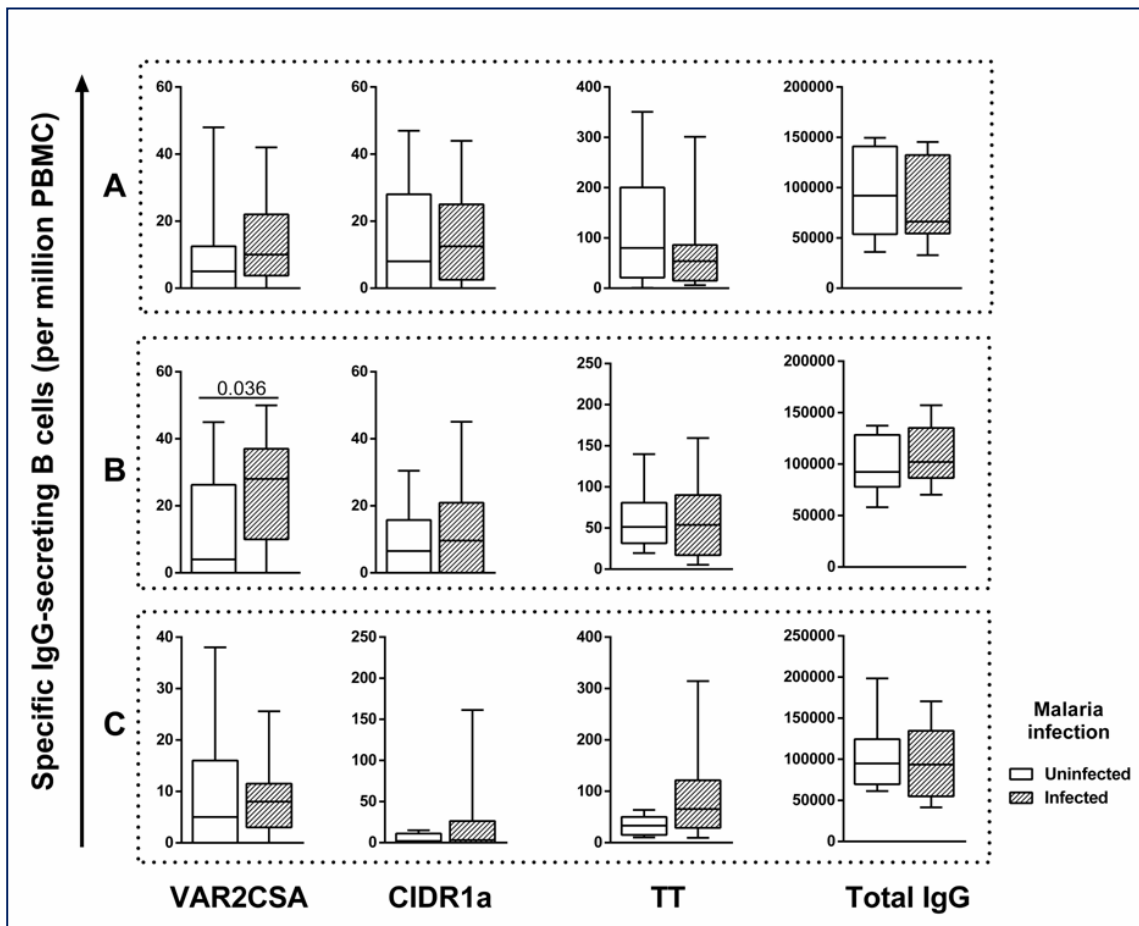


422  
 423 **Figure 3: Cytokines responses in PBMC at delivery (M9) according to malaria histories**  
 424 **during pregnancy**

425

426 **Fig. 4** Frequencies of specific memory B cells (at M5, M9 and M15) according to malaria  
 427 **infection**

428 **A)** Represents specific IgG-secreting B frequencies at the fifth month of pregnancy (M5), according  
 429 malaria infection between M1 and M5, in response to VAR2CSA, CIDR1a, TT and total IgG. **B)**  
 430 Represents specific IgG-secreting B frequencies at delivery (M9), according malaria infection  
 431 during pregnancy, in response to VAR2CSA, CIDR1a, TT and total IgG. **C)** Illustrates specific  
 432 IgG-secreting B frequencies at six months post delivery (M15), according malaria infection during  
 433 pregnancy, in response to VAR2CSA, CIDR1a, TT and total IgG. All box plots illustrate medians  
 434 with 25th and 75th percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles. The statistical  
 435 significance was determined using Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ .



436  
 437 **Figure 4: Frequencies of specific memory B cells (at M5, M9 and M15) according to malaria**  
 438 **infection**

# **DISCUSSION GENERALE**

Dans le contexte du développement clinique du premier vaccin pour la prévention du paludisme associé à la grossesse, mon travail de thèse s'est intéressé principalement aux conséquences du paludisme gestationnel sur les réponses immunologiques du nouveau-né et à l'étude de la réponse mémoire dirigée contre le candidat vaccin, VAR2CSA.

Cette thèse se décompose en deux parties pour étudier:

- l'impact du PAG sur des dysfonctionnements immunologiques pendant la première année de vie sur une cohorte d'enfants au Bénin
- la construction naturelle de la mémoire immunologique cellulaire dirigée contre deux parties de VAR2CSA, l'antigène spécifique du PAG (le domaine DBL5 et les domaines ID1-DBL2-ID2a).

Une troisième partie devait évaluer les réponses mémoires induites par le vaccin dans le cadre de l'essai clinique de Phase I mais en raison de problèmes logistiques, l'essai clinique de Phase Ib ne commencera qu'en octobre 2016 au Bénin.

Les cohortes STOPPAM et PlacMalVac sur lesquelles j'ai travaillé au cours de cette thèse sont uniques par le fait qu'elles comportent non seulement des suivis longitudinaux mais aussi qu'elles utilisent des approches multidisciplinaires. L'originalité de ces cohortes repose sur la collecte des données cliniques, anthropométriques et parasitologiques pendant toute la grossesse et la première année de vie des nouveau-nés. De plus, des échographies obstétricales (4 échographies/femme) ont permis d'évaluer l'âge exact de la grossesse ainsi que la croissance fœtale. La qualité des données collectées sur les cohortes du projet STOPPAM nous a permis de créer des groupes particuliers en fonction des différentes histoires palustres au cours de la grossesse afin de mieux apprécier l'effet d'une infection précoce ou tardive de la mère sur les modifications des réponses immunologiques futures du nouveau-né. La cohorte des primigestes de PlacMalVac est encore plus particulière car ces femmes ont été suivies à partir du premier mois de grossesse. Pour cela, nous avons réalisé un suivi de femmes nulligestes (cohorte primaire) avec un test de grossesse mensuel afin d'identifier et d'inclure les femmes enceintes dans une cohorte secondaire. Cependant, mon travail porte essentiellement sur des explorations onéreuses de l'immunité cellulaire et nous avons dû faire des choix pour travailler sur des sous groupes de sujets issus de ces cohortes. Au total, le fait de travailler sur de petits effectifs est pénalisant en terme d'analyses statistiques malgré les bénéfices des suivis de cohortes qui ont permis une description précise des données cliniques et parasitologiques.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé différentes approches méthodologiques pour l'évaluation des réponses cellulaires. Dans le projet STOPPAM nous avons travaillé

directement sur du sang total pour l'étude chez les enfants et sur des PBMC fraîches sans congélation pour les explorations des réponses T. Par contre pour le projet PlacMalVac, afin de traiter les différents échantillons collectés pendant la grossesse au même moment au laboratoire, nous avons travaillé sur des cellules congelées.

Alors que nous avons utilisé les marquages intracytoplasmiques par cytométrie en flux pour la quantification des cellules T sécrétrices de l'IFN- $\gamma$ , nous avons utilisé l'ELISPOT pour quantifier les cellules B mémoires spécifiques. L'ELISPOT est une des techniques les plus efficaces disponibles actuellement pour la détection, la mesure et l'analyse fonctionnelle des cellules immunitaires. Cette technique, utilisée pour évaluer l'efficacité immunologique des vaccins, peut être utile en recherche préclinique et clinique. Dans le cadre du projet PlacMalVac, j'ai mis en place cette technique au laboratoire à Cotonou avec l'installation de la plateforme en 2014.

Des données épidémiologiques montrent une plus grande morbidité durant la petite enfance des enfants exposés *in utero* au paludisme [13, 271] et le suivi des enfants du projet STOPPAM a confirmé ces résultats [262]. Notre objectif était de générer de nouvelles données sur des dysfonctionnements immunologiques pendant les 12 premiers mois de vie associés à la plus grande susceptibilité des enfants exposés *in utero* au paludisme. Il nous paraissait important de s'intéresser à l'immunité innée via les TLR et les cellules NK ainsi qu'à l'immunité adaptative via l'évolution des fréquences de populations lymphocytaires.

Pour les analyses immunologiques réalisées chez les nouveau-nés, nous avons choisi de travailler sur du sang total (sang du cordon à la naissance et circulant des enfants), afin de préserver l'intégrité des cellules faiblement représentées (Treg et DC) dans la circulation sanguine et de travailler dans les conditions physiologiques en présence de l'ensemble des constituants sanguins.

Pour mieux comprendre l'impact du PAG sur l'évolution des réponses des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au cours de la première année de vie, nous avons estimé l'activité de ces cellules néonatales par la mesure des cytokines dans les surnageants après avoir stimulé des CPA via des ligands spécifiques des TLR. Les récepteurs TLR sont utilisés dans plusieurs processus immunologiques comme cibles thérapeutiques et leurs ligands sont impliqués dans la formulation des vaccins. C'est le cas des ligands du TLR4 impliqués dans la formulation de l'adjuvant de plusieurs vaccins (papillomavirus humain et hépatite B) [272, 273]. Des essais cliniques sont en cours pour l'utilisation des ligands des TLR3, TLR7, TLR8, et TLR9 comme adjuvants pour des vaccins contre les infections bactériennes, parasitaires et

virales [274-276]. Ainsi nous avons étudié les réponses des TLR3, TLR4, TLR7/8 et TLR9 avec quatre ligands à savoir le CpG ODN 2216, le Poly I:C, le LPS et le Résiquimod. Quatre cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 et TNF) ont été dosées dans les surnageants de culture après 24 heures de stimulation des TLR.

La plupart des études portant sur l'activité des CPA en relation avec le PAG sont réalisées uniquement à la naissance sur le sang du cordon et très peu sur le suivi des enfants. Néanmoins, il existe quelques données publiées sur l'ontogenèse de l'immunité du nouveau-né via l'étude des CPA pendant les premiers mois de vie [184, 190, 191]. Les CPA via les TLR jouent un rôle prépondérant dans l'initiation des réponses immunologiques car elles interviennent dans l'orientation de la balance entre les réponses de type Th1 et de type Th2 [277, 278]. En accord avec d'autres études sur les TLR, nos résultats sur l'ensemble du suivi, montrent une faible production de cytokines en réponse au TLR9 alors que la stimulation des TLR7/8 avec le Résiquimod induit une forte concentration de toutes les cytokines mesurées [190, 279, 280].

La première partie de nos analyses décrit l'évolution dans le temps, de la naissance à 12 mois, des réponses cytokiniques après stimulation des TLR et des fréquences des lymphocytes. Bien que l'ensemble des composants de l'immunité existe à la naissance, le système immunitaire du nouveau-né est considéré comme naïf avec des différences fonctionnelles par rapport à celui de l'adulte [281, 282] et la mise en place des mécanismes immunitaires nécessaires pour une réponse immune efficace se fait progressivement pendant les premiers mois de vie.

D'une manière générale, les réponses cytokiniques après stimulation avec les 4 ligands des TLR augmentent avec l'âge. Nous avons observé des productions d'IL-6 et d'IL-10 conséquentes à la naissance alors que les sécrétions des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) étaient plus faibles à la naissance pour augmenter à partir de 3 mois de vie. Nos résultats sont concordants avec ceux de l'équipe de Burl et al. sur un suivi d'enfants en Gambie et dont les conditions de temps de stimulation (18-24h) et de matériel biologique (sang total) étaient similaires aux nôtres [190] et aussi avec d'autres études [184, 191]. Par contre, nous n'avons pas observé de production d'IFN- $\gamma$  à la naissance en réponse au TLR7/8 comme chez les enfants Gambiens. Cette différence serait liée aux différents stimuli utilisés entre les deux études. Chez les enfants Gambiens, trois stimuli ont été utilisés pour stimuler les TLR7 et TLR8 et aussi les TLR7/8 simultanément alors que nous avons utilisé un seul ligand, le Résiquimod pour stimuler les TLR7/8. Nos données sur le phénotypage des cellules immunitaires montrent, en fonction de l'âge, une diminution de la fréquence des lymphocytes

T CD4<sup>+</sup>, des cellules NK, des lymphocytes NKT ainsi que l'expression de la protéine FoxP3 par les lymphocytes Treg. A l'inverse, les fréquences de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et Treg augmentent avec l'âge de l'enfant. La diminution de la fréquence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au cours de l'enfance a déjà été observée chez des enfants plus âgés (1 à 13 ans) [283, 284]. Contrairement à nos résultats, Sundstrom et al. ont montré que la fréquence des cellules T CD4<sup>+</sup> restait stable pendant la petite enfance [285]. L'augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pendant la première année de vie confirme certaines études antérieures [285, 286]. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se différencient en plusieurs populations lymphocytaires (Treg, T effecteurs) lors des processus de maturation et de différenciation lymphocytaires par le contact avec des antigènes. Ce phénomène pourrait expliquer la diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pendant la première année de vie. De la même manière, l'augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, Treg et Teff pendant la première année de vie s'expliquerait par la maturation du système immunitaire de l'enfant au cours des premiers mois de vie. Ce phénomène est très bien illustré par les diminutions pendant la première année de vie des ratios CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et Treg/Teff. L'augmentation de la fréquence des Treg et de l'expression relative de Foxp3 sur des Treg<sup>high</sup>, de la naissance à 6 mois de vie, confirment les résultats trouvés dans d'autres études montrant une augmentation de la fréquence des lymphocytes T exprimant la protéine FoxP3 dans le sang périphérique peu après la naissance par rapport au sang du cordon [287, 288]. La maturation et l'effet suppresseur des Treg sont décrits comme FoxP3-dépendants. La plus faible expression de FoxP3 dans la population de Treg<sup>high</sup> du sang du cordon suggère que les Treg à la naissance sont encore immatures pour avoir un effet suppresseur comparé aux cellules de l'enfant et de l'adulte [281, 282, 289]. Les cellules NK jouent un rôle très important dans les réponses immunitaires innées qui sont relativement plus importantes pendant la petite enfance. Ce phénomène pourrait expliquer la fréquence plus élevée des cellules cytotoxiques NK<sup>dim</sup> que nous avons observée à la naissance. La diminution de la fréquence des NK<sup>dim</sup> (impliquée dans le phénomène de la cytotoxicité) et l'augmentation des NK<sup>bright</sup> (produisant des cytokines) au cours de la première année de vie confirment les résultats de Sundstrom et al [285]. L'hétérogénéité des différentes populations étudiées ainsi que les matériels biologiques (sang total ou cellules) pourraient aussi expliquer les différents résultats observés sur les profils des fréquences des cellules lymphocytaires durant l'enfance.

Le deuxième objectif de ces travaux était d'évaluer l'effet d'une infection palustre maternelle sur l'orientation des réponses immunologiques du nouveau-né. Afin d'avoir une meilleure

appréciation du moment de l'exposition *in utero* aux antigènes du paludisme sur l'immunité néonatale, nous avons étudié l'impact du PAG en fonction de trois « histoires » palustres pendant la grossesse :

- i) l'infection maternelle avant le troisième trimestre de la grossesse,
- ii) l'infection maternelle durant le troisième trimestre de la grossesse,,
- iii) l'infection maternelle à l'accouchement.

Les analyses statistiques sont devenues complexes car nous devons tenir compte des 2 histoires palustres, celle de la mère et celle de l'enfant ainsi que des variables confondantes comme l'anémie maternelle, la gestité, l'âge gestationnel et l'âge de l'enfant. Pour mieux illustrer nos résultats, nous avons choisi de représenter des profils prédictifs des données immunologiques du nouveau-né issus des analyses multivariées. Le contact *in utero* avec les antigènes palustres entre le début et le troisième trimestre de la grossesse n'affecte pas les réponses immunologiques du nouveau-né et que seule l'infection palustre à l'accouchement modifie les réponses immunologiques innées et adaptatives du nouveau-né au cours de la première année de vie.

L'infection maternelle à l'accouchement n'affecte pas les réponses cytokiniques après stimulation du TLR4 alors qu'elle modifie les profils de réponse des TLR intracellulaires exprimés dans l'endosome dont les TLR3, TLR7/8 et TLR9 après stimulation. A l'exception de la faible production de TNF- $\alpha$  à 6 mois en réponse à l'activation du TLR9, tous les effets observés pour ces TLR, en fonction de l'infection palustre de la mère à l'accouchement, concernent une plus forte production de cytokines (IL6, TNF et IL-10) à la naissance ou plus tard (3, 6 et 12 mois).

Au décours d'une infection palustre, des concentrations importantes d'IL-6 et d'IL-10 plasmatiques sont associées à un déficit de production d'IFN- $\gamma$  nécessaire à l'élimination des parasites [171]. Les enfants qui développent des accès palustres graves expriment de plus fortes concentrations d'IL-6 et d'IL-10 plasmatiques, associées à une susceptibilité à l'infection palustre [290, 291]. De plus, des concentrations élevées d'IL-10 sont associées à un défaut de contrôle de la parasitémie chez les jeunes enfants [292].

Ainsi nos résultats suggèrent que les réponses cytokiniques des TLR sont modifiées suite au contact *in utero* avec des antigènes solubles du *P. falciparum*. Ces modifications pourraient participer à la susceptibilité des nouveau-nés à l'infection palustre.

Pour les profils des différents phénotypes cellulaires étudiés, l'infection palustre de la mère à l'accouchement affecte les fréquences des cellules T CD4 et CD8, Treg, NK<sup>dim</sup> et les NKT.



Les fréquences des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> présentent des profils inverses en fonction de l'infection palustre de la mère à l'accouchement. Les enfants nés de mères infectées à l'accouchement ont un profil de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui diminue de 3 à 6 mois, contrairement au profil des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui augmente de la naissance à 6 mois comparés aux enfants nés des mères non infectées. Les cellules Treg sécrètent majoritairement de l'IL-10 et du TGF-β pour leurs fonctions suppressives et le maintien de l'homéostasie cellulaire nécessaire au contrôle des réponses inflammatoires de nouveau-né [112-114]. Parallèlement à la production plus élevée d'IL-10 en réponse à la stimulation du TLR3 à 3 mois, nous avons observé une fréquence plus élevée des lymphocytes Treg à 3 mois chez les enfants issus des mères infectées à l'accouchement que chez les autres. Il a été montré que les cellules Treg induites suite à un contact *in utero* avec les allo-antigènes des mères peuvent persister dans la circulation après la naissance [165, 293]. La stimulation *ex vivo* des cellules de sang du cordon par des antigènes de *P. falciparum* a été associée à l'émergence des cellules T CD4 ayant un phénotype Treg [186]. Nos données concordent avec d'autres études qui n'ont pas trouvé d'associations entre le paludisme gestationnel et les fréquences des cellules T effecteurs et Treg à la naissance dans le sang du cordon [206, 294].

Il a été montré que l'altération des récepteurs TLR, comme TLR3 et TLR9, augmente la susceptibilité aux infections virales et bactériennes [295-297] et pourrait influencer les réponses spécifiques à la vaccination [298]. Nos résultats suggèrent une modification des mécanismes des réponses immunologiques des nouveau-nés suite au contact *in utero* avec l'antigène palustre. Cette modification serait associée à la production perturbée des cytokines nécessaires au contrôle des infections ainsi qu'à l'augmentation de la fréquence des Treg, traduisant une susceptibilité immunologique vis-à-vis de l'infection palustre [11]. Indirectement, des réponses inflammatoires importantes dans les espaces intervilleux en réponse à la séquestration d'hématies parasitées pourraient aussi déclencher des réponses inflammatoires fœtales et orienter les réponses néonatales comme cela est proposé dans les processus lésionnels cérébraux des nouveau-nés dans les cas d'infections intra-utérines [299, 300]

Enfin, dans une analyse prospective nous avons montré qu'une production élevée d'IL-10 à la naissance en réponse à la stimulation du TLR3 et du TLR7/8 ainsi qu'une forte fréquence des cellules Teff à la naissance étaient associées à un risque d'infection palustre au cours de la première année de vie. Ces résultats suggèrent qu'une altération des réponses immunitaires innées associées à une forte production d'IL-10 à la naissance prédispose à l'infection au cours des premiers mois de vie.

Dans la seconde partie de cette thèse je me suis intéressé à l'étude de la mémoire immunologique spécifique de VAR2CSA.

Le plus souvent, la validation de l'immunogénicité des candidats vaccins contre le paludisme se fait par des études des réponses humorales qui permettent de valider le potentiel des antigènes candidats. Pour ma thèse, je me suis focalisé sur l'étude de réponses immunologiques cellulaires des lymphocytes T et B et de leurs implications dans le maintien de la mémoire spécifique de VAR2CSA. Pour cela j'ai travaillé avec deux antigènes du PAG dont un candidat vaccin sur deux suivis de cohortes de femmes enceintes réalisés successivement au Bénin afin de pouvoir étudier l'évolution des réponses *in vitro* des lymphocytes T et B pendant la grossesse et en fonction des infections palustres pendant la grossesse. Dans un premier temps, j'ai étudié les réponses cytokiniques des cellules T en présence du domaine DBL5 de VAR2CSA. Au moment du projet STOPPAM, le domaine DBL5 de la protéine VAR2CSA était LE domaine le plus prometteur en tant que candidat vaccin contre le PAG [301]. Ensuite, je me suis intéressé à l'étude des réponses des cellules T et B mémoires spécifiques des domaines ID1-DBL2-ID2a de VAR2CSA dans le cadre du développement clinique du vaccin PAMVAC.

L'étude quantitative et qualitative de l'immunité des cellules T en réponse à VAR2CSA-DBL5 (réponse spécifique) et à la PHA (réponse non spécifique) a été réalisée *in vitro* sur deux sous groupes parmi les 1037 femmes du projet STOPPAM. Ces deux sous populations ont été sélectionnées au début de la grossesse (âge gestationnel  $\leq 24$  semaines) (142 femmes) et à l'accouchement (125 femmes) en fonction de leur histoire palustre. Après stimulation des PBMC avec la PHA et l'antigène VAR2CSA-DBL5, cinq cytokines (IL-10, IL-13, IL-17, TNF et IFN- $\gamma$ ) ont été dosées dans les surnageants de culture. Nous avons aussi quantifié les cellules T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) sécrétrices de l'IFN- $\gamma$ . Indépendamment de l'infection palustre, les concentrations des cytokines et les fréquences des cellules T sécrétrices de l'IFN- $\gamma$  en réponse au mitogène sont toujours plus faibles à l'accouchement qu'à l'inclusion. Cette diminution a été observée uniquement pour la production d'IL-13 et du TNF en réponse au VAR2CSA-DBL5. Ces résultats concordent avec la diminution de la fréquence des cellules T CD4<sup>+</sup> avec l'âge gestationnel observé précédemment chez les mêmes femmes du projet STOPPAM [302]. Le travail de l'accouchement est décrit comme un moment particulier [142] et l'interprétation de nos résultats sur les réponses cellulaires spécifiques doit tenir compte du "timing" de la grossesse en raison de l'immunomodulation qui varie pendant les 9 mois de grossesse.

La stimulation des CMN et la conservation des surnageants de culture pour la mesure des cytokines et les marquages intra cytoplasmiques ont été réalisées systématiquement dans les 4 heures qui ont suivi les prélèvements veineux pendant le suivi STOPPAM. La quantité de sang étant limitée, nous n'avons testé qu'un domaine (DBL5) et un mitogène pour l'évaluation des réponses mémoires VAR2CSA spécifiques.

A l'inverse, l'étude de la réponse humorale a permis d'étudier les anticorps spécifiques des six différents domaines de VAR2CSA dans le plasma et montre une variabilité quantitative et qualitative des réponses anticorps en fonction de l'histoire palustre des femmes et de la gestité [239]. L'infection palustre au cours de la grossesse est associée à une augmentation des niveaux d'anticorps de l'inclusion à l'accouchement contre les protéines VAR2CSA de tous les domaines étudiés sauf pour le domaine DBL5 dont le niveau d'anticorps reste stable durant toute la grossesse chez les femmes infectées [239]. Par contre, ces niveaux d'anticorps anti- DBL5 diminuent de l'inclusion à l'accouchement chez les femmes non infectées durant la grossesse.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer l'impact de l'infection palustre sur les réponses *in vitro* des cellules T au début et à la fin de la grossesse. L'infection palustre n'affecte pas les réponses T *in vitro* au début de la grossesse. Par contre, les réponses cellulaires sont modifiées à l'accouchement.

Les cellules T CD8<sup>+</sup> sécrétrices d'IFN- $\gamma$  spécifiques de VAR2CSA-DBL5 sont plus nombreuses chez les multigestes que chez les primigestes. Les réponses anticorps spécifiques de VAR2CSA-DBL5 sont gestité-dépendantes [20, 239], ainsi que les cellules T CD8<sup>+</sup> sécrétrices d'IFN- $\gamma$ . Ceci suggère l'acquisition d'une mémoire cellulaire au cours des grossesses infectées antérieures.

Dans une analyse prospective, la production non spécifique de TNF et la fréquence des cellules T CD8<sup>+</sup> sécrétrices d'IFN- $\gamma$  en réponse à la PHA au début du 2<sup>em</sup> trimestre de la grossesse sont associées à un risque d'infection palustre ultérieure. Ces résultats suggèrent qu'une activation des réponses inflammatoires au début du 2<sup>eme</sup> trimestre est associée à une altération des réponses immunitaires prédisposant à l'infection au cours de la grossesse.

Les stratégies actuelles de lutte contre le paludisme ont un impact sur les parasitémies des infections palustres. En parallèle, les diagnostics par PCR ont permis de tenir compte des très faibles parasitémies, les infections submicroscopiques. Sur la cohorte STOPPAM au Bénin, les infections palustres notamment les infections submicroscopiques ont un impact sur la

fréquence des petits poids de naissance et sur l'anémie à l'accouchement [7]. Pour mieux appréhender l'effet du PAG sur l'immunité cellulaire, nous avons classifié l'infection palustre en 3 groupes: négative (goutte épaisse négative et PCR négative), infections submicroscopiques (goutte épaisse négative et PCR positive) et infections microscopiques (goutte épaisse positive et PCR positive). Nous avons d'abord étudié l'impact d'une infection submicroscopique sur la mise en place de l'immunité anti-VAR2CSA-DBL5 chez la femme enceinte. Contrairement à l'effet des infections submicroscopiques sur le risque de l'anémie maternelle à l'accouchement et sur le niveau des cytokines dans le plasma observé chez les femmes du projet STOPPAM [7, 303]; les infections palustres submicroscopiques n'affectent pas les réponses immunologiques après une stimulation *in vitro* des cellules ni au début de la grossesse ni à l'accouchement [303]. Ce qui suggère qu'un seuil de parasitémie est nécessaire pour induire une réponse immunologique cellulaire chez la femme enceinte. Ainsi, au cours de la grossesse, seules les infections microscopiques influent sur les réponses immunes *in vitro*. L'infection palustre au cours de la grossesse est associée à une production plus importante d'IFN- $\gamma$  en réponse à la PHA et au VAR2CSA-DBL5 ainsi qu'à une production non spécifique d'IL-13 après stimulation des cellules à l'accouchement. Ceci suggère que le contact avec les antigènes palustres spécifiques du PAG au cours de la grossesse induit une stimulation primaire des cellules permettant la mise en place des réponses inflammatoires nécessaires à l'élimination des parasites lors d'une stimulation ultérieure spécifique et non spécifique. Dans cette étude, la production d'IL-10 en réponse aux stimulations spécifiques et non spécifiques est plus faible chez les femmes infectées à l'accouchement que chez les femmes non infectées. Par contre, le niveau d'IL-10 plasmatique à l'accouchement est plus élevé chez ces femmes non infectées que chez les femmes infectées [303]. Cette diminution de réponse d'IL-10 après une stimulation *in vitro* des cellules des femmes infectées à l'accouchement serait liée à un phénomène d'épuisement des cellules en activité. Les infections palustres répétées sont associées à l'expansion de cellules T épuisées et aussi de cellules B atypiques [227].

Dans le cadre du développement clinique du vaccin VAR2CSA, nous avons étudié en amont de l'essai clinique de Phase I, la construction naturelle d'une mémoire cellulaire spécifique de l'antigène vaccinal (ID1-DBL2-ID2a) au cours de la première grossesse dans une zone de forte endémie palustre. Pour les analyses immunologiques, des prélèvements veineux ont été réalisés à 4 moments durant le suivi clinique et parasitologique des primigestes (au début de la grossesse, à 5 mois de la grossesse, à l'accouchement et 6 mois après accouchement). Les lymphocytes T et B mémoires ont été quantifiés via les fréquences

des cellules B mémoires et la mesure des cytokines produites après stimulation des PBMC. En plus de l'antigène vaccinal, d'autres antigènes ont été utilisés pour une meilleure interprétation des résultats:

- i) la PHA, la PPD pour l'étude des cellules T via la mesure des réponses cytokiniques;
- ii) la toxine tétanique, le CIDR1a (domaine de PfEMP1 non spécifique du PAG) et un anti-IgG total pour la quantification des cellules B mémoires.

Indépendamment de l'infection palustre, nous avons observé une augmentation entre l'inclusion et l'accouchement de la fréquence des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal VAR2CSA et de la toxine tétanique au cours de la grossesse, de l'inclusion à l'accouchement. A l'inverse, les fréquences des cellules B productrices d'IgG non spécifiques et spécifiques de l'antigène CIDR1a ne changent pas durant la grossesse.

Deux comparaisons de l'évolution des réponses pendant la grossesse sont intéressantes; entre les deux antigènes palustres qui ont des spécificités différentes et entre le candidat vaccin et la toxine tétanique. Premièrement, nous avons montré une augmentation de la fréquence des cellules B mémoires spécifiques de VAR2CSA, de l'inclusion à l'accouchement puis une diminution de la fréquence de ces cellules après l'accouchement. Nos données confirment celles d'une étude au Ghana [238]. Cette augmentation de fréquence des cellules B mémoires observée avec l'antigène VAR2CSA et non avec le CIDR1a, suggère l'induction de cellules B mémoires spécifiques de VAR2CSA au moment de leur premier contact avec des parasites spécifiques du PAG. La diminution de leur fréquence dans la circulation sanguine 6 mois après l'accouchement s'expliquerait par la migration des cellules B mémoires vers les organes lymphoïdes secondaires en absence de l'antigène du PAG. L'augmentation de la fréquence des cellules B mémoires anti-VAR2CSA consolide les résultats des études qui ont montré des niveaux d'anticorps spécifiques de VAR2CSA plus élevés à l'accouchement qu'au début de la grossesse [239]. D'autre part, la fréquence des cellules B mémoires spécifiques de la toxine tétanique augmente fortement chez les femmes au cinquième mois de la grossesse et est maintenue jusqu'à 6 mois après accouchement. Ce résultat déjà observé par d'autres équipes [238], confirme une réponse à la vaccination contre le tétanos au début de la grossesse selon les recommandations de l'OMS (au moment de la 1ère consultation prénatale). L'impact d'une vaccination de rappel et celui d'un contact avec un antigène ne sont pas les mêmes sur les niveaux des cellules B mémoires dans le sang périphérique.

Pour nos explorations sur les réponses cytokiniques à l'antigène vaccinal et à la PPD, nous n'avons pas observé de changement en fonction des infections au cours de la grossesse. Chez les primigestes, seules les productions non spécifiques d'IL-6 et du TNF augmentent au cours de la grossesse en réponse à la PHA. Ces résultats sont en contradiction avec ceux du projet STOPPAM dont la production du TNF en réponse à la PHA diminue entre l'inclusion et l'accouchement. Les temps de stimulation (24h pour STOPPAM et 72h pour PlacMalVac), l'âge gestationnel des inclusions (4<sup>ème</sup> mois de grossesse pour STOPPAM et 1<sup>er</sup> mois pour PlacMalVac), et les sites d'études (Comé et Sô-ava) différents entre les deux études pourraient expliquer ces différences.

L'infection palustre diagnostiquée par goutte épaisse au cours de la grossesse n'affecte que la fréquence des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène ID1-DBL2-ID2a contrairement aux autres antigènes testés (CIDR1a, TT). Ce résultat suggère que les cellules B mémoires induites suite aux premiers contacts avec les parasites placentaires reconnaissent *in vitro* le candidat vaccin. La fréquence plus élevée des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal est en accord avec les niveaux plus élevés d'anticorps spécifiques de VAR2CSA plus élevés en cas d'infection palustre au cours de la grossesse [23, 239]. L'infection palustre au cours de la grossesse n'affecte pas la production des cytokines en réponse à la stimulation spécifique par ID1-DBL2-ID2a ou la PPD, suggérant que la mesure des cytokines dans les surnageants de culture ne serait pas la meilleure méthode pour mieux appréhender l'implication des cellules T dans l'induction de l'immunité anti-VAR2CSA. Les techniques ELISPOT ou de marquage intracytoplasmique des cytokines auraient été plus sensibles pour la quantification des cellules mémoires spécifiques.

Dans une étude prospective nous avons montré que les productions non spécifiques d'IL-5 et d'IL-13 en réponse à la PHA, sont associées à un facteur de risque d'infection palustre au cours de la grossesse suggérant qu'une forte réponse de type Th2 au début de la grossesse prédispose à l'infection palustre. Notre interprétation est que les infections helminthiques dans la zone d'étude et notamment celles à *Schistosoma haematobium* dont la prévalence est estimée à 72% au début de la grossesse (Valérie Briand données non publiées), pourraient provoquer ce déséquilibre immunologique non spécifique et favoriser les réponses TH2 au tout début de la grossesse. Les réponses immunes aux helminthes sont de types Th2 et sont associées à une plus grande susceptibilité des enfants au paludisme [304].

**CONCLUSION GENERALE**  
**ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse a contribué à mieux apprécier les conséquences d'un contact *in utero* avec des antigènes plasmodiaux sur la mise en place des réponses immunologiques du nouveau-né. Le contact *in utero* aux antigènes solubles du parasite modifie et altère les réponses immunes innées et adaptatives futures du nouveau-né expliquant la plus grande fragilité des enfants nés de mères infectées pendant la grossesse vis à vis du paludisme et probablement à d'autres infections bactériennes ou virales. Ce phénomène pourrait aussi affecter les réponses spécifiques nécessaires à la vaccination des enfants exposés *in utero*. Ceci renforce l'intérêt de protéger la femme contre le paludisme pendant sa grossesse pour protéger le nouveau-né.

Plusieurs études ont montré des altérations des profils transcriptionnels des gènes codant pour les récepteurs TLR chez les nouveau-nés présentant certaines anomalies comme la prématurité [305-307]. Ce phénomène serait associé à une altération de la mise en place des réponses immunes protectrices chez le nouveau-né. L'exposition *in utero* aux antigènes plasmodiaux pourrait modifier les gènes transcriptionnels nécessaires aux réponses cytokiniques après stimulation des TLR et ainsi altérer le développement des réponses immunes efficaces. Pour cela, nous avons réalisé avec une dizaine d'échantillons des enfants du projet STOPPAM, une étude exploratoire sur certains transcrits des gènes des voies de signalisation impliqués dans les réponses TLR. Ce travail a été réalisé avec les culots de sang stimulés avec différents agonistes des TLR. Nous nous sommes intéressés aux niveaux d'expression des transcrits des TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, de deux variants du TLR4 (TLR4v1 et TLR4v3) et des deux protéines de différenciation des myéloïdes (MD2:myeloid differentiation protein), MD2 long et MD2 court. Les résultats préliminaires suggèrent une variabilité importante du niveau d'expression après stimulation par le LPS de MD-2 mais pas de TLR4. Nous envisageons de poursuivre les études des transcrits des TLR qui pourraient modifier et orienter les réponses immunologiques du nouveau-né exposé *in utero* au paludisme.

Dans la perspective du développement d'un vaccin contre le PAG, cette thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans l'acquisition naturelle d'une mémoire immunologique spécifique du candidat vaccin VAR2CSA (ID1-DBL2-ID2a). Les infections chroniques ou l'exposition répétée aux antigènes de *P. falciparum* en zone d'endémie sont associées à l'expansion des cellules T épuisées et B atypiques [40, 227, 229]. Cependant, il reste à déterminer si ces cellules atypiques ou épuisées remplissent réellement le rôle fonctionnel de cellule mémoire ou si elles représentent des cellules sécrétrices d'anticorps à courte durée de vie à l'inverse des plasmocytes qui ont une longue durée de vie [237].



L'expansion de ces différentes sous populations des cellules T et B mémoires expliquerait l'acquisition lente de l'immunité contre le paludisme; mais peu d'études ont exploré cette hypothèse au cours de la grossesse et lors du PAG. Vu l'actualité sur les différentes sous populations des cellules mémoires nécessaires à l'acquisition et au maintien de l'immunité anti-palustre, il serait essentiel d'avoir une évaluation qualitative de ces cellules mémoires spécifiques de VAR2CSA chez les femmes enceintes.

Nos perspectives sont d'évaluer les réponses immunologiques induites par le vaccin chez les sujets vaccinés pendant l'essai de Phase I qui définira la sécurité et la tolérance du vaccin, puis lors de l'essai de Phase II qui évaluera l'immunogénicité du vaccin.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO, *World Malaria Report*. <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2015/en/>, 2015.
2. WHO, *Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030*. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/fr/>, 2015.
3. Menendez, C., *Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control*. *Parasitol Today*, 1995. **11**(5): p. 178-83.
4. McGregor, I.A., *Epidemiology, malaria and pregnancy*, in *Am J Trop Med Hyg*. 1984. p. 517-25.
5. Duffy, P.E. and M. Fried, *Malaria in the pregnant woman*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **295**: p. 169-200.
6. Simpson, D.C., et al., *Plasma levels of apolipoprotein A1 in malaria-exposed primigravidae are associated with severe anemia*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8822.
7. Cottrell, G., et al., *Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. **60**(10): p. 1481-1488.
8. Desai, D.C., et al., *Malarial pancreatitis: report of two cases and review of the literature*. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(3): p. 930-2.
9. Muthusamy, A., et al., *Plasmodium falciparum-infected erythrocytes adhere both in the intervillous space and on the villous surface of human placenta by binding to the low-sulfated chondroitin sulfate proteoglycan receptor*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(6): p. 2013-25.
10. Adegnika, A.A., et al., *Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood*. *J Infect Dis*, 2008. **198**(6): p. 928-36.
11. Malhotra, I., et al., *Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya*. *PLoS Med*, 2009. **6**(7): p. e1000116.
12. Le Hesran, J.Y., et al., *Maternal placental infection with Plasmodium falciparum and malaria morbidity during the first 2 years of life*. *Am J Epidemiol*, 1997. **146**(10): p. 826-31.
13. Rachas, A., et al., *Placental malaria is associated with increased risk of nonmalaria infection during the first 18 months of life in a Beninese population*. *Clin Infect Dis*, 2012. **55**(5): p. 672-8.
14. Fried, M. and P.E. Duffy, *Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta*. *Science*, 1996. **272**(5267): p. 1502-4.
15. Huynh, B.T., et al., *Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin*. *Am J Trop Med Hyg*, 2011. **85**(2): p. 214-20.
16. Ouedraogo, S., et al., *Malaria and gravidity interact to modify maternal haemoglobin concentrations during pregnancy*. *Malar J*, 2012. **11**: p. 348.
17. Doritchamou, J., et al., *First-trimester Plasmodium falciparum infections display a typical "placental" phenotype*. *J Infect Dis*, 2012. **206**(12): p. 1911-9.
18. Fried, M., et al., *Maternal antibodies block malaria*. *Nature*, 1998. **395**(6705): p. 851-2.
19. Salanti, A., et al., *Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria*. *J Exp Med*, 2004. **200**(9): p. 1197-203.
20. Salanti, A., et al., *Several domains from VAR2CSA can induce Plasmodium falciparum adhesion-blocking antibodies*. *Malar J*, 2010. **9**: p. 11.
21. Srivastava, A., et al., *Var2CSA minimal CSA binding region is located within the N-terminal region*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20270.

22. Tuikue Ndam, N.G., et al., *Variable adhesion abilities and overlapping antigenic properties in placental Plasmodium falciparum isolates*. J Infect Dis, 2004. **190**(11): p. 2001-9.
23. Tuikue Ndam, N.G., et al., *Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women*. J Infect Dis, 2006. **193**(5): p. 713-20.
24. Ibitokou, S., et al., *Peripheral blood cell signatures of Plasmodium falciparum infection during pregnancy*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e49621.
25. Maghendji-Nzondo, S., et al., *Prevalence of malaria, prevention measures, and main clinical features in febrile children admitted to the Franceville Regional Hospital, Gabon*. Parasite, 2016. **23**: p. 32.
26. Daneshvar, C., et al., *Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(6): p. 852-60.
27. Lee, C.E., K. Adeeba, and G. Freigang, *Human Plasmodium knowlesi infections in Klang Valley, Peninsula Malaysia: a case series*. Med J Malaysia, 2010. **65**(1): p. 63-5.
28. Malhotra, I., et al., *Umbilical cord-blood infections with Plasmodium falciparum malaria are acquired antenatally in Kenya*. J Infect Dis, 2006. **194**(2): p. 176-83.
29. Abba, K., et al., *Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated P. falciparum malaria in endemic countries*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(7): p. CD008122.
30. WHO, *RAPPORT SUR LE PALUDISME DANS LE MONDE Résumé*. [www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/fr](http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/fr), 2015.
31. PNLP Bénin, *Rapport annuel d'activités*. [http://www.sante.gouv.bj/documents/PNLP/Rapport\\_annuel\\_PNLP\\_2014%20final.pdf](http://www.sante.gouv.bj/documents/PNLP/Rapport_annuel_PNLP_2014%20final.pdf), 2014.
32. GENTILINI, *Médecine tropicale* 6e édition. Lavoisier, 2012: p. 1334 p.
33. Chin, W., et al., *Experimental mosquito-transmission of Plasmodium knowlesi to man and monkey*. Am J Trop Med Hyg, 1968. **17**(3): p. 355-8.
34. Singh, B. and C. Daneshvar, *Human infections and detection of Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(2): p. 165-84.
35. Lucchi, N.W., et al., *A new single-step PCR assay for the detection of the zoonotic malaria parasite Plasmodium knowlesi*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31848.
36. Pasvol, G., *Protective hemoglobinopathies and Plasmodium falciparum transmission*. Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 284-5.
37. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
38. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
39. Scholzen, A. and R.W. Sauerwein, *How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in Plasmodium infection*. Trends Parasitol, 2013. **29**(5): p. 252-62.
40. Weiss, G.E., et al., *The Plasmodium falciparum-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000912.
41. Ghani, A.C., et al., *Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: consequences for interpretation of disease trends*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4383.
42. Langhorne, J., et al., *A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1730-4.
43. Palmeira, P., et al., *IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 985646.

44. Ricke, C.H., et al., *Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A*. Journal of Immunology, 2000. **165**(6): p. 3309-3316.
45. Pombo, D.J., et al., *Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum*. Lancet, 2002. **360**(9333): p. 610-7.
46. Marsh, K., et al., *Indicators of life-threatening malaria in African children*. N Engl J Med, 1995. **332**(21): p. 1399-404.
47. Marsh, K. and S. Kinyanjui, *Immune effector mechanisms in malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 51-60.
48. Trampuz, A., et al., *Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection*. Clin Orthop Relat Res, 2003(414): p. 69-88.
49. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 673-9.
50. Barnwell, J.W., R.J. Howard, and L.H. Miller, *Influence of the spleen on the expression of surface antigens on parasitized erythrocytes*. Ciba Found Symp, 1983. **94**: p. 117-36.
51. Buffet, P.A., et al., *The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology*. Blood, 2011. **117**(2): p. 381-92.
52. Chan, J.A., et al., *Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3227-38.
53. Kyes, S.A., et al., *Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9333-8.
54. McRobert, L., et al., *Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6597-602.
55. Winter, G., et al., *SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1853-63.
56. Snounou, G., et al., *High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction*. Mol Biochem Parasitol, 1993. **61**(2): p. 315-20.
57. Stemple, C.C., et al., *Smartphone-based optofluidic lab-on-a-chip for detecting pathogens from blood*. J Lab Autom, 2014. **19**(1): p. 35-41.
58. Mudanyali, O., et al., *Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone*. Lab Chip, 2012. **12**(15): p. 2678-86.
59. Hopkins, H., et al., *Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda*. J Infect Dis, 2013. **208**(4): p. 645-52.
60. Polley, S.D., et al., *Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria*. J Infect Dis, 2013. **208**(4): p. 637-44.
61. Yadouleton, A.W., et al., *Insecticide resistance status in Anopheles gambiae in southern Benin*. Malar J, 2010. **9**: p. 83.
62. Aikpon, R., et al., *Bendiocarb resistance in Anopheles gambiae s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control*. Parasit Vectors, 2013. **6**: p. 192.
63. Djogbenou, L., et al., *Insecticide resistance in the Anopheles gambiae complex in Benin: a nationwide survey*. Med Vet Entomol, 2011. **25**(3): p. 256-67.
64. N'Guessan, R., et al., *Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(2): p. 199-206.

65. Agossa, F.R., et al., *Impact of Insecticide Resistance on the Effectiveness of Pyrethroid-Based Malaria Vectors Control Tools in Benin: Decreased Toxicity and Repellent Effect*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145207.
66. Hammond, A., et al., *A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector Anopheles gambiae*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(1): p. 78-83.
67. Gantz, V.M., et al., *Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(49): p. E6736-43.
68. Noedl, H., et al., *Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia*. N Engl J Med, 2008. **359**(24): p. 2619-20.
69. WHO, *World Malaria Report* [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_no\\_profiles.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_no_profiles.pdf?ua=1), 2012.
70. Gardner, M.J., et al., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
71. Agency, E.M., *First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA*. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2015/07/WC500190447.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2015/07/WC500190447.pdf), 2015.
72. Agnandji, S.T., et al., *A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants*. N Engl J Med, 2012. **367**(24): p. 2284-95.
73. Gosling, R. and L. von Seidlein, *The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan*. PLoS Med, 2016. **13**(4): p. e1001994.
74. Schwartz, L., et al., *A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table*. Malar J, 2012. **11**: p. 11.
75. Richards, J.S., et al., *Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to Plasmodium falciparum malaria for vaccine and biomarker development*. J Immunol, 2013. **191**(2): p. 795-809.
76. Artavanis-Tsakonas, K., et al., *Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5396-405.
77. Korbel, D.S., O.C. Finney, and E.M. Riley, *Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens*. Int J Parasitol, 2004. **34**(13-14): p. 1517-28.
78. Warimwe, G.M., et al., *Plasmodium falciparum var gene expression is modified by host immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21801-6.
79. Banachereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
80. Chua, C.L., et al., *Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?* Trends Parasitol, 2013. **29**(1): p. 26-34.
81. Peters, J.H., et al., *Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage?* Pathobiology, 1991. **59**(3): p. 122-6.
82. Rantakari, P., et al., *Stabilin-1 expression defines a subset of macrophages that mediate tissue homeostasis and prevent fibrosis in chronic liver injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016.
83. Wong, K.L., et al., *The three human monocyte subsets: implications for health and disease*. Immunol Res, 2012. **53**(1-3): p. 41-57.
84. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
85. Beranek, J.T., *CD68 is not a macrophage-specific antigen*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 342-3; author reply 343-4.

86. Artis, D. and H. Spits, *The biology of innate lymphoid cells*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 293-301.
87. Eberl, G., et al., *Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology*. Science, 2015. **348**(6237): p. aaa6566.
88. Das, R., D.B. Sant'Angelo, and K.E. Nichols, *Transcriptional control of invariant NKT cell development*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 195-215.
89. Bachy, E., et al., *CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans*. J Exp Med, 2016. **213**(5): p. 841-57.
90. Bendelac, A., *Mouse NK1+ T cells*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 367-74.
91. Bendelac, A., et al., *CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes*. Science, 1995. **268**(5212): p. 863-5.
92. Horowitz, A., et al., *Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6043-52.
93. Newman, K.C., et al., *Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria*. PLoS Pathog, 2006. **2**(12): p. e118.
94. Reeves, R.K., et al., *Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques*. Nat Immunol, 2015. **16**(9): p. 927-32.
95. Shimizu, K., et al., *KLRG+ invariant natural killer T cells are long-lived effectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(34): p. 12474-9.
96. Tsuda, H., et al., *Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes*. Am J Reprod Immunol, 2001. **45**(5): p. 295-302.
97. Ambrosino, E., et al., *Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5126-36.
98. Crespo, A.C., et al., *Cytotoxic potential of decidual NK cells and CD8+ T cells awakened by infections*. J Reprod Immunol, 2016.
99. Kopcow, H.D., et al., *Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15563-8.
100. Avril, T., et al., *Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5902-9.
101. Chumbley, G., et al., *Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells*. Cell Immunol, 1994. **155**(2): p. 312-22.
102. Loke, Y.W., A. King, and T.D. Burrows, *Decidua in human implantation*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 2**: p. 14-21.
103. Bulmer, J.N. and G.E. Lash, *The Role of Uterine NK Cells in Normal Reproduction and Reproductive Disorders*. Adv Exp Med Biol, 2015. **868**: p. 95-126.
104. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
105. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
106. Baron, V., et al., *The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 193-204.
107. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
108. Sallusto, F., et al., *Pillars article: two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature. 1999. **401**: 708-712. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 840-4.

109. Hintzen, R.Q., et al., *Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2426-35.
110. Baars, P.A., et al., *Heterogeneity of the circulating human CD4+ T cell population. Further evidence that the CD4+CD45RA-CD27- T cell subset contains specialized primed T cells*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 17-25.
111. Sakaguchi, S. and F. Powrie, *Emerging challenges in regulatory T cell function and biology*. Science, 2007. **317**(5838): p. 627-9.
112. Andersson, J., et al., *CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1975-81.
113. Zheng, S.G., et al., *Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5213-21.
114. Brustoski, K., et al., *Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental Plasmodium falciparum infection*. J Infect Dis, 2006. **193**(1): p. 146-54.
115. Minigo, G., et al., *Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000402.
116. Jangpatarapongsa, K., et al., *Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2008. **38**(10): p. 2697-705.
117. Walther, M., et al., *Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000364.
118. Scholzen, A., G. Minigo, and M. Plebanski, *Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection*. Trends Parasitol, 2010. **26**(1): p. 16-25.
119. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
120. Descatoire, M., et al., *Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 987-1000.
121. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
122. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
123. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
124. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(2): p. 99-109.
125. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
126. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
127. Beutler, B., et al., *Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 353-89.
128. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
129. Means, T.K., et al., *Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 407-17.



130. van Duin, D., R. Medzhitov, and A.C. Shaw, *Triggering TLR signaling in vaccination*. Trends Immunol, 2006. **27**(1): p. 49-55.
131. Ulevitch, R.J., *Therapeutics targeting the innate immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 512-20.
132. Hennessy, E.J., A.E. Parker, and L.A. O'Neill, *Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?* Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(4): p. 293-307.
133. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9577-82.
134. Jin, M.S. and J.O. Lee, *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 182-91.
135. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
136. Takeda, K., [*Toll-like receptor*]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2005. **28**(5): p. 309-17.
137. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
138. Klechevsky, E., et al., *Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines*. Hum Immunol, 2009. **70**(5): p. 281-8.
139. Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar, *Actively acquired tolerance of foreign cells*. Nature, 1953. **172**(4379): p. 603-6.
140. Medawar, P.D., *Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates*. Symposium of the Society for Experimental Biology, 1953: p. p.320–338.
141. Wegmann, T.G., et al., *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.
142. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1221**: p. 80-7.
143. Robinson, D.P. and S.L. Klein, *Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis*. Horm Behav, 2012. **62**(3): p. 263-71.
144. Kayentao, K., et al., *Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali*. J Infect Dis, 2005. **191**(1): p. 109-16.
145. Sirima, S.B., et al., *Failure of a chloroquine chemoprophylaxis program to adequately prevent malaria during pregnancy in Koupela District, Burkina Faso*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(11): p. 1374-82.
146. Kamali, A., et al., *Pregnancy, Labor, and Delivery after Ebola Virus Disease and Implications for Infection Control in Obstetric Services, United States*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(7).
147. Muehlenbachs, A., et al., *Ebola Virus Disease in Pregnancy: Clinical, Histopathologic, and Immunohistochemical Findings*. J Infect Dis, 2016.
148. Chaouat, G., et al., *Tolerance to the foetal allograft?* Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 624-36.
149. Saito, S., et al., *Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 601-10.
150. Ashkar, A.A. and B.A. Croy, *Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy*. Semin Immunol, 2001. **13**(4): p. 235-41.
151. Ng, S.C., et al., *Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2002. **48**(2): p. 77-86.

152. Zhang, Q. and B.C. Paria, *Importance of uterine cell death, renewal, and their hormonal regulation in hamsters that show progesterone-dependent implantation*. *Endocrinology*, 2006. **147**(5): p. 2215-27.
153. Bachy, V., D.J. Williams, and M.A. Ibrahim, *Altered dendritic cell function in normal pregnancy*. *J Reprod Immunol*, 2008. **78**(1): p. 11-21.
154. Prins, J.R., et al., *Preeclampsia is Associated with lower Percentages of Regulatory T Cells in Maternal Blood*. *Hypertension in Pregnancy*, 2009. **28**(3): p. 300-311.
155. Steinborn, A., et al., *Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia?* *Clin Immunol*, 2008. **129**(3): p. 401-12.
156. Hoeffel, G. and F. Ginhoux, *Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 486.
157. Dommergues, M., et al., *Hematopoiesis in the human yolk sac: quantitation of erythroid and granulopoietic progenitors between 3.5 and 8 weeks of development*. *Bone Marrow Transplant*, 1992. **9 Suppl 1**: p. 23-7.
158. Durandy, A., *Development of the immune system*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1997. **5**(2): p. 93-7.
159. Phillips, J.H., et al., *Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins*. *J Exp Med*, 1992. **175**(4): p. 1055-66.
160. Haynes, B.F., et al., *Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues*. *J Exp Med*, 1988. **168**(3): p. 1061-80.
161. Lobach, D.F., et al., *Human T cell antigen expression during the early stages of fetal thymic maturation*. *J Immunol*, 1985. **135**(3): p. 1752-9.
162. Chen, T., et al., *Development of hematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells*. *J Cell Biochem*, 2015. **116**(7): p. 1179-89.
163. Palmer, A.C., *Nutritionally mediated programming of the developing immune system*. *Adv Nutr*, 2011. **2**(5): p. 377-95.
164. Bonney, E.A. and P. Matzinger, *The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells*. *J Immunol*, 1997. **158**(1): p. 40-7.
165. Mold, J.E., et al., *Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero*. *Science*, 2008. **322**(5907): p. 1562-5.
166. Kristoffersen, E.K., *Human placental Fc gamma-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG*. *APMIS Suppl*, 1996. **64**: p. 5-36.
167. DeSesso, J.M., et al., *The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy*. *Crit Rev Toxicol*, 2012. **42**(3): p. 185-210.
168. Ben-Hur, H., et al., *Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2005. **16**(3): p. 401-407.
169. Billington, W.D., *The normal fetomaternal immune relationship*. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1992. **6**(3): p. 417-38.
170. Ridge, J.P., E.J. Fuchs, and P. Matzinger, *Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells*. *Science*, 1996. **271**(5256): p. 1723-6.
171. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(5): p. 379-90.
172. Fleer, A. and T.G. Krediet, *Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn*. *Neonatology*, 2007. **92**(3): p. 145-57.

173. Han, P., T. McDonald, and G. Hodge, *Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway*. Immunology, 2004. **113**(1): p. 26-34.
174. Hassan, J., et al., *Signalling via CD28 of human naive neonatal T lymphocytes*. Clin Exp Immunol, 1995. **102**(1): p. 192-8.
175. Nonoyama, S., et al., *Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 66-75.
176. Bofill, M., et al., *Differential expression of the cytokine receptors for human interleukin (IL)-12 and IL-18 on lymphocytes of both CD45RA and CD45RO phenotype from tonsils, cord and adult peripheral blood*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(3): p. 460-5.
177. Zola, H., et al., *Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes*. Pediatr Res, 1995. **38**(3): p. 397-403.
178. Barbey, C., et al., *Characterisation of the cytotoxic alloresponse of cord blood*. Bone Marrow Transplant, 1998. **22 Suppl 1**: p. S26-30.
179. Hermann, E., et al., *Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2153-8.
180. Yan, S.R., et al., *Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1223-9.
181. Wilson, P., D.E. Meyers, and P.J. Snow, *The detailed somatotopic organization of the dorsal horn in the lumbosacral enlargement of the cat spinal cord*. J Neurophysiol, 1986. **55**(3): p. 604-17.
182. Wilson, C.B., et al., *Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies*. J Clin Invest, 1986. **77**(3): p. 860-7.
183. Belderbos, M.E., et al., *Neonatal plasma polarizes TLR4-mediated cytokine responses towards low IL-12p70 and high IL-10 production via distinct factors*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33419.
184. Belderbos, M.E., et al., *Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life*. Clin Immunol, 2009. **133**(2): p. 228-37.
185. Black, A., et al., *Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 311-9.
186. Brustoski, K., et al., *IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1738-45.
187. Ribeiro-do-Couto, L.M., et al., *High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator?* Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3394-402.
188. Roth, I., et al., *Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 539-48.
189. Godfrey, W.R., et al., *Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function*. Blood, 2005. **105**(2): p. 750-8.
190. Burl, S., et al., *Age-dependent maturation of Toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18185.
191. Nguyen, M., et al., *Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10407.
192. Duffy, P.E., *Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia*. Parasitology, 2007. **134**(Pt 13): p. 1877-81.
193. Rogerson, S.J., et al., *Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(2): p. 105-17.

194. Rogerson, S.J., *Sequestration: causes and consequences*. Redox Rep, 2003. **8**(5): p. 295-9.
195. Maubert, B., et al., *Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent Plasmodium falciparum in pregnant women*. Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5367-71.
196. Staalsoe, T., et al., *Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia*. J Infect Dis, 2001. **184**(5): p. 618-26.
197. Brabin, B.J., et al., *The sick placenta-the role of malaria*. Placenta, 2004. **25**(5): p. 359-78.
198. Brabin, B.J., *An analysis of malaria in pregnancy in Africa*. Bull World Health Organ, 1983. **61**(6): p. 1005-16.
199. Hartman, T.K., S.J. Rogerson, and P.R. Fischer, *The impact of maternal malaria on newborns*. Ann Trop Paediatr, 2010. **30**(4): p. 271-82.
200. Steketee, R.W., et al., *The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **64**(1-2 Suppl): p. 28-35.
201. Steketee, R.W., et al., *The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(1 Suppl): p. 33-41.
202. Walther, B., et al., *Placental malaria is associated with reduced early life weight development of affected children independent of low birth weight*. Malar J, 2010. **9**: p. 16.
203. Menendez, C., P. Alonso, and B. Universitat de, *Guidelines and considerations for testing malaria vaccines in pregnant women*. Hum Vaccin, 2010. **6**(1): p. 21-6.
204. Breitling, L.P., et al., *Cord blood dendritic cell subsets in African newborns exposed to Plasmodium falciparum in utero*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5725-9.
205. Mackroth, M.S., et al., *Human cord blood CD4+CD25hi regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to Plasmodium falciparum antigens*. J Immunol, 2011. **186**(5): p. 2780-91.
206. Soulard, V., et al., *Placental malaria-associated suppression of parasite-specific immune response in neonates has no major impact on systemic CD4 T cell homeostasis*. Infect Immun, 2011. **79**(7): p. 2801-9.
207. Bettiol, E., et al., *Dual effect of Plasmodium-infected erythrocytes on dendritic cell maturation*. Malar J, 2010. **9**: p. 64.
208. Urban, B.C., et al., *Peripheral blood dendritic cells in children with acute Plasmodium falciparum malaria*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2859-61.
209. Urban, B.C., et al., *The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria*. Infect Immun, 2006. **74**(12): p. 6700-6.
210. Dechavanne, C., et al., *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): p. e0145464.
211. Okoko, B.J., et al., *Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural west African population*. J Health Popul Nutr, 2001. **19**(2): p. 59-65.
212. Okoko, B.J., et al., *Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian Mcgregor*. J Health Popul Nutr, 2002. **20**(1): p. 4-11.
213. Nosten, F., et al., *Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991. **85**(4): p. 424-9.
214. Mutabingwa, T.K., et al., *Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria*. PLoS Med, 2005. **2**(12): p. e407.

215. Baruch, D.I., et al., *Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes*. Cell, 1995. **82**(1): p. 77-87.
216. Smith, J.D., et al., *Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes*. Cell, 1995. **82**(1): p. 101-10.
217. Kimbi, H.K., D. Nformi, and K.J. Ndamukong, *Prevalence of asymptomatic malaria among school children in an urban and rural area in the Mount Cameroon region*. Cent Afr J Med, 2005. **51**(1-2): p. 5-10.
218. Smith, J.D., et al., *Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **110**(2): p. 293-310.
219. Ndam, N.G.T., et al., *Dynamics of Anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women*. Journal of Infectious Diseases, 2006. **193**(5): p. 713-720.
220. Duffy, M.F., et al., *Transcribed var genes associated with placental malaria in Malawian women*. Infect Immun, 2006. **74**(8): p. 4875-83.
221. Kraemer, S.M. and J.D. Smith, *Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the Plasmodium falciparum var gene family*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1527-38.
222. Trimnell, A.R., et al., *Global genetic diversity and evolution of var genes associated with placental and severe childhood malaria*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **148**(2): p. 169-80.
223. Viebig, N.K., et al., *A single member of the Plasmodium falciparum var multigene family determines cytoadhesion to the placental receptor chondroitin sulphate A*. EMBO Rep, 2005. **6**(8): p. 775-81.
224. Fried, M. and P.E. Duffy, *Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria*. Vaccine, 2015. **33**(52): p. 7483-8.
225. Crompton, P.D., S.K. Pierce, and L.H. Miller, *Advances and challenges in malaria vaccine development*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4168-78.
226. Ampomah, P., et al., *B-cell responses to pregnancy-restricted and -unrestricted Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 antigens in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites*. Infect Immun, 2014. **82**(5): p. 1860-71.
227. Illingworth, J., et al., *Chronic exposure to Plasmodium falciparum is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion*. J Immunol, 2013. **190**(3): p. 1038-47.
228. Muellenbeck, M.F., et al., *Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies*. J Exp Med, 2013. **210**(2): p. 389-99.
229. Weiss, G.E., et al., *Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2176-82.
230. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1471-6.
231. Asito, A.S., et al., *Suppression of circulating IgD+CD27+ memory B cells in infants living in a malaria-endemic region of Kenya*. Malar J, 2011. **10**: p. 362.
232. Moir, S., et al., *Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1797-805.
233. Blackburn, S.D., et al., *Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 29-37.
234. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.

235. Ehrhardt, G.R., et al., *Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells.* J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 783-91.
236. Weiss, G.E., et al., *A positive correlation between atypical memory B cells and Plasmodium falciparum transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali.* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15983.
237. Ndungu, F.M., et al., *Functional memory B cells and long-lived plasma cells are generated after a single Plasmodium chabaudi infection in mice.* PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000690.
238. Ampomah, P., et al., *Kinetics of B cell responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites.* J Immunol, 2014. **192**(11): p. 5236-44.
239. Ndam, N.T., et al., *Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor Outcomes during Pregnancy, Benin.* Emerg Infect Dis, 2015. **21**(5): p. 813-23.
240. Gamain, B., et al., *Identification of multiple chondroitin sulfate A (CSA)-binding domains in the var2CSA gene transcribed in CSA-binding parasites.* J Infect Dis, 2005. **191**(6): p. 1010-3.
241. Avril, M., et al., *Characterization of anti-var2CSA-PfEMP1 cytoadhesion inhibitory mouse monoclonal antibodies.* Microbes Infect, 2006. **8**(14-15): p. 2863-71.
242. Dahlback, M., et al., *Epitope mapping and topographic analysis of VAR2CSA DBL3X involved in P. falciparum placental sequestration.* PLoS Pathog, 2006. **2**(11): p. e124.
243. Singh, K., et al., *Structure of the DBL3x domain of pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA complexed with chondroitin sulfate A.* Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(9): p. 932-8.
244. Higgins, M.K., *Overproduction, purification and crystallization of a chondroitin sulfate A-binding DBL domain from a Plasmodium falciparum var2csa-encoded PfEMP1 protein.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2008. **64**(Pt 3): p. 221-3.
245. Resende, M., et al., *Chondroitin sulphate A (CSA)-binding of single recombinant Duffy-binding-like domains is not restricted to Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 expressed by CSA-binding parasites.* Int J Parasitol, 2009. **39**(11): p. 1195-204.
246. Khunrae, P., et al., *Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies.* J Mol Biol, 2010. **397**(3): p. 826-34.
247. Srivastava, A., et al., *Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 4884-9.
248. Avril, M., et al., *Antibodies to a full-length VAR2CSA immunogen are broadly strain-transcendent but do not cross-inhibit different placental-type parasite isolates.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16622.
249. Doritchamou, J., et al., *Differential adhesion-inhibitory patterns of antibodies raised against two major variants of the NTS-DBL2X region of VAR2CSA.* Vaccine, 2013. **31**(41): p. 4516-22.
250. Clausen, T.M., et al., *Structural and functional insight into how the Plasmodium falciparum VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria.* J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23332-45.
251. Avril, M., et al., *A restricted subset of var genes mediates adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to brain endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. E1782-90.

252. Gangnard, S., et al., *Functional and immunological characterization of the var2CSA-DBL5epsilon domain of a placental Plasmodium falciparum isolate*. Mol Biochem Parasitol, 2010. **173**(2): p. 115-22.
253. Gnidehou, S., et al., *Insight into antigenic diversity of VAR2CSA-DBL5epsilon domain from multiple Plasmodium falciparum placental isolates*. PLoS One, 2010. **5**(10).
254. Oleinikov, A.V., et al., *Effects of sex, parity, and sequence variation on seroreactivity to candidate pregnancy malaria vaccine antigens*. J Infect Dis, 2007. **196**(1): p. 155-64.
255. Babakhanyan, A., et al., *The antibody response of pregnant Cameroonian women to VAR2CSA ID1-ID2a, a small recombinant protein containing the CSA-binding site*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88173.
256. Brodin, K.J., et al., *Differential recognition of P. falciparum VAR2CSA domains by naturally acquired antibodies in pregnant women from a malaria endemic area*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9230.
257. Koura, K.G., et al., *Maternal anaemia at delivery and haemoglobin evolution in children during their first 18 months of life using latent class analysis*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50136.
258. Accrombessi, M., et al., *Malaria in Pregnancy Is a Predictor of Infant Haemoglobin Concentrations during the First Year of Life in Benin, West Africa*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129510.
259. Koura, G.K., et al., *Anaemia during pregnancy: impact on birth outcome and infant haemoglobin level during the first 18 months of life*. Trop Med Int Health, 2012. **17**(3): p. 283-91.
260. Schwarz, N.G., et al., *Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(8): p. 1017-25.
261. Sadissou, I., et al., *High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy*. Malar J, 2014. **13**: p. 312.
262. Borgella, S., et al., *Impact of pregnancy-associated malaria on infant malaria infection in southern Benin*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80624.
263. Briand, V., et al., *Intermittent treatment for the prevention of malaria during pregnancy in Benin: a randomized, open-label equivalence trial comparing sulfadoxine-pyrimethamine with mefloquine*. J Infect Dis, 2009. **200**(6): p. 991-1001.
264. Briand, V., et al., *Mefloquine Versus Sulfadoxine-Pyrimethamine for Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy: A Joint Analysis on Efficacy and Tolerability*. Am J Trop Med Hyg, 2015. **93**(2): p. 300-4.
265. Gonzalez, R., et al., *Mefloquine safety and tolerability in pregnancy: a systematic literature review*. Malar J, 2014. **13**(1): p. 75.
266. Beeson, J.G., et al., *Plasmodium falciparum isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 464-72.
267. Feuerer, M., et al., *Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes*. Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 689-95.
268. Belkaid, Y. and K. Tarbell, *Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*)*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 551-89.
269. Jung, K., S.K. Seo, and I. Choi, *Endogenous VSIG4 negatively regulates the helper T cell-mediated antibody response*. Immunol Lett, 2015. **165**(2): p. 78-83.
270. Kuijpers, T.W., et al., *CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 214-22.
271. Bardaji, A., et al., *Clinical malaria in African pregnant women*. Malar J, 2008. **7**: p. 27.

272. Didierlaurent, A.M., et al., *AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity*. *J Immunol*, 2009. **183**(10): p. 6186-97.
273. Boland, G., et al., *Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04*. *Vaccine*, 2004. **23**(3): p. 316-20.
274. Gursel, M. and I. Gursel, *Development of CpG ODN Based Vaccine Adjuvant Formulations*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1404**: p. 289-98.
275. Nicholls, E.F., L. Madera, and R.E. Hancock, *Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1213**: p. 46-61.
276. Philbin, V.J. and O. Levy, *Developmental biology of the innate immune response: implications for neonatal and infant vaccine development*. *Pediatr Res*, 2009. **65**(5 Pt 2): p. 98R-105R.
277. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 971-4.
278. Huang, X. and Y. Yang, *Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses*. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(8): p. 787-96.
279. Levy, O., et al., *Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells*. *Blood*, 2006. **108**(4): p. 1284-90.
280. Levy, O., et al., *Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848*. *J Immunol*, 2004. **173**(7): p. 4627-34.
281. Fujimaki, W., et al., *Comparative study of regulatory T cell function of human CD25CD4 T cells from thymocytes, cord blood, and adult peripheral blood*. *Clin Dev Immunol*, 2008. **2008**: p. 305859.
282. Tang, J., et al., *[Expression of Foxp3 in CD4+CD25high Treg cells of neonatal cord blood]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2008. **24**(4): p. 365-7.
283. Comans-Bitter, W.M., et al., *Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations*. *J Pediatr*, 1997. **130**(3): p. 388-93.
284. Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi, *Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells*. *Adv Immunol*, 2003. **81**: p. 331-71.
285. Sundstrom, Y., et al., *The expression of human natural killer cell receptors in early life*. *Scand J Immunol*, 2007. **66**(2-3): p. 335-44.
286. Shahabuddin, S., et al., *Age-related changes in blood lymphocyte subsets of Saudi Arabian healthy children*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998. **5**(5): p. 632-5.
287. Grindebacke, H., et al., *Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells*. *J Immunol*, 2009. **183**(7): p. 4360-70.
288. Fuchizawa, T., et al., *Developmental changes of FOXP3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations*. *Clin Immunol*, 2007. **125**(3): p. 237-46.
289. Hrdy, J., I. Kocourkova, and L. Prokesova, *Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers*. *Clin Exp Immunol*, 2012. **170**(1): p. 10-7.
290. Robinson, L.J., et al., *Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical Plasmodium falciparum malaria in children from Papua New Guinea*. *Infect Immun*, 2009. **77**(7): p. 3033-43.
291. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls*. *Infect Immun*, 2004. **72**(10): p. 5630-7.



292. Hugosson, E., et al., *Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of Plasmodium falciparum parasites*. Parasite Immunol, 2004. **26**(3): p. 111-7.
293. Mold, J.E. and J.M. McCune, *Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man*. Adv Immunol, 2012. **115**: p. 73-111.
294. Flanagan, K.L., et al., *The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth*. Eur J Immunol, 2010. **40**(4): p. 1062-72.
295. Hara, Y., et al., *Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 937-48.
296. Sorensen, L.N., et al., *TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8604-12.
297. Varani, S., et al., *Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7767-76.
298. Labeaud, A.D., et al., *Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination?* PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(5): p. e442.
299. Cortey, A. and J. Patkai, *[Neonatal neurological impact of inflammation in the fetus]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2001. **30**(1 Suppl): p. 27-35.
300. Elovitz, M.A., et al., *Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury*. Int J Dev Neurosci, 2011. **29**(6): p. 663-71.
301. Avril, M., et al., *Immunization with VAR2CSA-DBL5 recombinant protein elicits broadly cross-reactive antibodies to placental Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Infect Immun, 2010. **78**(5): p. 2248-56.
302. Ibitokou, S., et al., *Gestational age-related changes in the peripheral blood cell composition of sub-Saharan African women*. J Reprod Immunol, 2013. **98**(1-2): p. 21-8.
303. Ibitokou, S.A., et al., *Submicroscopic infections with Plasmodium falciparum during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles*. Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(6): p. 859-66.
304. Supali, T., et al., *Polyparasitism and its impact on the immune system*. Int J Parasitol, 2010. **40**(10): p. 1171-6.
305. Tissieres, P., et al., *Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon-gamma*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32863.
306. Sadeghi, K., et al., *Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling*. J Infect Dis, 2007. **195**(2): p. 296-302.
307. Forster-Waldl, E., et al., *Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging*. Pediatr Res, 2005. **58**(1): p. 121-4.