



HAL
open science

Impact du trait drépanocytaire de l'hémoglobine sur la fixation par les anticorps des hématies infectées du *Plasmodium falciparum* dans le paludisme gestationnel.

Benoît Gendrot, Julia Doria, Étienne Reboul, Morgane Chaigneau, Emmanuel Curis, Dorota Desaulle, Isabelle Kousignian, Anaïs Merckx

► To cite this version:

Benoît Gendrot, Julia Doria, Étienne Reboul, Morgane Chaigneau, Emmanuel Curis, et al.. Impact du trait drépanocytaire de l'hémoglobine sur la fixation par les anticorps des hématies infectées du *Plasmodium falciparum* dans le paludisme gestationnel.. *Acta discipulorum academiae medicamentariae artis*, 2020, 3, pp.1-8. hal-04347766

HAL Id: hal-04347766

<https://u-paris.hal.science/hal-04347766v1>

Submitted on 15 Dec 2023

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.

Impact du trait drépanocytaire de l'hémoglobine sur la fixation par les anticorps des hématies infectées du *Plasmodium falciparum* dans le paludisme gestationnel.

Étudiants : Benoît GENDROT, Julia DORIA, Étienne REBOUL, Morgane CHAIGNEAU
Enseignants : Emmanuel CURIS, Dorota DESAULLE, Isabelle KOUSIGNIAN, Anaïs MERCKX

Résumé

Le paludisme gestationnel favorise la séquestration des hématies infectées par *Plasmodium falciparum* dans le placenta de la femme enceinte, entraînant la perturbation des échanges fœto-maternels ainsi que de graves complications pour le fœtus. Cette affection est particulièrement présente en Afrique subsaharienne, où le vecteur Anophèle sévit principalement, malgré la protection immunitaire que pourraient avoir acquise les femmes au contact constant du parasite. D'autre part, il est largement admis que le portage d'un trait drépanocytaire est un facteur protecteur du paludisme et les hétérozygotes pour le gène de l'hémoglobine qui ont un allèle HbS (drépanocytaire) et HbA (normal) sont ainsi nombreux en Afrique subsaharienne grâce à la sélection positive de ce trait. Or les études sur le paludisme gestationnel concernent jusqu'alors très peu les porteuses hétérozygotes, à cause notamment de difficultés pratiques dans leur mise en œuvre. Ce manque d'étude est problématique car, dans le développement d'un possible vaccin, la connaissance de la réponse aux anticorps selon le génotype est primordiale.

Le projet a donc été de déterminer si le portage hétérozygote de l'hémoglobine S chez des femmes enceintes béninoises, infectées ou non, influençait le lien entre les anticorps et les hématies de génotypes différents infectées par *P. falciparum*. Cette reconnaissance a été mesurée par fluorescence et les hématies, fournies par l'établissement français du sang (EFS), infectées par le parasite, présentaient le ligand VAR2CSA caractéristique du paludisme gestationnel.

Nous avons montré, dans le paludisme gestationnel, que la réponse des anticorps anti VAR2CSA est plus importante pour les hématies infectées par le *P. falciparum* chez les sujets présentant un trait drépanocytaire.

Mots clés : Paludisme gestationnel, ligand VAR2CSA, Chondroïtine Sulfate, Drépanocytose

Introduction

L'infection par le paludisme pendant la grossesse, ou paludisme gestationnel, est un enjeu de santé publique important (16 % des enfants nés de femmes en contact avec le virus sont nés avec un faible poids selon une étude de l'O. M. S. chez 11 millions de femmes [1]), notamment dans les régions d'endémie palustre.

Le paludisme à P. falciparum

Le paludisme à *P. falciparum* est causé par le parasite *P. falciparum* du genre *Plasmodium* transmis par une piqûre infectante du vecteur moustique Anophèle. Le parasite se multiplie alors dans le foie et rejoint la circulation sanguine pour envahir les hématies circulantes [2]. Dans les globules rouges infectés (GRi), *P. falciparum* produit des protéines nécessaires à sa survie et à son expansion dans l'organisme infecté. Il va alors modifier la surface des hématies en y incorporant des protéines de la famille PfEMP1 (*P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*), qui sont principalement responsables de l'adhésion aux cellules endothéliales via leurs protéoglycanes.

La ségrégation des globules rouges infectés est le mécanisme de survie parasitaire qui protège les hématies parasitées extrêmement déformables de la filtration par la rate. En effet, dans cet organe, il existe

un mécanisme de ségrégation ou filtration des globules rouges modifiés, rigides, vieux ou abîmés.

Au niveau de divers organes, la schizogonie peut causer des complications différentes selon l'organe touché. Par exemple dans le paludisme à *P. falciparum* dit « simple », les symptômes peuvent être des accès fébriles tierces ou des troubles digestifs avec douleurs abdominales et diarrhées. L'accès grave ou pernicieux se traduit par des troubles de la micro-circulation au niveau du cerveau, des poumons ainsi que des reins, et se caractérise par des complications neurologiques, une détresse respiratoire associée à une perte de conscience ainsi qu'une splénomégalie. C'est une grande cause de mortalité [1].

La présence de parasites implique une réaction immunitaire qui n'empêche pas toujours une nouvelle contamination mais qui permet d'éviter, dans certains cas, les formes cliniques graves. L'immunité ne dure que quelques mois en l'absence de contact avec le parasite et il est possible de développer la pathologie malgré cette immunité qui est transmissible de la mère à son enfant pour ses premiers mois de vie, mais n'est jamais définitive ni totale.

Le paludisme gestationnel : clinique

Pour les femmes enceintes en zone endémique, le risque de contracter le paludisme au cours de la grossesse est élevé. Ce paludisme gestationnel est un

enjeu de santé publique important car il est associé à des risques graves pour la mère et le fœtus. Notamment, il est associé à un faible poids de naissance pour le nouveau-né, facteur de mortalité infantile, mais il peut aussi induire une anémie maternelle, ainsi que le développement d'un paludisme compliqué, d'un avortement spontané, d'une mortinaissance ou d'une prématurité [1]. Les symptômes et les complications varient selon le niveau d'immunité naturellement acquise par la mère. Cette immunité acquise se renforce progressivement avec le nombre de grossesses en situation d'exposition continue ce qui rend le paludisme gestationnel généralement asymptomatique dans ces zones de forte transmission [3], [4].

La ségrégation des globules rouges infectés au niveau du placenta serait la cause des symptômes du paludisme gestationnel à *P. falciparum* [1]. C'est pour cela que la suppression de cette accumulation serait une voie thérapeutique possible.

Génétiquement, la famille de gènes VAR code notamment la protéine PfEMP1 qui est un antigène variant de surface au niveau de la membrane du globule rouge infecté. Ces gènes sont exprimés par le *P. falciparum* lorsqu'il infecte une hématie et la protéine produite est exportée à la surface de cette cellule hôte [5]. Les gènes VAR sont classés en cinq groupes (A à E) selon leur pathogénicité. Seul le membre du groupe E (VAR2CSA) est surexprimé à la surface des globules rouges infectés dans le paludisme gestationnel contrairement au paludisme simple. Dans les deux cas, d'autres groupes sont exprimés en plus du groupe E.

Ce ligand VAR2CSA est une protéine transmembranaire qui reconnaît les protéoglycanes à chondroïtine sulfate (CSA), exprimés par les cellules endothéliales qui tapissent le placenta [6].

Le ligand VAR2CSA est donc le variant le plus étudié de la famille PfEMP1 dans le paludisme gestationnel car c'est celui qui a été identifié comme le principal médiateur de l'adhérence du parasite au placenta [7] grâce à son interaction avec la chondroïtine sulfate (figure 1).

Chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate (CS) appartient à la famille des glycosaminoglycanes (GAG). Dans les nombreux organes où ils sont présents, ils sont essentiellement responsables de la structure de la matrice extracellulaire et sont impliqués dans le mécanisme d'adhérence de la cellule à la matrice. Ils peuvent agir comme récepteurs pour des invasions cellulaires et tissulaires par différents micro-organismes pathogènes causant une infection [8]. Dans le placenta, la chondroïtine sulfate exprimée est principalement la chondroïtine sulfate A (CSA), qui est aussi présente au niveau d'autres organes (derme, cartilage, cornée). Sa particularité est un motif de 12 sucres qui permet de faire le pont entre VAR2CSA du globule rouge infecté (spécifique au CSA) et le

placenta [9]. Ce motif est donc important car il induit la séquestration par adhérence des globules rouges infectés dans l'espace intervillositaire du syncytiotrophoblaste [10].

L'infection durant la grossesse de *P. falciparum* modifie donc la densité parasitaire qui devient plus élevée dans le placenta que dans le sang périphérique. Cette séquestration des hématies infectées dans le placenta entraîne son inflammation qui va perturber les échanges fœto-maternels, provoquant une diminution du transfert d'anticorps, ce qui porte atteinte au transfert de l'immunité maternelle [10]. De plus, la spécificité de l'interaction au niveau du placenta fait que le VAR2CSA est un facteur de pathogénicité spécifique chez la femme enceinte.

De nombreuses recherches sont en cours dans l'espoir de trouver un vaccin contre cette pathologie particulière en utilisant les anticorps anti-VAR2CSA [11].

Le paludisme gestationnel : physiopathologie

Le paludisme gestationnel est observé chez les femmes enceintes en zone d'endémie. Il a un temps été attribué à l'immunodépression liée à la grossesse [12]. Effectivement la grossesse rend plus vulnérable les femmes enceintes mais ce n'est plus l'hypothèse privilégiée : il a été démontré que la gravité des symptômes de cette pathologie diminuait avec l'accroissement du nombre de grossesses. Il a été montré que le variant parasite exprimant VAR2CSA se multipliait principalement dans le placenta et ainsi toute primipare y serait naïve [3]. Les femmes enceintes infectées par *P. falciparum* développent donc des anticorps spécifiques contre le variant VAR2CSA, ainsi qu'une défense immunitaire. Ces anticorps spécifiques sont associés à la protection contre le paludisme lors de grossesses ultérieures. Le niveau d'anticorps produits

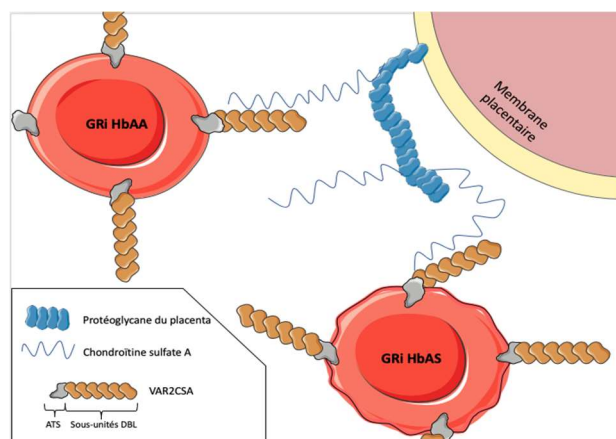


Figure 1. Représentation de la reconnaissance par les protéines PfEMP1 VAR2CSA exprimées en surface des globules rouges infectés — HbAA ou HbAS — de la chondroïtine sulfate A des protéoglycanes de la membrane placentaire, qui précède l'agglutination des GRi autour du placenta

diminuerait après le premier accouchement, mais l'immunité spécifique contre VAR2CSA serait renouvelée rapidement lors d'une nouvelle exposition au parasite. Ce serait pourquoi les anticorps des femmes multigestes ont une réponse plus élevée que les primigestes [10].

Cette expérience s'est concentrée non pas sur la gestité mais sur le génotype pour mettre en évidence la relation entre le paludisme gestationnel et une maladie atteignant les globules rouges : la drépanocytose. C'est une maladie autosomique récessive causée par une mutation du gène codant l'hémoglobine, très répandue en Afrique [13]. Une double mutation code une hémoglobine notée HbS (en comparaison avec l'hémoglobine normale adulte HbA), causant une déformation des globules rouges, qui lorsque l'individu est homozygote est responsable de la drépanocytose : la forme biconcave et déformable des hématies devient falciforme et plus rigide [14]. Or, il a été démontré que la prévalence de la drépanocytose est corrélée à celle du paludisme car les porteurs du trait drépanocytaire (hétérozygotes pour l'hémoglobine mutée, soit HbAS) développent moins de formes graves. Cette relation entre drépanocytose et paludisme est un exemple de sélection positive [15, 16].

Présentation du sujet

Dans les régions d'endémie palustre, il y a donc de nombreux porteurs du trait drépanocytaire. Or les études sur le paludisme gestationnel ont jusqu'alors très peu porté sur ces porteuses hétérozygotes, à cause notamment de difficultés pratiques dans leurs mises en œuvre. En effet, les hématies HbAA sont couramment mises à disposition par l'Établissement français du sang (EFS), contrairement aux hématies HbAS qui nécessitent de trouver des patients drépanocytaires pour prélever les hématies de leur famille en respectant leur consentement libre et éclairé.

L'objectif de l'étude a donc été de déterminer si le portage hétérozygote de l'hémoglobine S chez des femmes enceintes béninoises, infectées ou non, influe sur la reconnaissance des globules rouges infectés par *P. falciparum* par les anticorps anti VAR2CSA présents dans le plasma. Pour cela différentes variables ont été étudiées telles que les génotypes des hématies infectées et des femmes produisant les anticorps, l'infection de la femme à *P. falciparum* en fin de grossesse et enfin la gestité de ces femmes.

Matériel et méthode

Le protocole expérimental a été décrit pour la première fois par Chauvet *et coll.* en 2019 [17].

Participant à l'étude

L'étude *Strategies to prevent pregnancy-associated malaria* (STOPPAM) a été menée au Bénin entre 2008 et 2011. Elle a recruté 1037 femmes enceintes en début de

grossesse pour une observation mensuelle jusqu'à la l'accouchement [18], parmi lesquelles 161 femmes d'une sous-cohorte ont été prélevées de leur plasma à l'accouchement, constituant l'échantillon de l'étude. Cet échantillon est réparti en 34 femmes primigestes (dont c'est la première grossesse), 25 secondigestes et 100 multigestes. Parmi ces 159 femmes, 26 mères sont infectées et 133 mères ne sont pas infectées par *P. falciparum* à l'issue de leur grossesse. 15,8 % des femmes de cet échantillon sont porteuses du génotype HbAS. Finalement, 52 femmes présentent une hémoglobine HbAS (comportant le trait drépanocytaire) et 107 avaient des érythrocytes « normaux », HbAA.

Toutes les procédures ont été réalisées conformément à la recherche sur des échantillons humains, le consentement éclairé écrit a été obtenu pour toutes les participantes. Le comité consultatif de déontologie et d'éthique de l'institut de recherche pour le développement (IRD, Marseille, France) et le comité d'éthique de la faculté des sciences de la santé (université Abomey Calavi, Bénin) ont approuvé cette étude.

Hématies infectées testées

L'EFS a fourni les hématies HbAA et HbAS, après un consentement éclairé écrit des donateurs volontaires (genre indifférent). Les globules rouges ont été séparés du plasma et des leucocytes par centrifugation et conservés à 4 °C avant l'utilisation. Toutes les hématies HbAA et HbAS proviennent de donateurs du groupe sanguin O pour éviter toute réaction immunitaire.

La souche FCR3 de *P. falciparum* exprimant le phénotype d'adhésion VAR2CSA [17] a été cultivée *in vitro* dans les hématies HbAA et HbAS des donateurs (méthode adaptée de Trager et Jensen) [19].

Les globules rouges infectés HbAA ont été cultivés dans un milieu liquide RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France) 1640. Les cultures ont été maintenues à 5 % d'hématocrite dans un mélange gazeux 5 % d'O₂, 5,5 % de CO₂ et 89,5 % de N₂, incubées à 37 °C. Cette technique est utilisée pour éviter toute contamination par une RNase externe.

Les hématies HbAA ont été infectées par le trophozoïte tardif et le schizonte, puis les hématies HbAS ont été infectées par *P. falciparum*, par coculture d'hématies d'HbAA parasitées par des trophozoïtes tardifs et schizontes, obtenues après sélection des cellules par magnétisme (*magnetic-activated cell sorting* [MACS], Miltenyi Biotec, Paris, France). Après tri, les hématies infectées HbAS et HbAA (contrôles) ont été cultivées dans le même milieu que précédemment.

Cytométrie en flux

La liaison des protéines de surface des globules rouges infectés par les anticorps des plasmas des

femmes testés a été mesurée par cytométrie en flux à fluorescence (adaptée de Tuikue Ndam et coll) [20]. Les globules rouges infectés ont été remis en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS Gibco), avec 1 % d'albumine ainsi que du sérum bovin (BSA) (Roche Diagnostics, Meylan, France), et ont été distribués dans des tubes positionnés sur des plaques de 96 puits à environ 500 000 hématie par puits. Après centrifugation des tubes à 300 g pendant 2 minutes à température ambiante, les globules rouges ont été remis en suspension dans du plasma prélevé chez l'une des femmes enceintes à son accouchement contenant du PBS-1 % BSA (dilué à 1 pour 50) et centrifugés à nouveau. Après une heure d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS-1 % BSA afin d'éliminer les anticorps du plasma de femme enceinte qui ne seraient pas fixés aux globules rouges infectés.

Ensuite, un anticorps anti-immunoglobuline humaine conjugué à de la phycoérythrine (fluorochrome, Jackson ImmunoResearch, Montluçon, France ; dilution à 1 pour 100 dans du PBS-1 % BSA) a été ajouté avant centrifugation afin de quantifier les anticorps humains en solution (provenant donc du plasma prélevé), jouant le rôle d'anticorps secondaires.

Après une heure d'incubation à température ambiante et 3 lavages avec du PBS-1 % BSA, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS-2 % paraformaldéhyde et maintenues dans l'obscurité à 4 °C pendant la nuit.

Le lendemain, les GRi quantifiés par cytométrie en flux ont été lavés 2 fois avec du PBS-1% BSA et remis en suspension avec du TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific ; dilution 1:10000 dans du PBS) juste avant l'acquisition et l'analyse par cytométrie de flux (FACS Canto II BD). Le TO-PRO-3 est une contre-coloration nucléaire et chromosomique à fluorescence rouge imperméable aux cellules vivantes, mais qui pénètre les membranes compromises caractéristiques des cellules mortes, ce qui en fait un indicateur utile des cellules mortes au sein d'une population. C'est un marqueur indispensable dans les études de cytométries en flux qui permet de définir les groupes de cellules étudiées : la fluorescence est rapportée au nombre de cellules vivantes, il faut donc enlever les cellules mortes de l'analyse, ce qui est fait grâce au TPO.

À l'aide du logiciel FlowJo, les valeurs de la fluorescence ont été utilisées pour caractériser les données de l'analyse par cytométrie de flux et de quantifier la liaison des anticorps à la surface des globules rouges infectés. Afin de normaliser les données entre les différentes plaques, à chaque valeur a été soustraite celle d'une valeur seuil provenant d'un ensemble de plasmas de femmes enceintes européennes qui n'ont jamais été en contact avec le parasite.

Analyses statistiques

Les variables qualitatives décrites ci-après ont été résumées sous forme d'effectif et de pourcentage.

Nous avons utilisé la moyenne, le minimum, le premier quartile, la médiane, le troisième quartile et le maximum pour décrire la variable quantitative de la fluorescence. Les écarts-types sont aussi présentés.

La variable d'intérêt de l'étude (variable expliquée, Y) permettant de quantifier la fixation des anticorps est le logarithme népérien de la mesure de la fluorescence. Les variables explicatives pour cette variable étaient le génotype des globules rouges testés (qualitatif : HbAA ou HbAS), le génotype de la femme dont est issu le plasma (qualitatif : HbAA ou HbAS), l'infection de la femme à *P. falciparum* à la fin de sa grossesse (qualitatif : oui ou non) et enfin la gestité (variable qualitative ordinaire : primigeste, secondigeste et multigeste). L'objectif de l'analyse statistique a été de trouver un modèle expliquant le logarithme de la fluorescence en fonction de ces différentes variables. Les paramètres du modèle ont été présentés avec leur intervalle de confiance à 95 %. Les degrés de signification (notés « valeur *p* ») des paramètres du modèle ont été obtenus à l'aide d'une analyse de la variance (ANVA).

Un modèle de régression linéaire multivariée à effet mixte a été choisi pour modéliser la fluorescence : c'est un modèle de régression linéaire incluant des effets fixes et des effets aléatoires. Cette partie aléatoire est sous forme d'une ordonnée à l'origine aléatoire pour chaque femme, afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle de fixation — car deux mesures de fluorescence sont faites sur le plasma de chaque femme et sont donc dépendantes : l'une avec des globules rouges HbAA et l'autre avec des HbAS. De plus, un terme d'interaction entre le type d'hématie et celui du plasma issus d'individus de mêmes génotypes ou de génotypes différents était également étudié. En effet, une supposition était que les anticorps du plasma des femmes HbAS se fixeraient différemment sur les globules rouges infectés HbAS et sur les HbAA, et l'équivalent pour les femmes HbAA. L'interaction entre le génotype maternel et celui des globules rouges a donc été ajoutée dans le modèle.

Finalement, le modèle linéaire à effet mixte pour l'explication du logarithme de la fluorescence comprenait l'ajout d'une constante aléatoire sur l'identité des femmes afin de saisir l'effet femme (doubles mesures) et d'un terme d'interaction entre les génotypes (ceux de GRi testées et de la femme) en plus de variables explicatives suivantes : le génotype des GRi testés, le génotype de la femme dont est issu le plasma, l'infection de la femme à *P. falciparum* en fin de grossesse et enfin la gestité :

$$Y_{ij} = \alpha_0 + A_i + \beta_2 B_{2:ij} + \beta_3 B_{3:i} + \beta_4 B_{4:i} + \beta_5 B_{5:i} + \beta_{52} (B_{5:i})^2 + \beta_6 B_{6:ij} + \varepsilon_{ij}$$

avec Y_{ij} le logarithme de la fluorescence mesurée par cytométrie en flux mesuré pour la femme i , avec des hématies de type j ; α_0 la valeur moyenne de Y pour un plasma de femmes primigestes HbAA non infectées en fin de grossesse mis au contact d'hématies HbAA; A_i , la différence entre la valeur moyenne de Y pour la femme i et α_0 (variabilité inter-individuelle; A_i est une variable aléatoire centrée, supposée gaussienne et de variance μ^2); $B_{2:ij}$ une variable valant 1 si les hématies infectées utilisées sont HbAS et 0 sinon; $B_{3:i}$, une variable valant 1 si la femme i est HbAS, 0 sinon; $B_{4:i}$, une variable valant 1 si la femme i est infectée en fin de grossesse, 0 sinon; $B_{5:i}$, la gestité de la femme (variable qualitative ordinaire avec une composante linéaire et une composante quadratique); $B_{6:ij}$, une variable valant 1 si le plasma de la femme et les hématies infectées ont des génotypes distincts, 0 sinon (cette variable permet l'étude d'un éventuel effet synergétique sur la fixation des anticorps du plasma d'une femme sur des globules rouges infectés qui proviennent d'un donneur ayant le même génotype d'érythrocyte) et ε_{ij} l'erreur, aléatoire, sur la fluorescence, supposée gaussienne et de variance σ^2 . Les coefficients β_2 à β_6 et β_{52} sont les paramètres à estimer; ils sont non nuls si les variables associées influent sur la fluorescence.

La validité du modèle a été étudiée [23]: le modèle linéaire à effets mixtes possède les mêmes hypothèses que le modèle linéaire classique, c'est-à-dire la linéarité du modèle, la normalité des résidus, l'homoscédasticité et l'absence de corrélation. La linéarité du modèle est ici acquise car toutes les variables explicatives sont qualitatives. Les résidus de ce modèle ont été étudiés et leur normalité a été vérifiée (test de Shapiro sur les résidus: $p = 0,3088$). De plus, il n'y a pas de corrélation entre les erreurs (test de Durbin et Watson, bibliothèque `lmtest`: $DW = 1,743$; fonction `splom`). L'influence des valeurs individuelles sur le modèle a été évaluée par l'étude des distances de Cook. De plus, les résidus « studentisés » sont compris entre -2 et 2 et sont répartis de façon symétrique.

Génotype		Min — Max	$m \pm s$	$m_e [q_1; q_3]$
HbAA	Valeurs brutes	0,04 ; 3,24	$0,63 \pm 0,70$	0,29 [0,11 ; 0,86]
	Valeurs en ln	-3,27 ; 1,18	$-1,08 \pm 1,16$	-1,25 [-2,15 ; -0,15]
HbAS	Valeurs brutes	0,19 ; 1,74	$0,50 \pm 0,27$	0,40 [0,30 ; 0,64]
	Valeurs en ln	-1,68 ; 0,55	$-0,81 \pm 0,49$	-0,91 [-1,19 ; -0,44]

Tableau 1. Statistiques descriptives des valeurs de fluorescence en fonction des génotypes des hématies infectées. Les valeurs résument les 161 mesures effectuées pour chaque génotype (min : minimum ; max : maximum ; m : moyenne arithmétique ; s : écart-type ; m_e : médiane ; q_1 : premier quartile ; q_3 : troisième quartile).

Tous les critères précédents sont communs avec les modèles linéaires classiques. Pour les modèles linéaires à effet mixte, des critères supplémentaires sont à étudier, notamment sur l'effet aléatoire ajouté au modèle. Ces critères ont été vérifiés graphiquement notamment avec les fonctions `qqplot` et `dotplot` après avoir extrait les estimations des effets aléatoires avec la fonction `ranef`. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6.2 GUI 1.70) [21]. La réalisation du modèle linéaire à effet mixte a été effectuée avec la fonction `lmer` de la bibliothèque `lme4` (version 1.1-23) [22].

Résultats

Description des données

L'échantillon est composé de 322 mesures de fluorescence. La mesure de la fluorescence a été faite deux fois par femme, une fois en mettant en contact son plasma avec des globules rouges de génotype HbAA et une fois avec des Gri de génotype HbAS. Parmi les 161 femmes de l'étude, 106 (66 %) sont multigestes, 29 (18 %) secondigestes et 26 (16 %) primigestes. Ces femmes se répartissent en 125 (78 %) femmes de génotype HbAA et 36 (22 %) de génotype HbAS. Pour 136 (84 %) d'entre elles, le frottis à l'accouchement n'a pas révélé la présence de parasite dans leur sang; pour les 25 autres (16 %), la présence de *P. falciparum* a été avérée en fin de grossesse.

Variable		Coef.	Estimation [I. C. à 95 %]	p
Ordonnée à l'origine		α_0	-1,312 [-1,481 ; -1,143]	Sans objet
Génotype (hématie)	HbAS	β_2	0,242 [0,096 ; 0,388]	<0,001**
Génotype(femme)	HbAS	β_3	-0,164 [-0,469 ; 0,141]	0,294
Infection	Oui	β_4	0,367 [0,065 ; 0,670]	0,015*
Gestité	linéaire	β_5	0,553 [0,337 ; 0,769]	<0,001**
	quadratique	β_{52}	0,107 [-0,138 ; 0,352]	
Interaction des génotypes	Génotypes différents	β_6	0,110 [-0,198 ; 0,418]	0,484

Tableau 2. Résultats du modèle linéaire à effets mixtes du logarithme népérien de la fluorescence. Les coefficients β_X expriment la modification du logarithme de la fluorescence par rapport à α_0 , valeur de référence (hématies infectées HbAA et plasma de femmes primigestes de génotype HbAA sans infection). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$

Les mesures de fluorescence, en fonction du génotype des hématies infectées, sont résumées dans le tableau 1.

Résultats du modèle linéaire à effets mixtes expliquant le logarithme népérien de la fluorescence

Un modèle linéaire à effets mixtes a été réalisé afin d'obtenir les estimations des différents coefficients ainsi que leur intervalle de confiance. Une analyse de la variance a permis de donner les degrés de signification pour chaque coefficient (tableau 2).

L'analyse suggère un effet positif du nombre de grossesses sur la fluorescence ($p < 0,001$). En effet la variable était séparée en trois modalités : primigeste, secondigeste et multigeste, cette dernière modalité comprenant toutes les femmes étant à leur troisième grossesse ou plus. En effet, il a été démontré que le nombre d'anticorps produits à partir de trois grossesses était équivalent pour toutes les grossesses suivantes. Il est dès lors logique d'obtenir une relation principalement linéaire (estimation du coefficient linéaire pour la gestité = 0,553, intervalle de confiance excluant zéro ; tableau 2), alors que le coefficient quadratique, plus faible, n'est pas significatif (estimation d : 0,107, intervalle de confiance incluant zéro ; tableau 2). Ainsi, dans l'étude analysée, pour chaque grossesse supplémentaire entre une et trois, le logarithme de la fluorescence augmente de 0,553, c'est à dire que la fluorescence — et donc la fixation des anticorps — serait augmentée de 73 % à chaque nouvelle grossesse, toutes choses égales par ailleurs.

De même, un diagnostic positif d'un paludisme à *P. falciparum* à l'accouchement est associé à une augmentation significative, au risque 5 %, du logarithme de la fluorescence (estimation du coefficient pour l'infection = 0,367, $p = 0,015$). Ainsi, toujours dans cette étude, la fluorescence — soit la fixation des anticorps — serait augmentée de 43 % par rapport à une femme ne présentant pas de diagnostic positif à *P. falciparum*.

D'une part l'effet du génotype de la femme ayant donné son plasma — et donc ses anticorps — n'est pas significatif. D'autre part, le génotype des hématies infectées a montré un effet significatif au risque 5 % avec le modèle linéaire. En effet, une hématie HbAS augmenterait de 27 % la fluorescence par rapport à une hématie HbAA (coefficient estimé à 0,242, $p < 0,001$), chez une femme HbAA. Ces résultats peuvent paraître inattendus vis à vis des moyennes retrouvées dans l'analyse de données (tableau 1) pour les fluorescences en fonction des génotypes des hématies : la moyenne de la fluorescence pour les GRi HbAS (0,50) est inférieure à celle des GRi HbAA (0,63). Cependant, l'écart-type pour cette dernière est très élevé (0,70) ce qui peut expliquer ces chiffres. La médiane des fluorescences pour les GRi HbAA (0,29) est quant à elle bien inférieure à celle des HbAS (0,40).

Enfin, l'interaction entre les deux génotypes testés dans ce modèle n'est pas significative ($p = 0,484$) : les anticorps issus de plasma de femmes HbAA ne semble pas reconnaître pas préférentiellement les hématies HbAA et inversement. La seule augmentation de logarithme de la fluorescence due aux génotypes serait ici imputable au seul génotype des GRi HbAS.

Discussion

Hypothèse physiologique

L'analyse n'a pas montré d'effet significatif du génotype de l'hémoglobine du plasma maternel contrairement à celui des hématies testées. Celui-ci est positif lorsqu'il est HbAS, quel que soit le statut sérologique de la femme. Cette conclusion est particulièrement intéressante : en effet, la fixation augmentée des anticorps plasmatiques aux globules rouges infectés HbAS pourrait expliquer la protection que donne ce génotype particulier contre le paludisme gestationnel, un mécanisme encore inconnu à ce jour. Le fait que le génotype de la femme n'a pas d'effet significatif suggère que ce ne sont pas les anticorps qui sont responsables de cette augmentation de reconnaissance. Ce pourraient donc être les hématies infectées HbAS qui posséderaient les caractéristiques qui en font une cible privilégiée de ces anticorps.

Une hypothèse serait que l'accessibilité de VAR2CSA serait différente entre les hématies infectées HbAS et HbAA. En effet, le trait drépanocytaire de ces globules rouges modifierait la nature de la membrane des globules, et ainsi en changerait la conformation.

Présence d'anticorps et protection contre les formes graves de paludisme gestationnel

La fixation des anticorps sur les hématies infectées est l'un des moyens qu'a l'organisme pour se défendre contre le parasite. En effet elle permet notamment la phagocytose des hématies infectées et donc leur élimination. Ainsi une augmentation de la fixation des anticorps aurait un effet protecteur contre les formes graves du paludisme.

Plusieurs variables ont montré des effets positifs sur la fixation des anticorps. Dans le cas de la gestité et de l'infection à *P. falciparum*, cette augmentation de la fixation est due à un plus grand nombre d'anticorps. Mais cette explication ne justifie pas la différence de fixation des anticorps à des hématies HbAS plutôt que HbAA.

Or, la variation de la fixation peut être expliquée par différents facteurs comme l'augmentation du nombre d'anticorps, l'augmentation du nombre de cibles, une meilleure accessibilité de l'anticorps à sa cible. Dans cette étude, c'est cette dernière hypothèse qui a été retenue du fait de l'absence d'augmentation du nombre d'anticorps à prendre en compte étant donné que les mêmes sérums sont testés sur les hématies infectées des deux génotypes. De même, l'affinité de

l'anticorps pour sa cible ne semble pas être privilégiée car les anticorps viennent de sérums issus de femmes de génotypes différents alors que l'effet du génotype de la femme n'est pas significatif au risque 5 %.

Une explication possible à l'augmentation de la fixation des anticorps sur les hématies infectées HbAS par rapport aux HbAA pourrait être que le nombre de cibles, c'est-à-dire le nombre de ligands VAR2CSA exprimés à la surface des hématies infectées, soit augmenté dans les hématies HbAS. Mais si la souche de *P. falciparum* utilisée pour infecter les hématies est connue pour exprimer le VAR2CSA, cette différence d'expression en fonction du génotype n'a pas été vérifiée dans cette étude. Il serait intéressant d'évaluer cette hypothèse.

De plus, il aurait été intéressant de mesurer les proportions d'anticorps anti-VAR2CSA dans les sérums des femmes (en plus de la quantité globale d'anticorps), afin de confirmer les hypothèses concernant les effets de la gestité et de l'infection.

Limites liées au protocole expérimental

Si un typage du groupe sanguin ABO a été réalisé sur les hématies utilisées dans les expériences, des interactions parasites entre les plasmas des différentes femmes et ces mêmes hématies pourraient impacter les résultats de l'étude.

De plus, les globules rouges sur lesquels les expériences ont été menées proviennent de donneurs d'ethnies différentes. Il serait intéressant d'évaluer la reproductibilité des résultats en utilisant des globules rouges de femmes béninoises dans des études ultérieures.

Critique du modèle statistique

Afin de permettre l'étude des données expérimentales dans un modèle dont les hypothèses de

départ ont été validées, la fluorescence a été étudiée après une transformation par le logarithme népérien. Cette transformation a ajouté une complexité à l'analyse des résultats.

Les résultats issus du modèle statistique et les conclusions sont à relativiser de par la taille de l'échantillon. Certains résultats non significatifs, tels que l'interaction entre les génotypes et le génotype de la femme, pâtissent peut-être d'un manque de puissance. De nouvelles études avec un échantillon de taille conséquente semblent être nécessaires afin de confirmer ou infirmer les hypothèses présentées dans cet article.

Conclusion

Des études de l'immunité due à une reconnaissance des hématies infectées exprimant VAR2CSA par les anticorps durant le paludisme gestationnel ont déjà été mises au point [24]. Cependant, cette étude a permis de mettre en évidence une variation de la fixation des anticorps anti-VAR2CSA sur les hématies possédant un trait drépanocytaire. Cela a permis de proposer une hypothèse reliant le fait que la possession de ce génotype permette une protection contre le paludisme gestationnel grave et l'immunologie. Cette théorie est à considérer dans l'étude de ces mêmes cas graves dans des zones d'endémie palustres où la sélection positive du trait drépanocytaire implique une proportion importante de la population. Or les études cliniques sur le paludisme gestationnel dans le cas d'une coexistence d'un trait drépanocytaire sont plutôt rares.

Un approfondissement des relations entre anticorps anti-VAR2CSA et hématies infectées chez un plus grand nombre de femmes doit être mené.

Références

- 1 https://www.who.int/malaria/areas/high_risk_groups/pregnancy/fr/
- 2 E. DEI-CAS, P. MAUROIS & A. VERNES. « Physiopathologie du paludisme », *Médecine/Sciences* (Paris), 1986, vol. 2 n° 6, p. 322–330.
- 3 P. A. BUFFET & A. SCHERF. « Pathogénie du paludisme gestationnel », *Médecine/Sciences* (Paris), 2001, vol. 17 n° 10, p. 1017–1026.
- 4 Julia C. CUTTS, Paul A. AGIUS, Zaw LIN, Rosanna POWELL, Kerry MOORE, Bridget DRAPER, Julie A. SIMPSON & Freya J. I. FOWKES. « Pregnancy-specific malarial immunity and risk of malaria in pregnancy and adverse birth outcomes: a systematic review », *BMC Medicine*, janvier 2020, vol. 18 n° 1, p. 14.
- 5 M. E. WICKHAM, M. RUG, S. A. RALPH, N. KLONIS, G. I. MCFADDEN, L. TILLEY & A. F. COWMAN. « Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes », *EMBO Journal*, 2001, vol. 20, p. 5636–5649.
- 6 Adam F. SANDER, Ali SALANTI, Thomas LAVSTSEN, Morten A. NIELSEN, Pamela MAGISTRADO, John LUSINGU, Nicaise Tuikue NDAM & David E. ARNOT. « Multiple var2csa-Type PfEMP1 Genes Located at Different Chromosomal Loci Occur in Many *Plasmodium falciparum* Isolates », *PLoS One*, août 2009, vol. 4 n° 8, p. e6667.
- 7 Nicaise Tuikue NDAM, Ali SALANTI, G. BERTIN, M. DAHLBÄCK, N. FIEVET, L. TURNER, A. GAYE, T. THEANDER & Philippe DELORON. « High Level of var2csa Transcription by *Plasmodium falciparum* Isolated from the Placenta », *The Journal of Infectious Diseases*, juillet 2005, vol. 192 n° 2, p. 331–335.

- 8 Stéphane SARRAZIN. *Caractérisation des interactions glycosaminoglycannes/protéines dans le but de développer des molécules d'intérêt thérapeutique : exemples de l'Endocan et de l'interféron gamma*, thèse d'université, université Joseph-Fourier – Grenoble I, 2007.
- 9 Stéphane SARRAZIN. *Glycosaminoglycans and proteoglycans*, mars 2020, cours en ligne, <https://themedicalbiochemistrypage.org/glycosaminoglycans-and-proteoglycans/>
- 10 J. G. BEESON et coll. « Antibodies to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and adhesion inhibitory antibodies are associated with placental malaria and have overlapping and distinct targets », *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, vol. 189 n° 3, p. 540-551.
- 11 Justin Yaï Alamou DORITCHAMOU. *Caractérisation des parasites du paludisme gestationnel et optimisation du potentiel vaccinal de VAR2CSA*, thèse d'université, 2014.
- 12 M. P. VLEUGELS, W. M. ELING, R. ROLLAND & R. DE GRAAF. « Cortisol and loss of malaria immunity in human pregnancy », *British Journal of Obstetrical Gynaecology*, août 1987, vol. 94 n° 8, p. 758-764.
- 13 J. ELION. *Drépanocytose, la maladie génétique la plus fréquente*, université Paris Diderot, INSERM 1134. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/drepanocytose>
- 14 <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>
- 15 F. GALACTÉROS, F. LIONNET, A. HABIBI, K. STANKOVIC, J. B. ARLET, J. A. RIBEIL & P. BARTOLUCCI. *La drépanocytose anémie falciforme et anémie à hématies falciformes*. <https://www.orpha.net>
- 16 L. LUZZATTO. « Sickle Cell Anaemia and Malaria », *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2012, vol. 4 n° 1, p. e2012065. doi: 10.4084/MJHID.2012.065
- 17 B. POUVELLE, P. MEYER, C. ROBERT C et coll. « Chondroïtin-4-sulfate impairs *in vitro* and *in vivo* cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes », *Molecular Medicine*, 1997, vol. 3, p. 508–518.
- 18 M. CHAUVET, M. TÉTARD, G. COTTRELL, F. AUSSENAC, E. BROSSIER, L. DENOYEL, M. HANNY, M. LOHEZIC, J. MILET, Nicaïse Tuikue NDAM, D. PINEAU, J. ROMAN, A. J. F. LUTY, B. GAMAIN, F. MIGOT-NABIAS & Anaïs MERCKX. « Impact of Hemoglobin S Trait on Cell Surface Antibody Recognition of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes in Pregnancy-Associated Malaria », *Open Forum Infectious Diseases*, avril 2019, vol. 6 n° 4.
- 19 W. TRAGER & J. B. JENSEN. « Human malaria parasites in continuous culture », *Science*, 1976, vol. 193 p. 673–675.
- 20 Nicaïse Tuikue NDAM, N. FIEVET, G. BERTIN et coll. « Variable adhesion abilities and overlapping antigenic properties in placental *Plasmodium falciparum* isolates », *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, vol. 190, p. 2001–2009.
- 21 R Development Core Team (2005). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- 22 J. GAUDART, R. GIORGI, Jean-Christophe THALABARD, Djeneba THIAM & S. WHEGANG. Cours « Modèles linéaires à effets mixtes », septembre 2010.
- 23 *Tests diagnostiques*, <https://theasierproject.files.wordpress.com/2017/05/lme23.pdf>
- 24 Nicaïse Tuikue NDAM, L. DENOEU-NDAM, Justin DORITCHAMOU et coll. « Protective antibodies against placental malaria and poor outcomes during pregnancy, Benin ». *Emerging Infectious Diseases*, 2015, vol. 21, p. 813–823.