

IV

La cytolysse des érythrocytes au cours du paludisme : L'implication des cellules NK

Elie Mavoungou
Professeur d'Immunologie

In European cytokine network vol. 14, N°3, pp. 134-142, 2003.

Résumé

Cet article présente les résultats des tests d'évaluation de la capacité des cellules « Natural Killer » (NK) humaines à inhiber la croissance de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) aux stades sanguins asexués de leur développement *in vitro*.

Les cellules NK purifiées des donneurs de sang n'ayant eu aucune exposition préalable au paludisme avant le prélèvement sanguin, inhibent la croissance des parasites après 48 heures de co-culture en présence de sérum de sujets semi immuns. Cette inhibition est complètement abolie lorsque les cellules NK sont préalablement incubées avec un anticorps monoclonal anti-CD95 (anti-Fas) humain ou avec la protéine chimère composée par la fusion de la molécule Fas d'une part et du fragment Fc d'immunoglobuline humaine soluble d'autre part. Le niveau de l'inhibition de la croissance des parasites est également substantiellement réduit par le prétraitement des cellules avec un anticorps anti-CD56. Ces deux anticorps entraînent une diminution à des niveaux variables de la production de granzyme B (GrB) et des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α et IL-12), mais, seul l'anticorps anti-Fas affecte la production de Fas ligand soluble (sFasL). La destruction directe des érythrocytes parasités par les cellules NK, en absence de tout sérum a été observée par le test standard de mesure de la cytotoxicité par la libération de chrome radioactif et durant l'activité N-carboxybenzoxy-L-lysine thiobenzil ester (BLT estérase), qui catalyse la libération des granules cytotoxiques de la famille des serine protéases par les cellules NK. Les résultats

obtenus au cours des expériences décrites dans cet article sont indicatifs d'un mécanisme non encore connu, de l'activité cytotoxique des cellules NK contre les érythrocytes parasités par *P. falciparum* médiée en partie par les systèmes Fas/FasL et perforine/granzyme.

1. Introduction

Les cellules NK, grâce à leur mécanisme effecteur du système immunitaire, constituent, avec les autres cellules de l'immunité innée, la première ligne de défense de l'organisme [1]. Elles sont généralement définies comme des cellules cytotoxiques se présentant comme des lymphocytes pourvus de gros granules (LGL), et qui n'expriment à leur surface membranaire ni le complexe antigénique CD3, ni aucune autre chaîne moléculaire connue du récepteur de cellules T (TCR), α/β ou γ/δ . La plupart des cellules NK humaines expriment constitutivement les antigènes CD16 (Fc γ RIIIA), et CD56 (NCAM). Les cellules NK expriment aussi les antigènes des récepteurs NK (NKR), qui appartiennent à deux familles de molécules: (i) les récepteurs des cellules NK de la famille des immunoglobulines représentés par les molécules KIR (killer cell inhibitory receptors), et les molécules LIR (leucocyte immunoglobulin like receptors), et (ii) les hétérodimères CD94-NKG2 qui ont une structure voisine de celle des lectines de type C [2-5]. Les activités physiologiques des cellules NK, telles que la cytotoxicité, la prolifération cellulaire et la production de médiateurs solubles, sont régulées par des cytokines variées, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'interféron alpha (IFN- α) [6] et l'interleukin-2 (IL-2) [7] sont les plus puissants inducteurs de l'activité NK, mais l'IL-12 jouerait aussi le rôle de régulateur de ces activités [8-9]. L'IL-2 induit la libération de granzyme B (GrB) par les cellules NK, et la granzyme M humaine présente une forte expression constitutive dans les cellules NK et les cellules $\gamma\delta$ -T mais pas dans les lymphocytes T CD4⁺ ni les lymphocytes T CD8⁺. L'effet de l'IFN- γ sur les cellules NK est particulièrement remarquable. En effet, l'IFN- γ agit sur l'activation des cellules NK de façon à la fois paracrine (lorsque produit par d'autres cellules mononucléaires), et

d'une manière autocrine (lorsque produit par les cellules NK elles-mêmes). Les cellules NK activées sécrètent elles-mêmes à leur tour de l'IFN- γ ainsi que la molécule Fas ligand soluble (sFasL), la perforine [12] et les granzymes A, B and M [13,14]. Au cours de la réponse immune au paludisme chez l'homme, des travaux ont récemment rapporté que les parasites vivants induisaient une plus forte production d'IFN- γ par les cellules NK que des extraits parasitaires, et que l'IFN- γ produit avait un effet anti-parasitaire [15]. Dans les travaux dont les résultats sont rapportés dans cet article, une tentative d'élucidation du rôle possible de la cytotoxicité des globules rouges parasités *in vitro* par *P.falciparum* catalysée par les cellules NK a été réalisée. Elle résulte de l'analyse de l'effet des cellules NK sur la croissance des parasites, de leur activité cytotoxique contre les globules rouges parasités ainsi que du profil des cytokines et d'autres médiateurs humoraux libérés spécifiquement au cours de l'interaction entre cellules NK et les globules rouges.

2. Le matériel et les méthodes utilisés

2-1/ La Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.

Une souche de *P.falciparum* établie en laboratoire et dénommée BINH a été utilisée dans cette étude. La culture d'origine de cette souche provient des cellules d'un touriste Européen qui développa un paludisme grave à son retour d'un séjour au Kenya. Les parasites étaient cultivés selon la méthode classique décrite par Trager and Jensen en 1976 [16]. Dans cette technique, les parasites sont cultivés en routine avec des globules rouges fraîchement préparés à partir du sang de sujets de groupe sanguin O⁺ dans du milieu culture dit complet. Les globules rouges sont obtenus après centrifugation du sang total sur un gradient de ficoll. Le culot est récupéré puis conservé au frais. Le milieu de culture complet est constitué de RPMI-1640 contenant 4 g/L de glucose, 25 μ g/L de gentamicine 32 μ M d'hypoxanthine 5.94 g/L d'HEPES et de 2.33 g/L d'hydrocarbonate de sodium (NaHCO₃). Ce milieu est complété avec 0.5% d'Albumax IITM, une albumine bovine riche en lipide contenant une concentration minimale d'immunoglobuline G (IgG), dans une atmosphère contenant 5% de gaz carbonique (CO₂) ,5% d'oxygène (O₂)

et 90 % d'azote (N₂). Le milieu de culture était dépourvu d'endotoxine et était renouvelé tous les jours. A chaque renouvellement du milieu de culture, 400 µl de suspension de globules rouges de groupe O⁺ préalablement préparé et conservé au frais étaient ajoutés pour maintenir la croissance des parasites. Les stades érythrocytaires synchrones de *P.falciparum* sont obtenus en suspendant les parasites cultivés dans 5% de D-sorbitol comme précédemment décrit [17]. Les cultures de *P.falciparum* étaient fréquemment contrôlées puis testées pour une éventuelle contamination en *Mycoplasme* par la technique de PCR décrite par Spaepen et ses collaborateurs [18] afin de prévenir toute possible activation cellulaire par l'endotoxine. Les cellules en culture doivent être exemptes de toute autre activation que celle dont on veut mesurer les effets.

2-2/ L'obtention des cellules NK humaines.

Les cellules effectrices NK peuvent être obtenues de deux manières. Elles peuvent être isolées à partir des PBMCs obtenues par gradient de densité au ficoll, soit par sélection positive, soit par sélection négative en utilisant le système de purification MACS (Magnetic Activated Cell Sorter). Dans la sélection positive, les cellules NK contenues dans le mélange de PBMCs sont reconnues par leur marqueur majeur, l'antigène CD56. Cette reconnaissance sélective est réalisée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre cet antigène. L'anticorps est artificiellement couplé aux billes magnétiques. Le mélange cellulaire est ensuite passé dans un champ magnétique qui va piéger les billes magnétiques et donc le couplage anticorps CD56-cellules NK. Après lavage des cellules dans du milieu complet frais, les cellules sont placées dans un incubateur à CO₂ réglé à 37°C pendant environ 16 heures afin de permettre le détachement des billes magnétiques. La sélection négative est basée sur le même principe, mais dans ce cas, ce sont tous les autres types cellulaires, autre que les cellules NK, contenus dans le mélange de PBMCs qui sont marqués par leur antigène spécifique. Toutes ces cellules sont retenues dans le champ magnétique à l'exception des cellules NK qui sont recueillies librement. Les anticorps spécifiques utilisés dans ce cas sont essentiellement : l'anticorps anti-CD3, marqueur sélectif de tous les lymphocytes T, l'anticorps anti-CD4, qui reconnaît

principalement les lymphocytes T helper mais aussi les monocytes et les macrophages, l'anticorps anti-CD14 qui se fixe majoritairement sur les monocytes, l'anticorps anti-CD15 marqueur des neutrophiles et des éosinophiles, l'anticorps anti-CD19 qui fixe les lymphocytes B, l'anticorps anti-CD36, pour la reconnaissance des plaquettes, l'anticorps anti-CD123 qui reconnaît les cellules dendritiques plasmocytaires et les granulocytes basophiles ainsi que l'anticorps dirigé contre la glycophorine A qui est l'antigène majeur des érythrocytes. La sélection négative des cellules présente l'avantage d'obtenir des cellules potentiellement non activées puisque non fixées aux anticorps. Dans le cas de la sélection positive, certains auteurs pensent que la fixation aux anticorps spécifiques pourrait induire une activation cellulaire non prise en compte au cours des expériences ultérieures. Les cellules NK sont obtenues à partir d'échantillons sanguins de donneurs de sang volontaires sains, n'ayant aucun signe sérologique ou clinique d'un contact avec *P.falciparum*. Après le prélèvement, le sang est dilué volume à volume dans du RPMI-1640, déposé sur un gradient de densité de ficoll puis centrifugé pendant 20 minutes à 400 g. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont prélevées à l'aide d'une pipette et lavées deux fois avec du RPMI-1640. Après le second lavage, le culot cellulaire est resuspendu dans 40 µl de tampon de marquage MACS pour un total de 10^7 cellules. Le tampon MACS est un tampon phosphate (PBS) contenant 2 mM EDTA et 0,5% de sérum de veau foetal (SVF). Le mélange est ensuite incubé aussitôt avec le cocktail d'anticorps biotinylés utilisé pour la séparation négative des cellules NK. Au bout de 10 minutes d'incubation, 30 µl de tampon MACS et 20 µl de microbilles d'antibiotine sont rajoutés et le nouveau mélange est incubé 15 minutes à 4°C. A la fin de cette dernière incubation, les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les anticorps non fixés aux cellules, puis éluer au travers d'une colonne de séparation super MACS placée dans un champ magnétique pour retenir toutes les cellules marquées et recueillir les cellules NK non activées.

Après l'élution, les cellules sont relavées une nouvelle fois, re-suspendues dans du tampon phosphate (0,15 mM Chlorure de sodium/ 10mM Phosphate de sodium, pH7.4), pré incubées 20 minutes avec des anticorps fluorescents comme décrit dans le prochain paragraphe, puis analysées au cytomètre de flux afin déterminer leur nombre ainsi que

leur viabilité. Les cellules NK obtenues après un gradient de ficoll puis une sélection négative sur super MACSTM sont marquées avec différents anticorps couplés à la fluorescéine (FITC) ou à la phycoérythrine (PE). Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-CD56-PE (clone B156) et anti-CD16-FITC (clone 3G8) pour les cellules NK, anti-CD14-FITC et anti-CD16-PE (clone 3G8) pour les monocytes, anti-CD4-FITC (clone RPA-T4) et anti-CD3-PE (clone UCHT1) pour les lymphocytes T helper, anti-CD8-FITC (clone RPA-T8), anti-CD3-PE (UCHT1) pour les lymphocytes T cytotoxiques et anti-CD19 (clone TB28-2/1-155-2/SJ25C1) pour les lymphocytes B. Les isotypes témoins négatifs utilisés comme marqueurs de la fixation non spécifique sont le mélange IgG1-FITC/IgG2a-PE de souris (clone MOPC-21/UPC-10) (Sigma). Les cellules (10^6) sont incubées à 4°C dans 250 µl de PBS contenant 1% de SVF et une concentration optimale d'anticorps utilisée selon les instructions du fabricant. Après 20 minutes de marquage, les cellules sont lavées 3 fois puis directement analysées. L'analyse des cellules NK CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺, des cellules T helper CD3⁺/CD4⁺, des cellules T cytotoxiques CD3⁺/CD8⁺, des monocytes CD14⁺/CD16⁺ et des lymphocytes B CD3⁺/CD19⁺ à l'aide du logiciel Facstar a révélé que les populations cellulaires NK, lymphocytes T helper, lymphocyte T cytotoxiques et monocytes ainsi obtenues étaient à plus de 97% pures.

2-3/ Le test d'inhibition de croissance de *P.falciparum*.

L'inhibition de la croissance de *P.falciparum* est testée en triplicat dans des plaques ELISA de 96 puits à fond plat à 2% d'hématocrite et à un rapport cellules NK / globules rouges parasités de 1 :1 avec des cellules NK de donneurs de sang Européens n'ayant jamais contracté le paludisme. L'index d'inhibition spécifique de la croissance (SGI), qui prend en compte une éventuelle inhibition induite par les cellules effectrices ou par le sérum utilisé comme témoin dans chaque expérience est calculée comme décrit précédemment [21-23] en utilisant la formule suivante:

$$SGI = 100 \times \left[1 - \frac{(\% \text{ parasitémie avec cellules effectrices et IS} / \% \text{ parasitémie avec SI seul})}{(\% \text{ parasitémie avec cellules effectrices et SNI} / \% \text{ parasitémie avec SNI seul})} \right]$$

Dans cette formule, SI représente le sérum immun et SNI, le sérum non immun

Le sérum immun utilisé dans l'étude rapportée ici est constitué par un mélange du sérum de huit (8) volontaires adultes vivant à Lambaréné au Gabon, une région où le paludisme est hyper endémique et où la transmission de *P.falciparum* est pérenne [24]. Tous ces adultes n'ont jamais quitté leur localité et ont une histoire de paludisme à répétition. La coloration au Giemsa de leur « goutte épaisse » était négative au moment du prélèvement sanguin. La coloration au Giemsa est le test de diagnostic standard du paludisme. Un consentement individuel éclairé à participer à l'étude est exigé pour des raisons éthiques avant tout prélèvement de sang destiné à la recherche. Le sérum obtenu à partir des échantillons sanguins par centrifugation après sédimentation, est échantillonné et gardé dans un congélateur à -80°C jusqu'à utilisation. Le mélange de sérum non immun des donneurs de sang Européens non exposés au paludisme, et de groupe sanguin AB+ est utilisé comme témoin. Pour chaque expérience, le sérum est utilisé à 10%. L'action des cellules NK sur la croissance de *P.falciparum* est évaluée après 48 heures de culture, en utilisant des schizontes à 1-2% de parasitémie dans les cultures synchrones. La parasitémie est estimée en routine sur des préparations de lames colorées au Giemsa, en triplicat et par l'observation microscopique d'au moins 10.000 érythrocytes.

2-4/ Le blocage de l'inhibition de croissance.

Pour déterminer si l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* observée dans les co-cultures de cellules NK / globules rouges parasités, est due à une activation préalable des cellules NK ou non, ces dernières ont été pré-incubées avec des concentrations saturantes de deux anticorps monoclonaux de souris anti-humain : l'anti-CD95 clone ZB4 (qui n'induit pas d'apoptose en culture) puisque les cellules NK expriment FasL [12], et l'anti-CD56. Les cellules sont aussi alternativement incubées avec la protéine chimère Fas-Fc humaine soluble [une protéine chimère contenant la région extracellulaire de Fas humaine et la portion Fc de l'immunoglobuline IgG1 humaine], ou avec l'isotype témoin des deux anticorps. L'incubation est réalisée pendant 1 heure à 4°C . Les cellules NK sont

ensuite lavées trois fois pour éliminer les anticorps non fixés, avant de réaliser les tests d'inhibition de croissance décrits ci-dessus. Les données sont analysées au bout de 48 heures de culture des parasites.

2-5/ Les cellules cibles.

Les globules rouges parasités par *P.falciparum in vitro* par la souche BINH sont utilisés comme cellules cibles dans les tests de cytotoxicité (voir ci dessous) et dans les expériences de sécrétion de granules cytotoxiques. Les globules rouges parasités impliqués sont utilisés au stade de schizontes matures. Les cellules K562, une lignée cellulaire tumorale établie à partir des cellules d'un patient ayant développé une leucémie myéloïde chronique en phase blastique [25], sont utilisées comme témoins positifs. (Les cellules K562 utilisées dans l'étude décrite dans cet article sont un généreux don du Professeur Eric Vivier, CIML, Marseille-Luminy, France). Les cellules sont maintenues en croissance dans du milieu de culture complet, RPMI-1640 contenant 10% de SVF, 100 U/ml de pénicilline, 100 mg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine et 1 mM de pyruvate de sodium dans des boîtes de culture. Le milieu de culture était renouvelé tous les deux jours.

2-6/ Marquage des cellules cibles au chrome radioactif (^{51}Cr).

Les cellules cibles (3×10^6) sont incubées avec 100 μCi de chrome 51 (solution aqueuse de chromate de sodium: $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) dans 1,5 ml de milieu complet pendant 1 heure à 37°C dans 5% $\text{CO}_2/95\%$ d'air humidifié. Sur la base de la décroissance du chrome radioactif, les volumes de radioactivité ajoutés varient de 80 à 250 μl en fonction de la date de référence de la fabrication du produit. À la fin de l'incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du milieu complet et ajustées à une concentration de 5×10^4 cellules/ml. Pour chaque test, 100 μl de cette suspension (l'équivalent d'environ 5000 cellules) sont utilisés.

2-7/ Le test de cytotoxicité.

Pour les tests de cytotoxicité NK, les cellules cibles, les globules rouges parasités par *P.falciparum* ou les cellules K562 sont incubées pendant 1 heure à 37°C avec 200 µCi de Na₂⁵¹CrO₄, lavées deux fois puis déposées (5000 cellules par puits) dans des plaques ELISA de 96 puits à fond rond. Les cellules effectrices (cellules NK) sont ensuite ajoutées en triplicat de manière à avoir dans chaque puits de la plaque ELISA un volume final de 200 µl. Les plaques sont centrifugées à 400 g pendant 2 minutes à température ambiante pour permettre la formation de conjugués entre les cellules NK et les globules parasités ou les cellules K562. L'activité cytotoxique est mesurée aux rapports effecteur/cible de 40:1; 20:1; 10:1; 5:1 and 1:1. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les plaques sont de nouveau centrifugées et le surnageant (100 µl) de chaque puits est collecté et directement placé dans un compteur gamma afin de déterminer la radioactivité libérée. La libération maximale de chrome est déterminée en ajoutant 1% de sulfate de sodium dodecyl (SDS) dans les puits témoins. Le SDS est utilisé pour son pouvoir détergent pour lyser les cellules. La libération spontanée est déterminée dans les puits dans lesquels les cellules cibles ne sont incubées qu'avec du milieu de culture. En principe, la libération spontanée de la radioactivité n'excède jamais 20% de la libération maximale. La cytotoxicité spécifique est calculée en utilisant un standard. Le pourcentage de libération spécifique du marqueur est calculé à partir de la formule suivante:

$$\% \text{ spécificité} = [(cpm. \text{ Exp.} - cpm \text{ Spont.} / cpm \text{ Max.} - cpm \text{ Spont.})] \times 100.$$

2-8/ Le dosage de la BLT estérase.

L'activité estérase est mesurée comme précédemment décrit par Sayers et ses collaborateurs [26]. Une brève analyse de cette technique indique que, 50 µl de l'échantillon à tester sont ajoutés à 100 µl d'acide 5-5 di-thio bis 2-nitrobenzoïque (DNTB) 1 mM, préparés dans du PBS contenant 1 mM de CaCl₂ et 2 mM de MgCl₂ à pH

7.2. La réaction est initiée en ajoutant 50 µl de 2 mM de N-carboxybenzoxy-L-lysine thiobenzyl ester (BLT). La durée de l'expérience dépend du temps nécessaire à l'apparition de la coloration maximale (approximativement 30 minutes). L'absorbance est mesurée à 420 nm dans un lecteur de plaque ELISA piloté par le logiciel Mikrowin, avec un filtre de référence à 620 nm. Les témoins négatifs de l'expérience (DNTB seul, BLT seul, et DNTB + BLT) sont toujours utilisés comme contrôle pour prendre en compte les effets non spécifiques de la réaction enzymatique. Pour bloquer la signalisation spécifique par granzyme B, l'inhibition de l'activité estérase était obtenue en incubant les cellules NK pendant 4 heures à 37°C avec 100 µM de Z-AAD-CH₂Cl, un inhibiteur spécifique de granzyme B.

2-9/ Le dosage des cytokines.

La production des facteurs solubles libérés par les cellules NK est réalisé par le dosage des cytokines dans les surnageants de co-culture des cellules NK et des érythrocytes parasités *in vitro* par *P.falciparum*, en absence de sérum. Cinq cent mille cellules NK obtenues après purification comme indiqué dans la section obtention des cellules NK humaines, sont mises en culture en présence de globules rouges parasités, dans des plaques ELISA de 96 puits à fond plat, dans un volume final de 200 µl. Le milieu de culture était le RPMI-1640. Après une incubation des plaques à 37°C pendant 48 heures, les surnageants de tous les puits sont prélevés, collectés puis conservés à – 20°C avant de mesurer les taux de cytokines et chémokines secrétées au cours de ces co-cultures. Les cytokines suivantes ont été dosées: IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12p40 sFasL, et granzyme B.

2-10/ L'analyse statistique des résultats

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel JMP 4.0, (JMP 4.0, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA, software). Les niveaux de significativité sont déterminés par les tests *t*, et les valeurs de *p* inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

3. Résultats

3-1/ Les cellules NK inhibent la croissance de *P.falciparum* *in vitro* en présence de sérum immun.

Comme les cellules NK expriment Fc γ RIII (CD16), le récepteur à faible affinité pour les immunoglobulines cytophyliques IgG1 et IgG3, les effets de l'inclusion du sérum d'adultes Africains semi immuns pour le paludisme sont déterminés, dans ce système (i.e. le potentiel d'augmentation de l'activité lytique des cellules NK pour les globules rouges médiée par les anticorps). L'ajout de cellules NK purifiées dans un rapport effecteur/cible de 1 :1 aboutit en une inhibition de la croissance des parasites comme reflétée par une inhibition spécifique de la croissance (SGI) de 25% (Fig.1A). L'interaction des cellules NK avec les cellules T CD4+ en présence de sérum immun aboutit en une SGI de 27% tandis que la plus forte inhibition de la croissance des parasites (44%) est obtenue lorsque les globules rouges parasités sont incubés avec les monocytes en présence de sérum immun (Fig.1A). Aucun effet n'est observé en absence de sérum immun (Résultats non présentés).

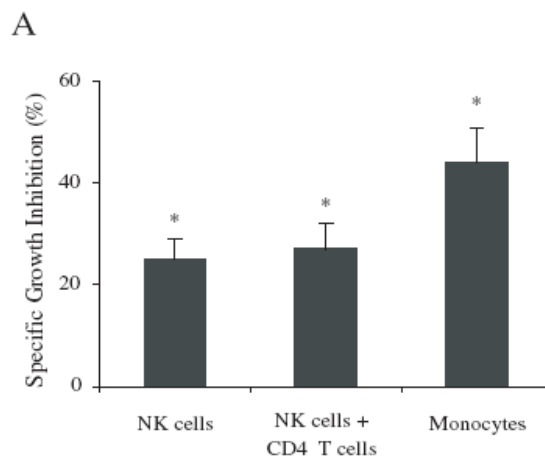


Figure 1A

La figure 1A représente l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* par les cellules NK, les monocytes et les cellules helper T CD4⁺.

L'inhibition de la croissance de *P.falciparum in vitro* (i) par les cellules NK, (ii) par les cellules NK en présence des cellules T-CD4⁺ ou (iii) par les monocytes. L'inhibition de la croissance est déterminée en calculant l'Index d'Inhibition Spécifique (SGI). Les Résultats sont exprimés en moyenne \pm la déviation standard (SD) des valeurs individuelles de trois expériences indépendantes.

3-2/ Les anticorps anti-CD95 préviennent l'inhibition de croissance de *P.falciparum* par les cellules NK

Une possible implication de la voie lytique de perforine/granzyme et/ou celle de Fas/FasL dans ce système a été ensuite analysée. Le prétraitement des cellules NK avec un anticorps anti-Fas (ZB4), qui n'induit pas d'apoptose, la protéine soluble Fas-Fc humaine et un inhibiteur de granzyme B, Z-AAD-CH₂Cl abolit complètement leur capacité d'inhibition de la croissance parasitaire résultant en un SGI respectivement de –10% et –8% (Fig.1B). Un anticorps anti-CD56 entraîne une levée d'inhibition significative avec un SGI de 4,5% (Tableau 1). Aucune inhibition n'est obtenue avec l'isotype témoin IgG2a. Il est à noter q'un SGI négatif reflète une croissance parasitaire relative comparée au témoin négatif de la réaction.

Table 1
Growth inhibition assay with immune serum

Sample N°	NK cells alone	CD95	Fas-Fc	Z-AAD-CH ₂ Cl	CD56	Isotype control
1	26	-23	-18	-9	7	19
2	31	-16	-5	4	3	26
3	35	3	-13	-9	4	39
4	14	-6	9	-10	2	19
5	21	-12	-7	3	6	24
6	24	-7	-14	-9	5	11
Mean \pm SD ^a	25 \pm 7	-10 \pm 8	-8 \pm 9	-5 \pm 6	4.5 \pm 2	23 \pm 8

Values given are percentage parasite growth inhibition of growth inhibition assay relative to appropriate controls. Percentages with negative values represent enhancement of parasite growth. Parasitaemia at start: 0.5%; mean (\pm SD) parasitaemia of control after 48 hours: 5.2 \pm 0.7%. See materials and methods for details of calculations.

^a Mean \pm SD of all samples tested.

Le tableau 1 représente l'inhibition de la croissance parasitaire en présence de sérum immun. Les valeurs sont données en pourcentage d'inhibition de la croissance des parasites. Les pourcentages avec les valeurs négatives représentent une croissance des parasites dans le milieu de culture. La parasitémie de départ était 0,5% ; La moyenne (\pm SD) de la parasitémie témoin après 48 heures ; $5,2 \pm 0,7$ %. Tous les détails des calculs sont donnés dans le paragraphe Matériels et méthodes.

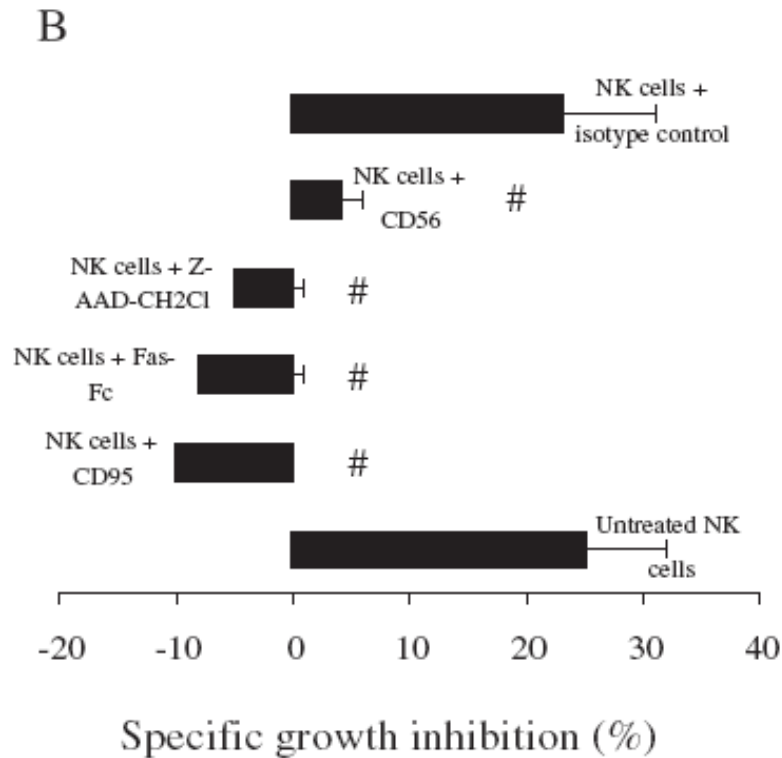


Figure 1B

La figure 1B représente l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* par les cellules NK, les monocytes et les cellules helper T CD4⁺.

Le blocage de l'inhibition de croissance par les cellules NK prétraitées avec les anticorps anti-CD56 (1 μ g/ml), anti-CD95 (1 μ g/ml), l'isotype témoin IgG2a (1 μ g/ml), la protéine soluble Fas-Fc humaine (15 μ g/ml) ou l'inhibiteur de granzyme B, Z-AAD-CH₂Cl (100 μ M). Le blocage de l'inhibition de la croissance est déterminé en calculant le SGI. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des valeurs individuelles de trois expériences indépendantes

* $p < 0.001$ pour la comparaison avec le témoin & # $p < 0.001$ pour la comparaison avec les cellules NK.

3-3/ Les cellules NK ont une activité directe sur les érythrocytes parasités par *P. falciparum*

Afin de déterminer si l'inhibition de croissance de *P.falciparum* observée dans les co-cultures cellules NK et les globules parasités est, au moins en partie due à l'action cytotoxique directe des cellules NK sur les globules rouges parasités, les tests de cytotoxicité conventionnels au chrome radioactif (^{51}Cr) ont été effectués. Une incubation de 4 heures des cellules NK avec les globules rouges parasités marqués au ^{51}Cr en présence de sérum immun, a montré une destruction des cellules cibles comparativement aux cellules témoins non infectées (Figure 2). Cinq différents rapports, cellules effectrices : cellules cibles (E : C) ont été utilisés. L'action cytotoxique des cellules NK sur les globules rouges parasités est spécifique et proportionnelle à la densité cellulaire des cellules effectrices, comme illustré sur la Figure 2.

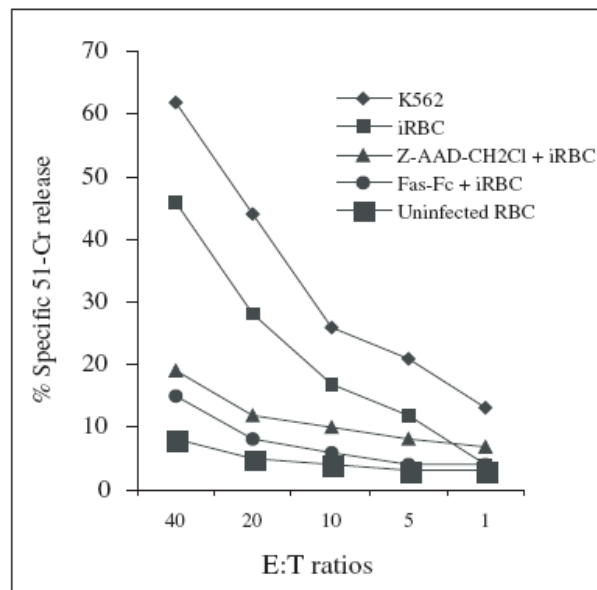


Figure 2
Cytolytic activity of NK cells from non-immune individuals against *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells
Lysis of the indicated target cells (10^4 /well) was determined in a 4-h ^{51}Cr -release assay. SD for all data were less than 3%. This experiment is representative of three performed with similar results. K562: NK-cell sensitive cell line. iRBC: infected red blood cells. RBC: red blood cells.

La figure 2 représente l'activité cytotoxique des cellules NK des sujets non- immuns contre les érythrocytes parasités par *P. falciparum*.

La lyse des cellules cibles (10^4 /puits) est déterminée dans des expériences de libération de chrome radioactif. La déviation standard (SD) de tous les résultats est de moins de 3%. Cette expérience est représentative de trois réalisées dans les mêmes conditions. K562: lignée cellulaire sensible à la cytotoxicité NK. pGR: globules rouges parasités par *P.falciparum*. GR: globules rouges.

3-4/ Les cellules NK activent la BLT estérase au contact des érythrocytes parasités

Comme l'activité cytotoxique des CTL et celle des cellules NK mettent en jeu l'activité enzymatique conduisant à la libération de granules cytotoxiques par les cellules effectrices, l'état d'activation enzymatique des cellules NK incubées avec les globules rouges parasités a été examiné. Les mêmes rapports E:C que ceux utilisés pour les tests de cytotoxicité sont choisis pour les analyses enzymatiques et confirment la spécificité de la réaction. Aux rapports supérieurs à 5 :1, l'interaction des cellules NK avec les cellules K562 ou avec les globules rouges parasités abouti au déclenchement de l'activité enzymatique associée à une BLT plus importante que celle du témoin. (NK avec GR, Fig.3, $p < 0.01$). Dans le cas des cellules K562, cette activité augmente significativement aux plus grands rapports ($p < 0.001$) mais avec les globules rouges parasités, cette activité atteint un plateau à 10 :1 (Fig.3). Lorsque les cellules NK sont prétraitées avec du Z-AAD-CH₂-Cl, il y a une réduction considérable de l'activité BLT, indiquant la mise en jeu de la libération de granzyme par les cellules effectrices.

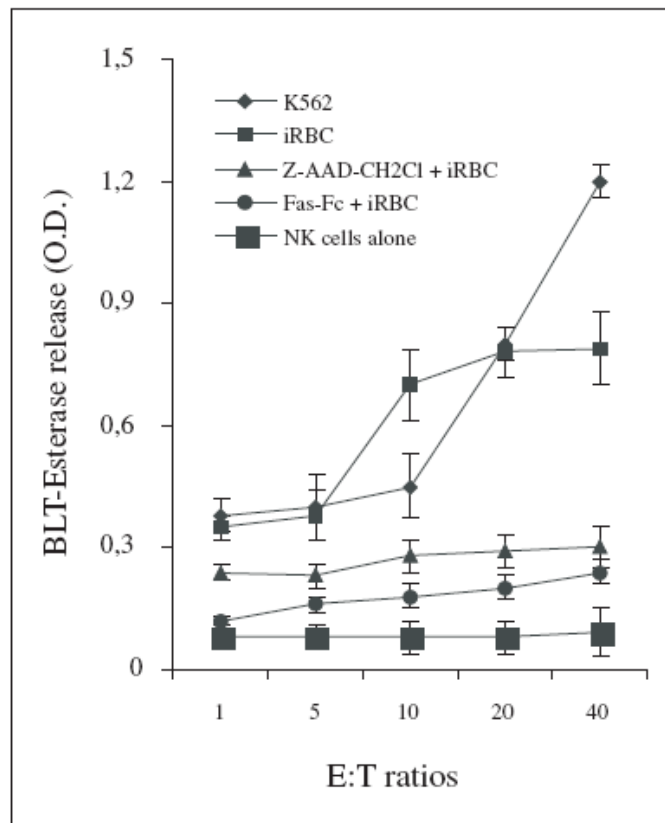


Figure 3
The release of cytolytic granules.

The release of cytolytic granules was determined in a 4-h BLT esterase release assay, performed as described in Materials and Methods. This experiment is representative of four independent experiments performed with similar results. The increases in BLT are significant between the various E:T ratios and between the various group compared to control.

La figure 3 représente la sécrétion de granules cytotoxiques.

La sécrétion de granules cytolytiques est déterminée dans des expériences de libération de BLT estérase réalisées comme décrites dans le paragraphe Matériels et Méthodes. Cette expérience est représentative de quatre expériences indépendantes réalisées dans les mêmes conditions. Les augmentations de BLT sont significatives entre les différents E:C ratios et entre les différents groupes comparés aux témoins.

3-5/ L'expression de l'antigène Fas par les globules rouges parasités par *P.falciparum*

L'antigène Fas est un membre important de la famille des récepteurs de mort [27]. La liaison de Fas avec son ligand naturel (sFasL) ou avec des anticorps agonistes, entraîne le ciblage séquentiel des caspases [28], une famille de cystéine protéases spécifique de l'aspartate dont l'activation est requise pour la propagation des événements biochimiques responsables de l'induction de la mort par apoptose [29]. Comme les résultats révèlent que l'anticorps anti-CD95 prévient l'inhibition de croissance de *P.falciparum* par les cellules NK, et que de forts taux de sFasL sont produits dans les surnageants de co-culture des cellules NK et les globules rouges parasités, l'expression de l'antigène CD95 à la surface des érythrocytes a été analysée en cytométrie en flux. Les érythrocytes parasités *in vitro* par *P.falciparum* expriment l'antigène CD95 à leur surface tel qu'observé en cytométrie en flux (résultat non présenté), et cette expression semble être fonctionnel, étant donné la capacité de CD95 à lier les anticorps *in vitro* (Table 2).

Table 2: Pourcentage de globules rouges marqués en simple ou double marquage avec l'anticorps anti-CD95 (Fas) et/ou le bromure d'éthidium (EtBr).

Table 2
Percentages of single and double staining red blood cells with CD95 and EtBr

Markers	Uninfected red blood cells		<i>P. falciparum</i> -infected red blood cells	
CD95	0.14 ± 0.01	(0.15) ^a	0.14 ± 0.03	(0.17)
EtBr ^b	0.33 ± 0.29	(0.63)	2.38 ± 1.18	(3.56)
CD95/EtBr	0.03 ± 0.02	(0.05)	1.17 ± 0.03	(1.20)
IgG1a	0.01 ± 0.00	(0.01)	0.01 ± 0.01	(0.01)
IgG2a	0.01 ± 0.00	(0.01)	0.01 ± 0.01	(0.01)

^a In parenthesis, the maximum percentage of measured responses.

^b Ethidium bromide

3-6/ Détection de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs solubles dans les surnageants de co-culture cellules NK – érythrocytes parasités par *P.falciparum*

Les surnageants de co-culture réalisées entre les cellules NK et des érythrocytes infectés par *P.falciparum* pendant 48 heures en absence de sérum immun ont été analysés. Ils contiennent des taux substantiels d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-12p40 (voir Figures 4A, 4B et 4C). Le prétraitement des cellules NK avec les anticorps monoclonaux anti-isotype (IgG2a), anti-CD56 et anti-CD95 avant la co-culture, induit une diminution de la libération de ces trois cytokines par les cellules NK. L'effet le plus marqué est obtenu lorsque les cellules NK étaient pré-incubées avec l'anti-CD95 (Figure 4A, 4B et 4C). La production de sFasL est significativement réduite seulement lorsque les cellules NK sont prétraitées avec l'anticorps anti-CD95 avant la réalisation de la co-culture (Figure 4D), alors que la production de granzyme B (GrB) est réduite à différentes concentrations avec chacun des anticorps utilisés (Figure E). Le prétraitement des cellules effectrices avec un inhibiteur de granzyme B, le Z-AAD-CH₂Cl, abolit totalement la sécrétion de GrB. L'IL-2 n'a pas été détecté dans les surnageants de culture testés.

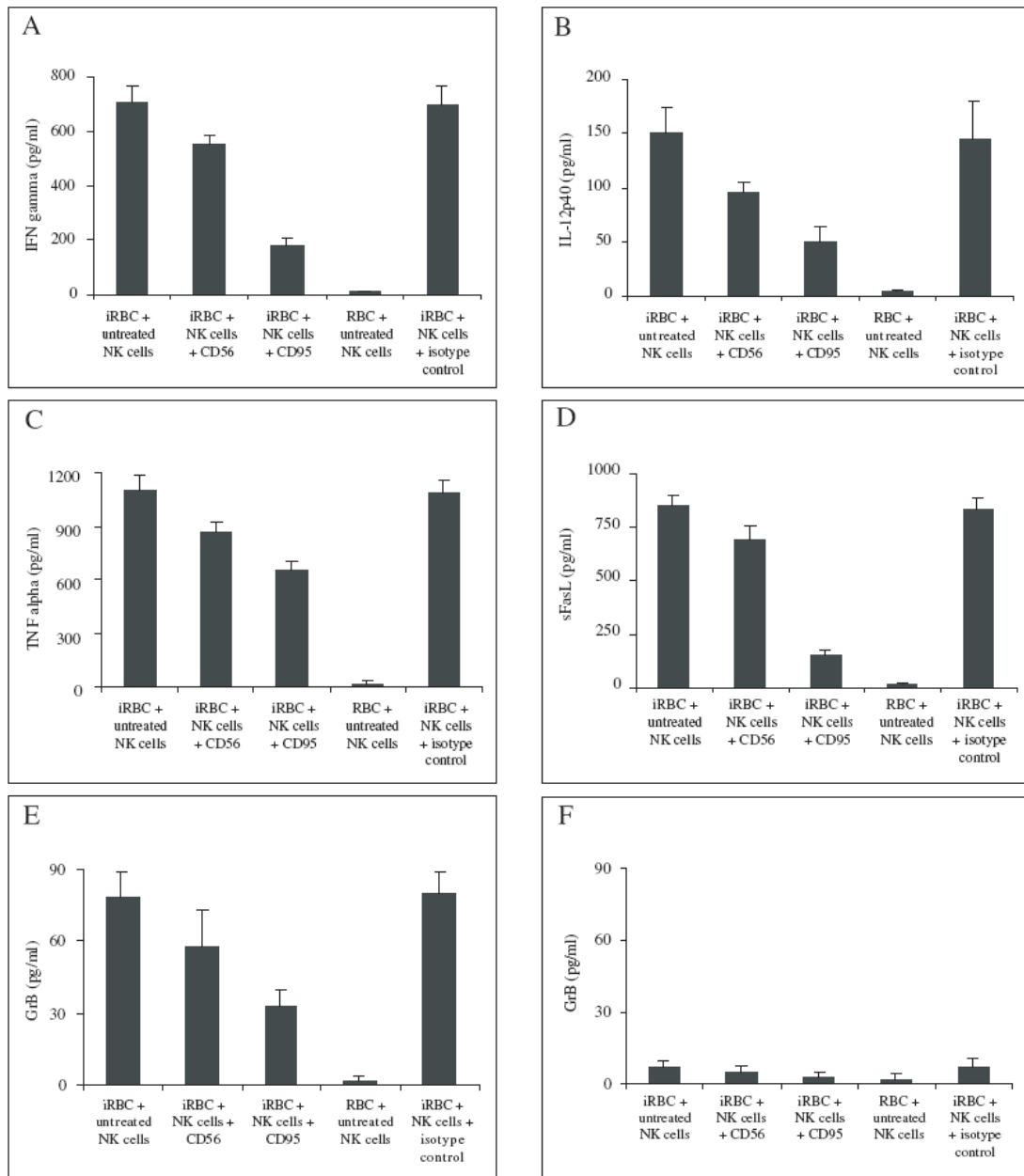


Figure 4

Cytokines, sFasL and granzyme B detection in co-culture supernatant.

Detection of (A) IFN γ , (B) IL-12p40, (C) TNF α , (D) sFasL, (E) GrB in supernatants of NK:IRBC co-cultures and (F) Inhibition of granzyme B release by prior incubation of NK cells with 100 μ M GrB inhibitor Z-AAD-CH $_2$ Cl ($p < 0.001$). Results from three donors are expressed as mean \pm SEM of triplicate wells.

La figure 4 représente la détection de cytokines pro-inflammatoires, de sFasL et de GrB dans les surnageants de co-culture.

Détection de (A) IFN- γ , (B) IL-12p40, (C) TNF- α , (D) sFasL, (E) GrB dans les surnageants de co-culture NK - globules rouges parasités et (F) inhibition de la sécrétion de GrB après incubation des cellules avec 100 μ M Z-AAD-CH₂Cl, ($p < 0,001$). Les résultats sont une moyenne obtenue à partir de 6 donneurs et sont exprimés comme moyenne \pm SEM.

4. Discussion

Les résultats des études *in vitro* présentés dans cet article définissent un mécanisme entièrement nouveau de l'inhibition de la croissance des stades sanguins asexués de *P.falciparum* catalysée par les cellules NK. Ils indiquent une implication des interactions sFasL / Fas, au niveau effecteur / cible (cellules NK:érythrocytes parasités par *P. falciparum*), aussi bien que l'activité cytotoxique de granzyme B. Le fait que ces effets d'inhibition de croissance soient observés aussi bien en présence qu'en absence d'anticorps spécifiques des antigènes parasitaires implique, que les cellules NK pourraient représenter une «arme» efficace mais non encore reconnue, de la réponse de l'immunité innée humaine contre l'infection par *P.falciparum* chez les sujets non immuns. Il est important de remarquer dans ce contexte que toutes les observations sont faites à partir d'expériences réalisées avec des cellules NK purifiées et non activées provenant de sujets sains, donneurs de sang non exposés au paludisme. L'inhibition cellulaire dépendant des anticorps et catalysée par les monocytes (ADCI) de la croissance des stades sanguins asexués *in vitro* dépend de l'opsonisation des mérozoïtes par les IgG spécifiques des antigènes parasitaires. Cette inhibition aboutit à la libération de molécules effectrices antiparasitaires [23,30]. La fixation des immunoglobulines contenues dans le sérum, aux monocytes entraîne une inhibition substantielle de la croissance des parasites. L'effet similaire observé avec les cellules NK, pourrait probablement mettre en jeu l'opsonisation et les interactions médiées par le récepteur Fc γ RIIIA (CD16). Cette observation est en accord avec le fait que la cytotoxicité dépendant d'anticorps est une voie reconnue de destruction catalysée par les cellules NK [31]. Ainsi, l'ajout de sérum immun (contenant les anticorps spécifiques anti-*P. falciparum*) aiderait à augmenter la lyse par les cellules NK des globules rouges parasités par *P.falciparum*. L'effet du prétraitement des cellules NK avec les anticorps dirigés contre les différentes molécules

de surface de ces cellules effectrices a été évalué afin de tenter de définir les mécanismes potentiellement mis en jeu dans ce processus.

Les résultats obtenus après le prétraitement des cellules NK avec l'anticorps anti-CD95, mais aussi avec la protéine soluble Fas-Fc et avec l'inhibiteur de granzyme B, ZAAD-CH₂Cl suggèrent l'existence d'un rôle potentiel à la fois de sFasL et de granzyme B. Ces deux molécules cytotoxiques entraînent la réduction de l'expression de toutes les molécules associées à une complète levée de l'inhibition de la croissance des parasites. Cependant, l'inhibition de la croissance parasitaire est également réduite après le prétraitement des cellules avec un anticorps monoclonal anti-CD56. Cet anticorps est aussi associé à une moindre induction de la sécrétion de sFasL ou de GrB comparée à la libération des granules cytotoxiques provoquée par l'anti-CD95.

Les résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal anti-CD16 pourrait résulter de l'interférence avec les contacts cellulaires effecteurs/cibles appropriés, catalysés par l'anticorps anti-CD56, bien que le contact cellulaire direct requis pour ce système reste encore à prouver [32]. L'inhibition de la croissance des parasites pourrait être maintenue via les interactions entre le CD16 et les fragments Fc des immunoglobulines, en présence, de concentrations élevées de sFasL et de granzyme B. Dans le même contexte, il se produit une libération de cytokines et cela est indiqué que les cellules NK sont fortement activées pendant la coculture avec les globules rouges parasités. Les cellules NK sont connues pour être des productrices majeures d'IFN- γ ; comme cette cytokine pro-inflammatoire agit à la fois de manière autocrine et paracrine, cela suppose que le TNF α , le sFasL et la granzyme B détectés dans les surnageants de culture seraient produits par les cellules NK en réponse à l'activation initiale par IFN- γ . Toutefois, la persistance de l'inhibition de la croissance des parasites en présence de faibles taux de IFN- γ et de TNF- α observée après prétraitement des cellules par l'anticorps, suggère que ces cytokines auraient un faible, si ce n'est aucun, effet sur la croissance des parasites dans un système de culture *in vitro*.

Les résultats présentés dans cet article révèlent de manière irréfutable, le rôle de l'activité du système sFasL/Fas dans l'interaction entre les cellules NK et les globules rouges parasités. Cela soulève la question de savoir : comment l'antigène CD95 pourrait être impliqué dans ce phénomène. Le rôle précis de l'antigène CD95 dans l'immunité contre *P.falciparum* reste à définir. L'implication de cet antigène dans les conditions physiologiques normales a été mise en évidence. En effet, il a été montré que le sérum de patients souffrant d'un paludisme aigu contient de taux élevés de sFasL [34]. La cytotoxicité des cellules NK humaines est catalysée par sFasL [35] et CD95 jouerait un rôle déterminant dans l'immuno-régulation de certains états pathologiques, spécifiquement ceux du foie et du coeur [36]. Les érythroblastes expriment des récepteurs apoptogènes tels que TNFR1, TNFR2 et Fas [37,38], et l'anticorps anti-Fas et l'anticorps anti-TNFR peuvent provoquer l'opsonisation des érythrocytes de souris, suggérant que les antigènes Fas et TNFR sont exprimés à la surface membranaire des érythrocytes.

De récentes études montrent que les érythrocytes humains matures expriment la caspase-3 et la caspase-8 [40] et peuvent initier un processus d'autodestruction rapide ayant plusieurs caractéristiques communes avec l'apoptose [31]. De plus, deux voies de signalisation de l'antigène CD95 ont été identifiées dans deux types cellulaires : les cellules de type I ont développé une voie qui s'affranchit des fonctions mitochondriales, puisqu'elles activent la caspase-8 sur le DISC suivie de la caspase-3, indépendamment de l'activité mitochondriale. Seules les cellules de type II sembleraient dépendre des mitochondries au cours de l'induction de l'apoptose [42]. Il est par conséquent raisonnable de penser que l'interaction de sFasL avec Fas à la surface des érythrocytes pourrait représenter un mécanisme possible de la cytolysse des globules rouges parasités médié par les cellules NK. Il est toutefois important de signaler que la capacité des cellules NK à détruire les érythrocytes infectés par *P.falciparum* directement, comme décrit dans cet article, est sujette encore à controverse. En effet, Coleman et ses collaborateurs [45] ont rapporté que les lymphocytes spléniques de souris avaient une activité cytotoxique contre les érythrocytes parasités par *Plasmodium berghei*. Toutefois, les expériences utilisant les cellules de la rate humaine suggèrent que les globules rouges parasités par *P.falciparum* seraient des cibles négligeables des CTL et des cellules NK [44]. À la décharge de cette dernière étude cependant, il avait été utilisé un mélange de

cellules mononuclées (PBMC), et non pas de cellules NK purifiées. Il est clair que le fait d'utiliser des PBMC entraîne une diminution considérable du rapport cellules effectrices / cellules cibles, comparé à ceux utilisés dans les cas des cellules NK purifiées. Theander et ses collaborateurs n'avaient pas observé, dans des expériences similaires, d'activité cytotoxique NK contre les érythrocytes parasités [45]. Cette absence d'activité pourrait aussi être imputée à la méthodologie utilisée par les auteurs.

En effet, pour analyser l'activité cytotoxique NK, les auteurs ont utilisé une population hétérogène (PBMC) à une concentration comprise entre 4 et 16 millions de cellules par millilitre (les cellules NK représentent de 5 à 15% de PBMC circulants). De plus, les cellules cibles utilisées par les auteurs (5×10^5 cellules/ml) étaient pré-incubées avec 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ de chrome radioactif, soit approximativement 2000 mille fois moins que la concentration généralement utilisée dans les tests conventionnels de cytotoxicité au chrome radioactif ; cela pourrait expliquer le faible taux de ^{51}Cr incorporé et donc relargué. Les tests conventionnels nécessitent d'incuber les cellules cibles avec de 100 à 300 μCi de chrome radioactif [46]. D'autres auteurs encore ont montré que des cellules $\text{CD3}^- \text{CD16}^+$ (le profil antigénique des cellules NK) développent une activité lytique contre les schizontes et que la cytotoxicité des cellules $\text{CD3}^- \text{CD16}^+$ est augmentée par le traitement des cellules avec l'IFN- γ et/ou l'IL-12 [47] en accord avec les résultats présentés dans le présent article. De plus la coculture cellules NK / globules rouges parasités entraîne une augmentation du taux de BLT estérase, une protéase dont l'activité est préférentiellement catalysée par les granzymes [48]. La BLT estérase et la granzyme A peuvent induire la destruction des composants de la matrice cellulaire [49]. Ainsi, il semble raisonnable de proposer que l'activité des cellules NK induite par les globules rouges parasités entraîne la libération de granules protéasiques et aussi, que cela pourrait avoir des effets cytotoxiques pour les cellules voisines. L'identification de ces substrats par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou des anticorps monoclonaux neutralisants, est à présent nécessaire pour déterminer le rôle précis des sérines protéases dans la pathologie des cellules NK au cours de l'infection par *P.falciparum*.

En résumé, les résultats présentés ci-dessus établissent l'implication des cellules NK dans la cytolysse des érythrocytes parasités par *P.falciparum* et indiquent que ce mécanisme mettrait en jeu, au moins en partie, sFasL et granzyme B. Les résultats ayant la plus grande relevance avec les conditions physiologiques *in vivo*, sont ceux obtenus en présence de sérum immun. La capacité des cellules NK à interagir avec les anticorps maternels transférés au travers de la barrière transplacentaire pourrait représenter une importante ligne de défense pour les nouveaux nés. C'est un des aspects qui est actuellement exploré dans le domaine de la recherche. Les études utilisant les modèles murins soutiennent fortement l'idée que les cellules NK contribueraient à la réponse immune protectrice contre les plasmodies. Le travail en cours dans différents groupes de recherche tente d'explorer plus en profondeur, les réponses des cellules NK à la fois chez les sujets non exposés et, durant et après les infections naturelles à *P.falciparum* dans les populations exposées des zones endémiques tropicales.

Références bibliographiques

1. Kos FJ. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. *Immunol Res.* 17: 303, 1998.
2. Yokoyama WM. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol.* 10:298, 1998.
3. Moretta A, Bottino C, Millo R, & Biassoni R. HLA-specific and non HLA-specific human NK receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 244: 69, 1999.
4. Colonna M, Navarro F, & Lopez-Bottet M. A novel family of inhibitory receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 244:115, 1999.
5. Ugolini S & Vivier E. Regulation of T-cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol.* 12:295, 2000.
6. Trinchieri G, & Santoli D. Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by

- interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J Exp Med.* 147: 1314, 1978.
7. Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Seerha J, London L, & Perussa B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2. *J Exp Med.* 1984, 160: 1147, 1984.
 8. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, & Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biology effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 170: 827, 1989.
 9. Scott P & Trinchieri G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol.* 7:34, 1995.
 10. Biron CA, Su HC, & Orange JS. Function and regulation of natural killer cells during viral infections: characterization of responses *in vivo*. *Methods.* 9:379, 1996.
 11. Orange JS & Biron CA. An absolute and restricted requirement for interleukin-12 in natural killer (NK) cell interferon- γ production and antiviral defence. Studies of NK and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol.* 156: 1138, 1996.
 12. Kägi D, Vignaux F, Lederman B, Burki K, de Praetere V, Nagata S, Hengartner H, & Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265: 528, 1994.
 13. Smyth MJ, & Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today.* 16: 202, 1995.
 14. Sayers TJ, Brooks AD, War JM, Ward JM, Hoshimo T, Bere WE, Wiegand GW, lymphocytes. *J Immunol.* 166: 765, 2001.
 15. Artavanis-Tsakonas K, & Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes. *J Immunol.* 169: 2956, 2002.
 16. Trager W & Jansen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193: 673, 1976.

17. Lambros C & Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 65: 418, 1979.
18. Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, & Cassiman J-J. Detection of bacterial and mycoplasma contamination in cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Letters.* 99:89,1992.
19. Geiselhart A, Neu S, Buchholz F, Lang P, Niethammer D, & Handgretinger R. Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Nat. Immun.* 15: 227, 1996.
20. Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, Hermann SH, & Ritz J. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* 175:779, 1992.
21. Bouharoun-Tayoun H, Attanhth P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, & Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 172: 1633, 1990.
22. Binh VQ, Luty AJF & Kremsner, P.G. Differential effects of human serum and cells on the growth of *Plasmodium falciparum* adapted to serum-free in vitro culture conditions. *Am J Trop Med Hyg.* 57: 594, 1997.
23. Tebo, AE, Kremsner PG, & Luty AJF. *Plasmodium falciparum*: a major role for IgG3 in antibody- dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth in vitro. *Exp Parasitol.* 98: 20, 2001.
24. Sylla EH, Kun JF, & Kremsner PG. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans Roy Trop Med Hyg.* 94: 652, 2000.
25. Lozzio CB, & Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukaemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45: 321, 1975.
26. Sayers TJ, Wiltrout TA, Sowder R, Munger WL, Smyth MJ, & Henderson LE. Purification of a factor from the granules of a rat natural killer cell line (RNK) that reduces tumor cell

- growth and changes tumor morphology. Molecular identity with a granule serine protease (RNKP-1). *J Immunol.* 148: 292, 1992.
27. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355, 1997.
 28. Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, & Yuang J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171, 1996.
 29. De Maria R, Boirivant M, Cifone MG, Roncaioli P, Hahne M, Tschopp J, Pallone F, Santoni A, & Testi R. Functional expression of Fas and Fas ligand on human gut lamina propria lymphocytes. A potential role for the acidic sphingomyelinase pathway in normal immunoregulation. *J Clin Invest.* 97 : 316, 1996.
 30. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, & Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 182: 409, 1995.
 31. Trinchieri G, & Valiante, N. Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun.* 12: 218, 1993.
 32. Nitta T, Yagita H, Sato K, & Okumura K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural-killer-target-cell interaction. *J Exp Med.* 170: 1757, 1989.
 33. Hunter CA, Gabriel KE, Radzanowski T, Neyer LE, & Remington JS. Type I interferons enhance production of IFN-gamma by NK cells. *Immunol. Lett.* 59: 1, 1997.
 34. Kern P, Dietrich M, Hemmer C, & Wellinghausen N. Increased levels of soluble Fas Ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.* 68:3061, 2000.
 35. Berke G. The Fas-based mechanism of lymphocytotoxicity. *Hum. Immunol.* 54: 1, 1997.
 36. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, & Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol.* 1996, 157: 2909, 1996.
 37. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 401: 489, 1999.

38. De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Iccioni R, Felli N, Samoggia P, & Pschle C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 93: 796, 1999.
39. Saxena RK & Chandrasekhar B. A novel nonphagocytic mechanism of erythrocyte destruction involving direct cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Haematol.* 71: 227, 2000.
40. Berg CP, Engels ICH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulz-Osthoff K, & Wesselborg. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.* 8: 1197, 2001.
41. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoud, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, & Amheisen JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001, 8: 1143, 2001.
42. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, & Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 types I and type II cells. *J. Biol. Chem.* 274: 22532, 1999.
43. Coleman RM, Rencricca NJ, Stout JP, Brissette WH, & Smith DM. Splenic mediated erythrocyte cytotoxicity in malaria. *Immunology* 1975, 29, 49.
44. Saxena QB, Biswas S, & Sharma VP. Interaction of human natural killer cells with cells with *Plasmodium falciparum* erythrocytes. *Exp Parasitol.* 69: 300, 1989.
45. Theander TG, Andersen BJ, Pedersen BK, et al. Cell-mediated immunity to *Plasmodium falciparum* infection: Evidence against the involvement of cytotoxic lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 28 : 105, 1988.
46. Frey JL, Bino T, Kantor RR, et al. Mechanism of target cell recognition by natural killer cells characterization of a novel triggering molecule restricted to CD3-large granular lymphocytes. *J. Exp. Med.* 174: 1527, 1991.
47. Orago AS & Facer CA. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin Exp Immunol.* 86: 22, 1991.

48. Ebenet K, Hausmann M, Lehmann-Grube F, et al. Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *Embo J.* 14:4230, 1995.
49. Simon MM, Fruth U, Simon HG, & Kramer MD. Evidence for involvement of a T-cell-associated serine protease (TSP-1) in cell killing. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 138: 309, 1987.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.