

## VI

### ***Diminution de la cytotoxicité NK contre les globules rouges parasités par Plasmodium falciparum au cours des premières grossesses***

Elie Mavoungou  
Professeur d'Immunologie

*In Clinical Infectious Diseases vol. 38, N°3, pp. 342-347, 2004.*

#### **Résumé**

L'activité cytotoxique des cellules NK ainsi que le taux de cortisol et de prolactine ont été mesurés dans des échantillons du sang périphérique de femmes Gabonaises à l'accouchement. La cytotoxicité médiée par les cellules NK des cellules provenant des primipares, et dirigée contre les globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum in vitro* est plus faible que celle des cellules NK isolées du sang des multipares. Les concentrations de cortisol sont significativement plus fortes chez les primipares que chez les multipares et les concentrations de prolactine sont significativement plus faibles. Les plus fortes concentrations de cortisol ont été détectées dans le plasma des femmes primipares infectées par *P.falciparum*. Il existe une corrélation positive entre la concentration de cortisol et la charge parasitaire ; une corrélation inverse a été trouvée entre l'amplitude de l'effet cytotoxique NK dirigée contre les globules rouges parasités et le taux de cortisol. Une corrélation positive a été observée entre cet effet et la production de prolactine. Ainsi donc, la diminution de l'activité cytotoxique NK dirigée contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* serait corrélée aux fortes concentrations de cortisol et pourrait contribuer à l'augmentation de la sensibilité au paludisme chez la femme au cours de la grossesse.

## **1. Introduction**

Le paludisme au cours de la grossesse est une importante cause de la mortalité et de la morbidité maternelles. Les populations qui vivent dans les régions où le paludisme est endémique et où la transmission du parasite responsable, *Plasmodium* spp. est stable et pérenne, développent généralement une semi immunité protectrice, encore dénommée *la prémunition*, contre les formes graves de la maladie et contre de fortes parasitémies. Toutefois, cette « prémunition » semble être inefficace au cours de la grossesse [1]. Les femmes ayant une première ou une deuxième grossesse sont les plus sensibles aux infections par *Plasmodium falciparum* [2]. Les mécanismes responsables de cette augmentation de la sensibilité au paludisme chez la femme enceinte et particulièrement au cours de la première grossesse n'ont pas encore été élucidés. Les mécanismes de l'immunité à médiation cellulaire sont considérés comme étant très importants dans le développement et le maintien de l'immunité contre le paludisme et pourraient, au moins partiellement, expliquer la sensibilité des femmes enceintes au paludisme. Il y a des preuves convaincantes suggérant l'existence de communication bilatérale entre les hormones neuroendocrines et le système immunitaire. Les glucocorticoïdes et la prolactine sont des hormones impliquées dans l'immunoregulation, et le cortisol diminue l'activité immune ; la prolactine semble au contraire stimuler le système immunitaire [3,4]. Les cellules natural killer (ou cellules NK) sont des cellules effectrices clés du système de l'immunité innée et sont à ce titre essentielles au maintien de la grossesse [5,6]. Une faible activité cytotoxique NK est généralement associée à une augmentation de la sensibilité aux infections chez les humains [7,8]. Cette activité est partiellement inhibée par les glucocorticoïdes endogènes [9,10]. De plus, il existe une relation entre les concentrations sanguines de cortisol et la suppression de l'immunité anti palustre au cours de la grossesse. Dans le présent article est rapportée, la relation entre l'activité cytotoxique des cellules NK dirigée contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* et les concentrations sanguines de cortisol et de prolactine dans une population de femmes enceintes vivant au Gabon, où le paludisme est endémique.

## **2. Le matériel et les méthodes utilisés**

### **2-1/ Le site et les participants à l'étude.**

L'étude dont les résultats sont présentés dans cet article a été réalisée à Libreville et à Lambaréné, deux villes du Gabon où le paludisme à *P.falciparum* est hyper endémique, avec un mode de transmission continue et stable. Le taux d'inoculation entomologique mesuré à Lambaréné est d'environ 50 piqûres infectantes par personnes et par an [12], et le principal vecteurs sont *Anophèles gambiae* et *A. moucheti*. Cent une (101) femmes enceintes (quarante (40) primipares et soixante et un (61) multipares) étaient recrutées du 1<sup>er</sup> au 30 septembre 2002 au moment de leur accouchement au centre hospitalier de Libreville et à l'hôpital Albert Schweitzer de Lambaréné. Tous les accouchements enregistrés pour cette étude ont eu lieu entre 18 heures et minuit. Le groupe témoin de l'étude était constitué de trente (30) femmes en bonne santé et non enceintes vivant dans le même milieu et ayant le même âge que les femmes enceintes. Un consentement éclairé était nécessaire à la participation à cette étude pour des raisons éthiques et toutes les femmes incluses dans l'étude avaient donné leur consentement. L'étude était également soumise pour évaluation au comité d'éthique de la Fondation Internationale Albert Schweitzer qui avait donné un avis favorable. Cette étude était en outre exécutée en accord avec les directives de l'expérimentation en recherche clinique du ministère gabonais de la santé publique et de la population.

### **2-2/ L'obtention d'échantillons de plasma**

Les échantillons de sang veineux maternel étaient obtenus à l'accouchement dans des tubes héparinés stériles. Douze (12) millilitres (ml) de sang étaient prélevés à chaque fois. De ces 12 ml, 2ml étaient utilisés pour le recueil du plasma ; ils étaient immédiatement centrifugés pendant 10 minutes à 400 g à l'aide d'une centrifugeuse Biofuge Pico (Heraeus Instruments) pour séparer le culot contenant les érythrocytes du plasma. Tous les échantillons de plasma étaient ensuite congelés à -80°C et conservés jusqu'au moment de leur utilisation pour les tests biochimiques.

### **2-3/ Diagnostic du paludisme.**

Les gouttes épaisses et les frottis du sang périphérique étaient colorés au Giemsa puis analysés par deux microscopistes expérimentés selon les standards des procédures de contrôle de qualité. La charge parasitaire est exprimée comme le nombre de *P.falciparum* au stade de développement asexué par millilitre de sang. Toutes les femmes infectées par *P.falciparum* avaient été traitées à la quinine.

### **2-4/ Dosage endocrine.**

Les concentrations plasmatiques de cortisol et de prolactine étaient estimées en utilisant le système Mini Vidas V.B 02.96 et les kits standard Vidas de cortisol et de prolactine commercialisés par les laboratoires Bio Mérieux.

### **2-5/ Isolement des cellules effectrices.**

Les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMCs) étaient fractionnées sur un gradient de Ficoll (Pharmacia) puis séparées par centrifugation en gradient de densité (400 g) pendant 30 minutes à 4°C. les PBMCs étaient lavées deux fois avec du tampon PBS dépourvu de calcium de magnésium (Gibco-BRL) et congelées jusqu'à leur utilisation pour les tests immunologiques. Au moment de réaliser les expériences, les cellules sont décongelées puis resuspendues dans du milieu de culture RPMI-1640 (Sigma) contenant de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) et 10% de sérum de veau fœtal (Gibco-BRL). La viabilité des cellules déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan était toujours supérieure à 98%. Les cellules NK isolées par sélection positive en utilisant des colonnes de séparation MACS (Miltenyi Biotec) contenant 20 µl de billes magnétiques coatées avec un anticorps anti-CD56 (clone AF12-7H3.6.11, isotype : IgG1 de souris ; Miltenyi Biotec) selon les instructions du fabricant.

Les cellules obtenues par sélection positive étaient ensuite marquées par l'anticorps anti-CD56 (clone B159 ; Pharmingen) couplé à la phycoérythrine (PE) et un anticorps anti-CD16 (clone 3G8 ; Pharmingen), couplé à la fluorescéine (FITC), puis analysées au cytomètre en flux afin de déterminer leur pureté. Les isotypes contrôles utilisés étaient le mélange IgG1-FITC/IgG2a-PE de TAG (clone MOPC-21/UPC-10 ; Sigma). L'analyse des cellules CD56+/CD16+ par le logiciel Facstar a révélé que les cellules NK obtenues de cette façon avaient une pureté supérieure à 98%.

## **2-6/ Les cellules cibles.**

L'activité cytotoxique des cellules NK était testée en utilisant des globules rouges hétérologues parasités par *P. falciparum* (pRBCs). La lignée cellulaire tumorale myéloïde K562 était utilisée comme témoin positif de la réaction et les globules non infectés étaient les témoins négatifs. La lignée cellulaire était maintenue en culture continue dans des boîtes (Polylabo) pendant toute la durée de l'étude dans du milieu de culture complet composé de RPMI-1640 (Sigma), 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100 µg/ml de streptomycine, 100 U/ml de pénicilline et 5 µg/ml de pyruvate de sodium (Gibco-BRL). Le milieu de culture était changé tous les deux jours. Une souche locale de *P.falciparum* dénommée S007 a été utilisée. Les parasites ont été entretenue en culture selon la technique décrite par Trager et Jensen [13], avec des globules rouges de donneurs de groupe sanguin O+ fraîchement préparés dans du milieu de culture composé de RPMI-1640 (Sigma), 25 µg/ml de gentamycine (Gibco-BRL), 5,94 g/l de tampon HEPES (Seromed), et 2,33 g/l de NaHCO<sub>3</sub>, complété avec 0,5% d'Albumax II (Gibco-BRL) et 0,006% d'hypoxanthine (Sigma) en atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>, 5% d'O<sub>2</sub> et 90% de N<sub>2</sub>. Le milieu de culture ne contenant pas d'endotoxine et était changé tous les jours. Les schizontes étaient obtenus par séparation sur des colonnes superMacs (Miltenyi Biotec) et étaient utilisés directement dans les expériences de cytotoxicité. Les cultures de *P.falciparum* étaient testées en routine pour d'éventuelles contaminations par des Mycoplasmes par la technique de PCR. Les globules rouges non parasités provenaient de femmes non immunes.

## **2-7/ L'expérience de cytotoxicité.**

L'activité cytolytique NK était mesurée par la technique de libération de chrome ( $^{51}\text{Cr}$ ) radioactif comme décrite antérieurement [14]. Après une pré culture des cellules de 16 heures (généralement réalisée toute une nuit) dans un incubateur à 37°C sans aucune stimulation, un million ( $10^6$ ) de cellules NK sont resuspendues dans 300 microlitres de milieu complet. Les cellules cibles, K562, pRBCs et uRBCs étaient incubées avec 100 microcuries de chrome ( $\text{Na}_2 [^{51}\text{Cr}]\text{-O}_4$ ; Amersham) pendant 1 heure à 37°C. Les cellules cibles étaient ensuite lavées trois fois puis, environ 5000 cellules étaient placées dans des puits en U des plaques ELISA (Costar) contenant chacun une concentration croissante du nombre de cellules NK. Les rapports effecteur/cible de 50 :1 et 1 :1 étaient testés en triplicat. Les cellules effectrices et les cellules cibles étaient co-incubées à 37°C pendant 16 heures. Le volume final était de 200 microlitres par puits. Les plaques sont ensuite centrifugées et le surnageant (100 microlitres) de chaque puits est collecté et directement placé dans un compteur gamma (Cobra Auto Gamma ; Packard Cambera) afin de déterminer le taux d'incorporation de la radioactivité. La libération maximale de chrome était déterminée en ajoutant 1% de SDS (Sigma). La libération spontanée était déterminée en incubant les cellules cibles avec le milieu de culture seul. La libération spontanée ne dépassait jamais 20% de la libération maximale. Le pourcentage de la cytotoxicité spécifique était calculée comme suit : Pourcentage spécifique =  $[(\text{cpm. Exp.} - \text{cpm Spont.})/(\text{cpm Max.} - \text{cpm Spont.})] \times 100$ .

## **2-8/ L'analyse statistique.**

Les corrélations entre les variables continues étaient évaluées par le test de Spearman rank corrigé dans lequel une valeur de rho inférieure à 0.25 (combinée à un  $P < 0,05$ ) était considérée comme significatif. Le test de Chi carré était utilisé pour la comparaison des proportions. Le test non paramétrique de Wilcoxon était utilisé pour l'évaluation de la significativité des différences entre les paires de variables continues, par ailleurs, le test de Mann Whitney U (pour les comparaisons de 2 groupes) et le test de Kruskal Wallis (pour les comparaisons de plus de 2 groupes) étaient utilisés pour l'évaluation de la

significativité des différences entre les variables continues non pariés. Le test *t* a été utilisé pour la comparaison des âges. Les valeurs de *P* inférieures à 0,5 étaient considérées comme significatives.

### **3. Résultats**

#### **3-1/ Les caractéristiques des participants de l'étude.**

La moyenne d'âge des femmes incluses dans cette étude est de 22 ans et est significativement différente entre les femmes enceintes et les femmes non enceintes. Les primipares étaient significativement plus jeunes que les multipares (18 ans contre 26 ;  $P=0,001$ ). Le nombre moyen de grossesses précédentes était de 3 dans le groupe des multipares. L'activité cytotoxique NK était évaluée chez 17 femmes (5 primipares, 9 multipares à terme et 3 femmes contrôles). Il n'y avait pas de différence dans la distribution des variables étudiées entre ce groupe et l'ensemble de la population étudiée.

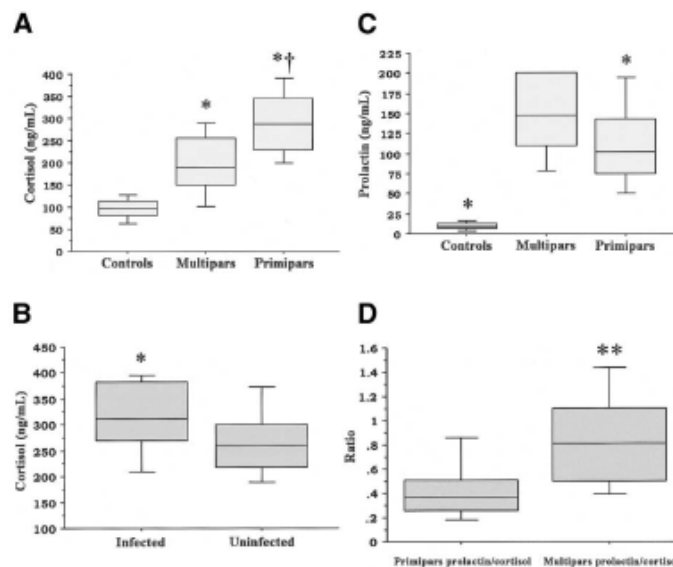
#### **3-2/ L'état infectieux.**

*P.falciparum* était détecté dans le sang périphérique de 24 femmes (24%). Les primipares étaient significativement plus sensibles à l'infection que les multipares (18 femmes [45%] contre 6 [10%], respectivement ;  $P<0,001$ ). La médiane du nombre de parasites par microlitre de sang était aussi significativement plus élevée chez les primipares que chez les multipares (2320 parasite/l) que chez les multipares (300 parasites/l ;  $P=0,010$ ) et n'était pas associée avec l'âge.

#### **3-3/ Le cortisol.**

Les concentrations plasmatiques de cortisol étaient dans les valeurs attendues pour les grossesses à terme (i.e., 3 à 7 fois le taux normal) [15]. Les concentrations de cortisol étaient significativement plus fortes chez les femmes enceintes, multipares et primipares que chez les femmes contrôles, non enceintes ( $P < 0,001$ ) (Figure 1A). Les concentrations plasmatiques de cortisol étaient aussi plus fortes chez les primipares que chez les multipares ( $P = 0,001$ ) (Figure 1A). Parmi les primipares, le plasma des femmes infectées par *P.falciparum* contenait beaucoup plus de cortisol que celui des femmes non infectées ( $P = 0,030$ ) (Figure 1B), et les concentrations de cortisol étaient significativement corrélées à la charge parasitaire ( $\rho = 0,36$  ;  $P = 0,027$ ).

**Figure 1**



**Figure 1.** Box plot of plasma cortisol and prolactin concentrations. **A.** Comparison of cortisol concentrations between primiparous women (median, 287.2 ng/mL; range, 230–346 ng/mL), multiparous women (median, 187 ng/mL; range, 149.2–256.8 ng/mL), and nonpregnant women (median, 95.9 ng/mL; range, 81.3–115 ng/mL). \* $P < .001$  for comparison with controls; † $P = .001$  for comparison with multiparous woman. **B.** Comparison of cortisol concentrations between *P. falciparum*-infected primiparous women (median, 310.1 ng/mL; range, 240–358.6 ng/mL) and uninfected primiparous women (median, 252.6 ng/mL; range, 221.7–301.3 ng/mL). \* $P = .030$  for comparison with uninfected primiparous women. **C.** Comparison of prolactin concentrations between primiparous women (median, 102 ng/mL; range, 74.4–140 ng/mL), multiparous women (median, 148.6 ng/mL; range, 109.6–200 ng/mL), and nonpregnant women (median, 8.8 ng/mL; range, 6.7–13.3 ng/mL). \* $P = .001$  for comparison with multiparous women. **D.** Comparison of ratios of prolactin level to cortisol level between primiparous women and multiparous women. \*\* $P = .001$  for comparison with ratio of primiparous women. Box plots illustrate medians with 25th–75th percentiles, with lines extending to 10th and 90th percentiles.

La figure 1 représente les diagrammes de concentration de cortisol et de prolactine. **A**, la comparaison des concentrations de cortisol entre les primipares (médiane, 287,2 ng/ml, intervalle ; 230-346 ng/ml), les multipares (médiane, 187 ng/ml, intervalle ; 149,2 -256,8 ng/ml), et les femmes non enceintes (médiane, 95,9 ng/ml, intervalle ; 81,3-115 ng/ml). \* $P < 0,001$  pour la comparaison avec les contrôles,  $P = 0,001$  pour la comparaison avec les multipares. **B**, Comparaison des concentrations de cortisol entre les primipares infectées par *P.falciparum* (médiane, 310,1 ng/ml, intervalle 240-358,6 ng/ml) et les primipares non infectées (médiane, 252, 6 ng/ml, intervalle 221,7-301,3 ng/ml). \* $P = 0,03$  pour la comparaison avec les femmes primipares non infectées. **C**, Comparaison de la concentration de prolactine entre les primipares (médiane, 102 ng/ml, intervalle 74,4-140 ng/ml), les multipares (médiane, 148,6 ng/ml, intervalle 109,6-200 ng/ml), et les femmes non enceintes (médiane, 8,8 ng/ml, intervalle 6,7-13,3 ng/ml). \* $P = 0,01$  pour la comparaison avec les multipares. **D**, Comparaison des rapports des taux de prolactine et de cortisol entre les primipares et les multipares. \*\* $P = 0,001$  pour la comparaison avec les rapports des primipares. Les diagrammes représentent les médianes avec les 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles avec des extensions au 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles.

### **3-4/ La prolactine.**

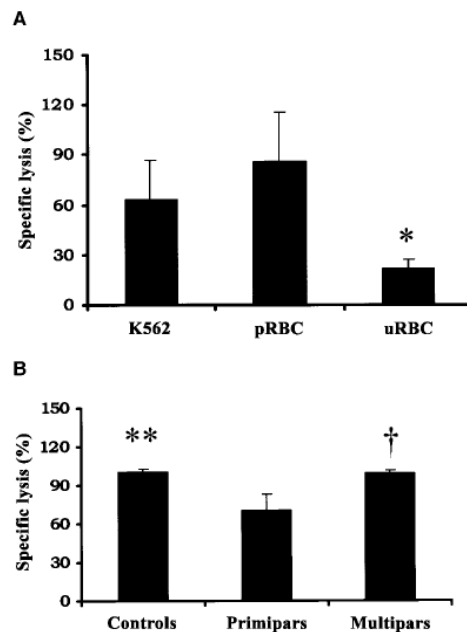
Les concentrations plasmatiques de prolactine étaient significativement plus faibles chez les sujets contrôles et chez les primipares que chez les multipares ( $P = 0,001$ ) (Figure 1C). Le rapport entre la prolactine et le cortisol était plus grand chez les multipares que chez les primipares ( $P = 0,001$ ) (Figure 1D). Les concentrations plasmatiques de prolactine des primipares infectées par *P.falciparum* étaient similaires à celles des primipares non infectées.

### **3-5/ L'activité cytolytique NK.**

L'activité cytolytique NK a été évaluée en utilisant des globules rouges parasités par *P.falciparum* (pRBCs), des globules rouges non parasités (uRBCs) (contrôles négatifs) et

la lignée cellulaire érythroleucémique K562 (contrôles positifs) comme cibles (Figure 2A). L'activité cytolytique NK sur les pRBCs était spécifique et dépendant de la densité des cellules effectrices (qui était de 50 :1, 25 :1, 10 :1, 5 :1 et 1 :1). A 25 :1, les cellules K562 et les pRBCs étaient spécifiquement lysées par les cellules NK avec la même efficacité (moyenne  $\pm$  SD, 63%  $\pm$  23% et 89%  $\pm$  29% respectivement. Toutefois, la lyse des uRBCs était non spécifique (moyenne  $\pm$  SD, 21%  $\pm$  6% ; Figure 2A). L'activité cytolytiques des cellules NK des contrôles et celles des primipares et multipares a ensuite été évaluée sur la lyse des pRBCs (Figure 2B). La cytotoxicité NK était plus faible chez les primipares que chez les sujets contrôles ( $P = 0,002$ ) ou chez les multipares ( $P = 0,004$ ) mais celle-ci était plus faible chez les primipares que chez les contrôles.

**Figure 2**



**Figure 2.** Cytolytic activity of natural killer (NK) cells. *A*, NK cell-mediated cytotoxicity of K562, *Plasmodium falciparum*-parasitized heterologous RBCs (pRBC), and uninfected RBCs (uRBC). \* $P < .05$  for comparison with either pRBCs or K562. *B*, Comparison of ex vivo NK cell cytotoxicity from primiparous women, multiparous women, and nonpregnant women against *P. falciparum*-infected erythrocytes. \*\* $P = .002$  for comparison with NK cells from nonpregnant women; † $P = .004$  for comparison with NK cells from multiparous women. Results are expressed as means of absolute values  $\pm$  SD of 17 individual experiments at an effector/target ratio of 25:1.

La figure 2 représente l'activité cytolytique des cellules NK. A, la cytolysse des cellules K562, des pRBCs et des uRBCs.  $*P < 0,05$  pour la comparaison avec les pRBCs ou avec les uRBCs. B, comparaison de la cytotoxicité NK ex vivo des cellules de primipares, de multipares et de femmes non enceintes contre les globules rouges parasités par *P.falciparum*,  $**P = 0,002$  pour la comparaison avec les cellules NK de femmes non enceintes,  $P = 0,004$  pour la comparaison avec les cellules NK des femmes multipares. Les résultats sont exprimés en moyenne des valeurs absolues  $\pm$  SD de 17 expériences au rapport effecteur/cible de 25 :1.

### **3-6/ Corrélation entre les concentrations d'hormones et l'activité cytotoxique des cellules NK.**

Une corrélation inverse significative a été trouvée entre l'activité NK contre les érythrocytes parasités par *P.falciparum* et les concentrations de cortisol ( $\rho = -0,86$  ;  $P = 0,006$ ). Une corrélation positive significative a été trouvée entre les concentrations de prolactine et l'activité cytolytique spécifique ( $\rho = 0,84$  ;  $P = 0,008$ ).

## **4. Discussion**

Les mécanismes responsables de l'augmentation de la sensibilité au paludisme durant les premières grossesses, n'ont pas encore été élucidés, et plusieurs théories ont été à ce jour suggérées. Les réponses immunes cellulaires dirigées contre les antigènes de *P.falciparum* sont amoindries chez la femme enceinte, en comparaison à la femme non enceinte [16,17]. Les anticorps anti-adhésion dirigés contre les parasites se liant à la chondroïtine sulfate A seraient associés à la protection de la mère contre le paludisme, et ces anticorps se développeraient au cours des grossesses successives, participant à l'augmentation de la sensibilité des primipares à l'infection palustre [18-20]. Nous avons récemment remarqué que le paludisme est plus fréquent chez les femmes enceintes que chez les femmes non enceintes au Gabon [21]. De plus, il est connu que les cellules NK catalysent la cytolysse des globules rouges parasités par *P.falciparum* [14,22]. Des études réalisées sur le modèle animal du paludisme ont permis de soutenir l'idée que les cellules

NK contribueraient à la protection immune contre les plasmodies [23-25]. Dans la présente étude, nous avons évalué les concentrations plasmatiques de deux hormones immuno régulatrices (Cortisol et prolactine), ainsi que l'effet de l'activité cytolytique NK contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* chez des femmes enceintes Gabonaises. Nous avons trouvé que les concentrations de prolactine étaient significativement plus élevées chez les multipares que chez les primipares, alors que les concentrations de cortisol étaient plus élevées chez les primipares et significativement plus faibles chez les multipares. Une corrélation était observée entre les concentrations de cortisol et l'infection par *P.falciparum*. Les multipares présentaient une plus forte activité cytolytique NK contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* comparées aux primipares. Cette activité cytolytique était inversement corrélée au taux de cortisol et positivement corrélée à celui de prolactine.

L'immunosuppression non spécifique pourrait être causée par la présence d'hormones associées à la grossesse. Il avait été proposé que de faibles taux d'hormones immunosuppressives [26] et de forts taux d'anticorps anti-paludisme [27] chez les multipares fussent associés à la protection, cependant, les preuves tangibles pour soutenir cette affirmation font défaut. Les corticostéroïdes suppriment l'immunité à médiation cellulaire, et les concentrations de corticostéroïdes sont substantiellement augmentées durant le troisième trimestre de la grossesse. Elles sont aussi augmentées chez les primipares et chez les femmes infectées par *P.falciparum* comparées aux autres femmes [15] en accord avec nos résultats. La prolactine stimule le système immunitaire en agissant comme un facteur de croissance et comme une cytokine activatrice via des mécanismes, autocrines, paracrines et endocrines [3]. De plus, la prolactine est localement sécrétée par les cellules immunes, et sa production par la glande pituitaire est partiellement contrôlée par les cytokines pro-inflammatoires [28]. L'augmentation du taux de prolactine est observée au cours de la grossesse à partir du second trimestre jusqu'à la période post-partum [29,30]. De façon intéressante, les plus fortes concentrations de prolactine ont été retrouvées chez les multipares qui sont les moins sensibles des femmes enceintes au paludisme.

Les cellules NK peuvent détruire directement les globules rouges infectés par *P.falciparum* [14,22]. Comme espéré, le pourcentage de pRBCs était significativement

plus élevé que le pourcentage des uRBCs ; ce pourcentage était similaire à celui de la lyse des K562. L'activité cytotoxique NK diminue significativement au cours de la grossesse ; Une activité cytolytique défectueuse avait aussi été observée chez la femme enceinte par Baines et ses collaborateurs [31], ainsi que par Goldsobel et ses collaborateurs [32]. Toutefois, à notre connaissance c'est la première fois que la cytotoxicité NK a été comparée chez les primipares et les multipares. L'effet cytolytique NK était significativement basse chez les primipares que chez les multipares. De plus, une faible activité cytotoxique NK était corrélée à de fortes concentrations de cortisol. Des études ont trouvé que le cortisol exogène supprime la cytotoxicité des cellules NK [33], et que des concentrations sub-physiologiques de cortisol induisait une inactivation fonctionnelle directe des cellules NK [10,34]. Ainsi, il semble raisonnable de proposer que la différence de l'activité cytotoxique contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* observée entre les primipares et les multipares pourrait être partiellement expliquée par la différence de la concentration en cortisol trouvée dans ces deux groupes de femmes enceintes.

Il avait été montré que les cellules NK contribuent à la résistance contre le paludisme aussi bien au stade de développement pré-érythrocytaire du parasite [35], qu'au stade érythrocytaire [24], par la destruction des cellules parasitées. L'absence de cellules NK dans les tissus intervillositaires est associée à une forte sensibilité au paludisme placentaire [36]. Le mécanisme par lequel les cellules NK combattent l'infection demeure non encore bien compris, mais on pense que l'IFN- $\gamma$  pourrait être impliqué. L'induction des cellules NK par les érythrocytes parasités à produire de l'IFN- $\gamma$  a été récemment reconnue comme mécanisme effecteur antiparasitaire [38]. Dans notre précédent travail [14], nous avons proposé un mécanisme alternatif dans lequel les interactions sFasL/Fas au niveau NK pRBC et l'activité cytolytique de granzyme B inhiberaient la croissance des parasites du stade sanguin asexué.

En conclusion, l'activité cytotoxique NK contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* est faible chez les primipares que chez les autres femmes, et il y a une corrélation positive entre la concentration de cortisol et la présence de l'infection par *P.falciparum*. Cela suggère une relation causale entre l'activité cytotoxique NK réduite, de forts taux de cortisol et l'augmentation de la sensibilité chez les primipares.

Comme les cellules NK et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont des composants majeurs du mécanisme cellulaire par lequel la réponse immune entraîne la destruction des cellules étrangères (le non soi), les cellules tumorales ou les tissus infectés, il est important de savoir si de fortes concentrations de cortisol suppriment aussi l'activité cytotoxique des lymphocytes T ainsi que la libération antigène spécifique des cytokines. La capacité des cellules NK à interagir avec les anticorps transférés à travers la barrière transplacentaire pourrait représenter une première ligne de défense importante des nouveaux nés, et cela est l'un des aspects de la recherche que nous sommes entrain d'explorer activement. Des travaux en cours dans notre laboratoire tentent de comprendre plus avant les réponses des cellules NK de l'homme, autant chez des sujets non exposés au paludisme que durant et après des infections à *P.falciparum* naturellement acquises dans des populations exposées. Des activités de recherches futures pourraient inclure le développement de vaccins pour les femmes enceintes par l'induction de l'activité des cellules NK. La recherche fondamentale devrait inclure des efforts pour définir les conditions structurales requises à l'interaction entre les cellules NK et les protéines variants de *P.falciparum* exprimées à la surface des globules rouges parasités par les formes matures du parasite.

Remerciements :

Nous remercions toutes les femmes qui ont participé à cette étude. Nous remercions le Dr. F. Ndjovi-Mbiguino (Département de Microbiologie, Université des Sciences de la Santé) pour son assistance technique.

### **Références bibliographiques**

1. McGregor IA. Epidemiology, malaria and pregnancy. Am. J. Trop. Hyg. Immunol Res. 33: 517-525, 1984.
2. Menendez C. Priority areas for current research on malaria during pregnancy. Ann. Trop. Med. Parasitol. 93 (Suppl 1):S71-4, 1999.
3. Berczi I, Chalmers IM, Nagy E, Warrington RJ. The immune effects of neuropeptides [review]. Baillieres Clin. Rheumatol. 10:227-257, 1995.
4. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune mediated inflammation [review]. N. Engl. J. med. 332:131-1362, 1995.

5. Rouas-Freiss N, Carossella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the foetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Sci. USA.* 94:11520-1525, 1997.
6. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2:656-663, 2002.
7. Ching C, Lopez C. Natural killing of herpes simplex virus type 1-infected target cells: normal human responses and influence of antiviral antibody. *Infect. Immun.* 26:49-56, 1979.
8. Mavoungou E, Poaty-Mavoungou V, Touré FS, et al. Impairment of natural killer cell activity in *Chlamydia trachomatis*-infected individuals. *Trop. Med. Int. Health* 4:719-427, 1999.
9. Gatti G, Cavallo R, Sartori ML, et al. Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity. *J. Steroid Biochem.* 26:49-58, 1987.
10. Callewaert DM, Modgil VK, Radcliff G, Waite R. Hormone specific regulation of natural killer cells by cortisol: direct inactivation of the cellular proliferation. *FEBS Lett.* 285:108-110, 1991.
11. Vleugels MP, Brabin B, Eling WM, de Graaf R. Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:173-177, 1989.
12. Sylla EH, Kun JF, Kreamsner PG. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 94:652-656, 2000.
13. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675, 1976.
14. Mavoungou E, Luty AJF, Kreamsner PG. Natural killer (NK) cell mediated cytotoxicity of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur. Cytokine Netw.* 14:134-142, 2003.
15. Vleugels MPH, Eling WMC, Rolland R, De Graaf R. Cortisol and loss of malaria immunity in human pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 94:758-764, 1987.
16. Riley EM, Schneider G, Sambou I, Greenwood BM. Suppression of cell-mediated immune response to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:141-144, 1989.
17. Fievet N, Cot M, Chougnet C. et al. Malaria and pregnancy in Cameroonian primigravidae-humoral and cellular immune responses to *Plasmodium falciparum* blood stage antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:612-617, 1995.
18. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science.* 272:1502-1504, 1996.
19. Ricke CH, Staalsoe T, Kora K. T al. Plasma antibodies from malaria exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion on chondroitin sulfate A. *J. Immunol.* 165:3309-3314, 2000.
20. O'Neil-Dunne I, Achur RN, Agbor-Enoh ST, et al. Gravity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate A proteoglycan during pregnancy. *Infect. Immun.* 69:7487-7492, 2001.
21. Bouyou-Akotet MK, Ionete-Collard DE, Mabika-Manfoumbi M. et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Gabon. *Malar. J.* 2:18-25, 2003.
22. 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.* 86:22-29, 1991.
23. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* 159:4990-4998, 1997.
24. Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J. Immunol.* 163:884-892, 1999.

25. Choudhury HR, Sheikh NA, Bancroft GJ, Katz DR, De Souza JB. Early non specific immune responses and immunity to blood stage nonlethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect. Immun.* 68:6127-6132, 2000.
26. Rasheed FN, Bulmer JN, Dunn DT, et al. Suppressed peripheral and placental blood lymphoproliferative responses in first pregnancies: relevance to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:154-160, 1993.
27. Mvondo JL, James MA, Sulzer AJ, Campbell CC. Malaria and pregnancies in Cameroonian women: naturally acquired antibody responses to asexual blood-stage antigens and the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:486-490, 1992.
28. Montero A, Giovannoni AG, Sen L. Immunological properties of prolactin [review; in Spanish]. *Medicina (B. Aires)* 60:515-520, 2000.
29. Pearson RD. Prolactin, pregnancy and anaemia in severe malaria. *Trends Parasitol.* 17:362, 2001.
30. Wartofsky L, Burman KD, Dimond RC, et al. Studies on the nature of thyroidal suppression during acute falciparum malaria: integrity of pituitary response to TRH and alterations in serum T3 et reverse T3. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44:85-90, 1977.
31. Baines MG, Pross HF, Millar KG. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130:741-744, 1978.
32. Goldsobel A, Ank B, Spina C, Giorgi J, Stiehm R. Phenotypic and cytotoxic characteristics of the immune cells of the human placenta. *Cell Immunol.* 97:335-343, 1986.
33. Matera L, Cardoso E, Veglia F. et al. Effect of cortisol on the native and in vitro induced non-MHC restricted cytotoxicity of large granular lymphocytes. *J. Clin. Lab. Immunol.* 27:77-81, 1988.
34. Gatti G, Cavallo R, Sartori ML, et al. Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity. *J. Steroid Biochem.* 26:49-58, 1987.
35. Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria [review]. *Curr. Opin. Immunol.* 11:412-419, 1999.
36. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J. Infect. Dis.* 183:1100-1107, 1999.
37. Moore JM, Nahlen BL, Misore A, Lal AA, Udhayakumar V. Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon- $\gamma$  by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. *J. Infect. Dis.* 179:1218-1225, 1999.
38. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- $\gamma$  from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 169:2956-2963, 2002.