

## VIII

### ***Implication de la protéine DBL-1 $\alpha$ dans la reconnaissance par les cellules NK des érythrocytes parasités par Plasmodium falciparum***

Elie Mavoungou  
Professeur d'Immunologie

***In The Journal of Infectious Diseases, vol. 195, N° 10, pp. 1521-1531, 2007***

#### **Résumé**

La récente démonstration prouvant que les cellules “tueuses naturelles” ou natural killer (NK) détruisent les globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* (Pf-GR) suggère que l'immunité innée est cruciale au cours du paludisme. La lyse déclenchée par les cellules NK – vraisemblablement la réponse précoce de l'hôte à l'infection – requiert un contact étroit entre les récepteurs dits de cytotoxicité naturelle (NCRs) et des ligands exprimés à la surface des Pf-GR. Nous avons recherché si le premier domaine de « Duffy-binding-like » (DBL-1 $\alpha$ ) de la protéine érythrocytaire de la membrane-1 de *P.falciparum* (PfEMP-1) exprimé à la surface des globules parasités les rendrait ou non sensibles à la lyse cellulaire. Nous avons montré, en utilisant les protéines de fusion NKp30-Ig et NKp46-Ig et des peptides de DBL-1 $\alpha$  que les NCRs sont impliqués dans l'interaction entre les Pf-GR et les cellules NK. Cette interaction est directe, spécifique et fonctionnelle. Elle entraîne la production et la sécrétion de perforine et de granzyme B. Le prétraitement des cellules NK avec des peptides de DBL-1 $\alpha$  abolit aussi bien l'interaction entre les deux types de cellules que l'activité cytotoxique, suggérant que l'interaction entre DBL-1 $\alpha$  et les NCRs est le mécanisme clé de la reconnaissance des Pf-GRs qui conduit à la lyse de ces derniers par les cellules NK.

## 1. Introduction

Le paludisme se manifeste au stade de développement sanguin asexué du parasite, lorsque celui-ci quitte le foie et commence l'invasion des globules rouges. Les globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* (Pf-GR) sont les cibles privilégiées de la cytotoxicité à médiation cellulaire. Les cellules tueuses naturelles (NK) et les lymphocytes cytotoxiques (CTL) sont les composants majeurs de la réponse immune effectrice qui entraîne la destruction des corps étrangers, des tumeurs et des tissus infectés [1]. Les CTL sont activés après la reconnaissance et la fixation de peptides spécifiques présentés par les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. À l'inverse, l'un des phénomènes les mieux connus de la fonction des cellules NK est la lyse des cellules cibles dépourvues d'antigènes du CMH-I. Ce phénomène connu sous le terme d'hypothèse de « l'absence de soi » (missing self) [2]. Le mécanisme moléculaire par lequel les cellules NK identifient et détruisent les cellules autologues exprimant les molécules du CMH-I avait été décrit [3,4]. Les mécanismes utilisés par les cellules NK pour différencier les globules rouges « sains » des globules rouges parasités par *P.falciparum* ne sont pas encore bien connus. Le comportement des cellules NK qui sont confrontées aux cellules cibles semble dépendre d'une délicate balance entre les signaux transduits par les récepteurs activateurs et ceux générés par les récepteurs inhibiteurs [5]. Quatre récepteurs de lyse, – les récepteurs naturels de cytotoxicité (NCRs : [NKp30, NKp44, NKp46 et NKp80]) – exprimés uniquement à la surface des cellules NK ont été décrits [6-12]. Les NCRs sont des ligands non spécifiques au CMH. Toutefois, la nature des ligands que les NCRs reconnaissent sur les cellules cibles demeure inconnue à ce jour. Le tégument principal de la protéine de cytomégalovirus humaine, pp65, interagit avec NKp30 [13]. NKp46 et NKp44, mais pas NKp30 ont été décrits comme pouvant reconnaître l'hémagglutinine du virus de Sendai [14].

Nous avons récemment montré que les cellules NK inhibent la croissance de *P.falciparum in vitro* en présence de sérum de sujets semi immuns vivant en zone d'endémie palustre et, qu'elles détruisent les Pf-GR par cytotoxicité directe [15]. En outre

*P.falciparum* remodèle la surface des globules rouges au cours de l'invasion, en insérant des protéines dérivées du parasite et contenues dans les protusions qui ressemblent à des boutons à la surface des cellules [16]. La protéine érythrocytaire membranaire 1 de *P.falciparum* (PfEMP-1), qui est ancrée dans ces protusions, est constituée de deux à sept domaines qui ressemblent aux domaines de fixation de « Duffy » (DBL). Le premier domaine, DBL-1 $\alpha$ , avec la région 1 $\alpha$  inter domaine riche en cystéine (CDR1 $\alpha$ ), forment la tête de la structure et agit en médiateur pour l'adhésion aux récepteurs endothéliaux variés [17]. Dans cet article, nous analysons le mécanisme par lequel les Pf-GR sont reconnus et détruits par les cellules NK, malgré l'absence d'antigènes du CMH de classe I sur leur membrane, et nous évaluons dans quelle mesure le domaine DBL-1 $\alpha$  pourrait y être impliqué dans ce phénomène.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2-1/ Souches parasitaires et culture**

Quatre souches de *P.falciparum* adaptées pour les cultures en laboratoire – FCR3, D10, FP8 et 3D7 – ont été utilisées dans cette étude. Les parasites ont été cultivés comme précédemment décrit par Trager et Jensen [17].

### **2-2/ Obtention des cellules NK humaines purifiées**

Les cellules NK étaient isolées par la technique de séparation négative utilisant le système MACS (Macs Cell sorting of human Leukocytes, Gladbach, Germany) à partir d'échantillons sanguins de 19 volontaires sains n'ayant pas de paludisme et n'ayant aucun signe sérologique de contact avec *P.falciparum*. Tous ces volontaires donnent leur sang à la banque de sang de l'université de Tübingen en Allemagne, comme précédemment décrit [14].

### **2-3/ Les anticorps monoclonaux (Mabs)**

Les anticorps monoclonaux fluorescents anti-NKp30, [clone Z25], anti-NKp44 (clone Z231) et anti-NKp46 (clone BAB281) couplés à la phycoérythrine (PE) étaient achetés chez Beckman-Coulter (Krefeld, Allemagne). L'anticorps Fc $\gamma$  F(ab)'<sub>2</sub> de chèvre anti- IgG humain était acheté chez Ancell Corporation (Bayport, MN, USA) ; l'anticorps monoclonal marqué de la granzyme B humaine était acheté chez Caltag Laboratories (Birmingham, CA, USA).

#### **2-4/ Les protéines fusionnées avec des immunoglobulines (Ig)**

L'obtention des protéines de fusions NKp30-Ig, NKp46-Ig et CD99-Ig a été décrite dans une précédente publication [18]. Les séquences codant pour les portions extracellulaires de NKp30 (numéro d'accès AJ223153) et NKp46 (numéro d'accès de l'isoforme AJ006121) étaient amplifiées par PCR. Nous avons généré les protéines de fusion tronquées NKp46D1-Ig et NKp46D2-Ig dans les cellules COS, par amplification des séquences correspondant aux résidus 1-120 (domaine 1 ; D1) et 121-250 (domaine 2 ; D2) de la protéine mature NKp46 par PCR en insérant les fragments dans un vecteur d'expression de mammifères résultant de fragments contenant la portion Fc des IgG1 humaines. Le séquençage des constructions obtenues a révélé que tous les ADNc étaient appariés avec la séquence génomique des portions Fc humaines. Les protéines de fusion étaient produites dans les cellules transfectées en utilisant les réactifs FuGENE6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), selon les instructions du fabricant. Les surnageants cellulaires étaient collectés puis purifiés sur une colonne de purification des protéines G. L'analyse électrophorétique sur gel SDS-PAGE a révélé que toutes les préparations des protéines de fusion étaient pures à 95% et que les protéines de fusion avaient le poids moléculaire théoriquement attendu.

#### **2-5/ Les peptides**

Trois séquences peptidiques des régions conservées du domaine de DBL-1 $\alpha$  - P1 (GACAPYRRLHCD), P2 (LARSFADIGDIVRGKDLY) et P3

(VPQYLRWFEEWAEEDAFCRK) - étaient synthétisées par Thermohybaïd GmbH (Hilden, Allemagne), par la méthode *t-butaxycarbonyl* suivie du clivage par HF. Ces trois peptides étaient étudiés parce qu'ils sont immunogènes chez le rat et qu'ils réagissent avec des séras humains présentant une immunité partielle contre le paludisme [19]. De plus, lorsqu'ils sont testés chez l'homme, les trois peptides sont reconnus par le sérum de répondeurs semi immuns. Les séras qui étaient positifs avec P1 l'étaient aussi avec P2 et P3, et les séras qui réagissaient avec P2 détectaient aussi P3 [20]. Les prédictions des épitopes HLA (lorsque le programme de prédiction des épitopes *syfpeifi* [<http://syfpeithi.de/>] était utilisé) ont montré qu'un épitope dans P3 a une grande valeur prédictive quand il y a un épitope HLA de classe II dans P2. Deux peptides provenant de deux régions de EBA-175 (antigène de *P.falciparum* de poids moléculaire 175 fixant les érythrocytes) – [FCR3 (GPKGNEQKKRDDDSL) et la protéine CAMP (DAEAKMKGNDTSEMSHN)] – et trois autres peptides synthétiques issus de GLURP<sub>85-213</sub> (protéine riche en glutamate), MSP-1<sub>19</sub> (protéine de surface du mérozoïte) et AMA-1<sub>181-213</sub> (antigène-1 de la membrane apicale) étaient chimiquement produits par la chimie en phase solide de 5-fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc) par Thermohybaïd. Toutes les préparations de peptides étaient à plus de 97% pures tel que prouvé par HPLC les analyses et en spectrométrie de masse.

## **2-6/ Expériences de fixation directe**

Les plaques de microtitration étaient coatées par incubation de 16 heures à 4°C avec 0,1 µg de P1, P2 ou de P3. Ces plaques étaient bloquées par incubation de deux heures à 4°C avec 1% de sérum d'albumine de bovine (BSA) dans du PBS, puis lavées (1% BSA, 0,05% Tween dans du PBS) et incubées pendant 16 heures à 4°C avec 0,1 µg, 0,2 µg ou 0,5 µg de protéines de fusions pertinentes et variées ou avec de (BSA) (volume final de 100 µl de 1% de BSA dans 0,05% de Tween 20 dans du PBS). Alternativement, les plaques de microtitration étaient coatées avec des concentrations variées de P1, P2 ou de P3 (0,075 µg, 0,15 µg ou 0,3 µg par puits), et incubées avec 0,2 µg de protéines de fusion appropriées. Les plaques étaient aussi coatées avec des concentrations différentes de NCRs puis lavées et incubées deux heures de plus à la température ambiante,

température de la pièce où les expériences étaient réalisées, avec 50 µl d'un pool de sérum humain de 50 adultes Africains semi immuns dilué au 1 :5000. Les protéines fixées étaient détectées par incubation avec de l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase et dilué au 1 :3000 dans du tampon, selon le protocole standard d'ELISA.

## **2-7/ Cytométrie en flux**

Les érythrocytes étaient incubés avec 20 µg de protéines de fusion variées pendant 1 heure à 4°C, lavés puis doublement marqués avec de l'anticorps de chèvre dirigé contre la portion Fc humaine (109-096-098 ; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) du F(ab')<sub>2</sub> conjugué à la phycoérythrine (PE) d'une part, et d'autre part avec de l'acridine orange dilué au 1 :1000. Les tampons de marquage et de lavage étaient constitués de 0,5% (poids/volume) de BSA et de 0,05% d'azide de sodium (NaN<sub>2</sub>) dans du PBS. La cytométrie en flux était réalisée sur un FACScan, cytomètre de Becton Dickinson (BD Biosciences, Mountain, View, CA). Les résultats étaient enregistrés puis analysés avec le logiciel BD CellQuest 3.3. Les résultats de l'intensité de fluorescence étaient enregistrés par amplification logarithmique. Les unités d'intensité de fluorescence reportées correspondent à la conversion des valeurs des canaux selon l'échelle logarithmique (allant de 10<sup>0</sup> à 10<sup>4</sup>). Les résultats sont présentés aussi bien comme histogrammes de marquage (Intensité de fluorescence sur l'axe des abscisses et le nombre d'événements sur l'axe des ordonnées), que comme médiane géométrique de l'intensité de fluorescence (MFI) des populations cellulaires marquées.

Pour l'analyse du marquage intracytoplasmique, 5 x 10<sup>5</sup> cellules NK étaient fixées après incubation de 5 minutes à température ambiante avec 1 ml de paraformaldehyde à 4% dans du tampon de fixation puis lavées ; la perméabilité cellulaire était induite par traitement avec 20 µl de saponine à 1% et 0,1% d'azide de sodium (Sigma Aldrich). Pour le traitement enzymatique, les *Pf*-GRs matures et intactes, à 10% d'hématocrite, suspendus dans du RPMI- (pH 7,2) étaient traités avec de la trypsine (Sigma T-1005) ou de la chymotrypsine (Calbiochem) à la concentration finale de 10 µg/ml, à 25°C pendant une heure avec une agitation périodique toutes les 10 minutes comme initialement décrit

[21]. Les cellules étaient ensuite lavées cinq fois à 4°C avec du tampon PBS contenant 0,1 mM de PMSF puis marquées avec l'anticorps monoclonal approprié. Les échantillons étaient analysés en cytométrie en flux.

### **2-8/ Blocage de la fixation de NKp30-Ig et NKp46-Ig par utilisation des peptides de DBL-1 $\alpha$**

Nous avons incubé 10  $\mu$ g de NKp30-Ig ou de NKp46-Ig avec 40  $\mu$ g de P1, P2 ou P3 dans un volume final de 100  $\mu$ l de PBS/BSA/NaN<sub>2</sub> pendant deux heures sur de la glace. Ces mélanges étaient ensuite incubés avec des érythrocytes pendant deux heures sur de la glace et marqués pour la détection de la présence des protéines de fusion comme décrit dans le paragraphe cytométrie en flux.

### **2-9/ Activation des cellules NK avec des peptides de DBL-1 $\alpha$**

Les cellules NK purifiées (5 x 10<sup>5</sup> par puits) étaient incubées pendant 16 heures à 37°C avec 40  $\mu$ g de P1, P2 ou P3 dans un incubateur dont l'atmosphère était réglée à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules étaient ensuite lavées, incubées avec les anticorps monoclonaux dirigés contre la perforine ou la granzyme B. L'immunofluorescence intracytoplasmique était mesurée en cytométrie en flux comme décrit ci-dessus.

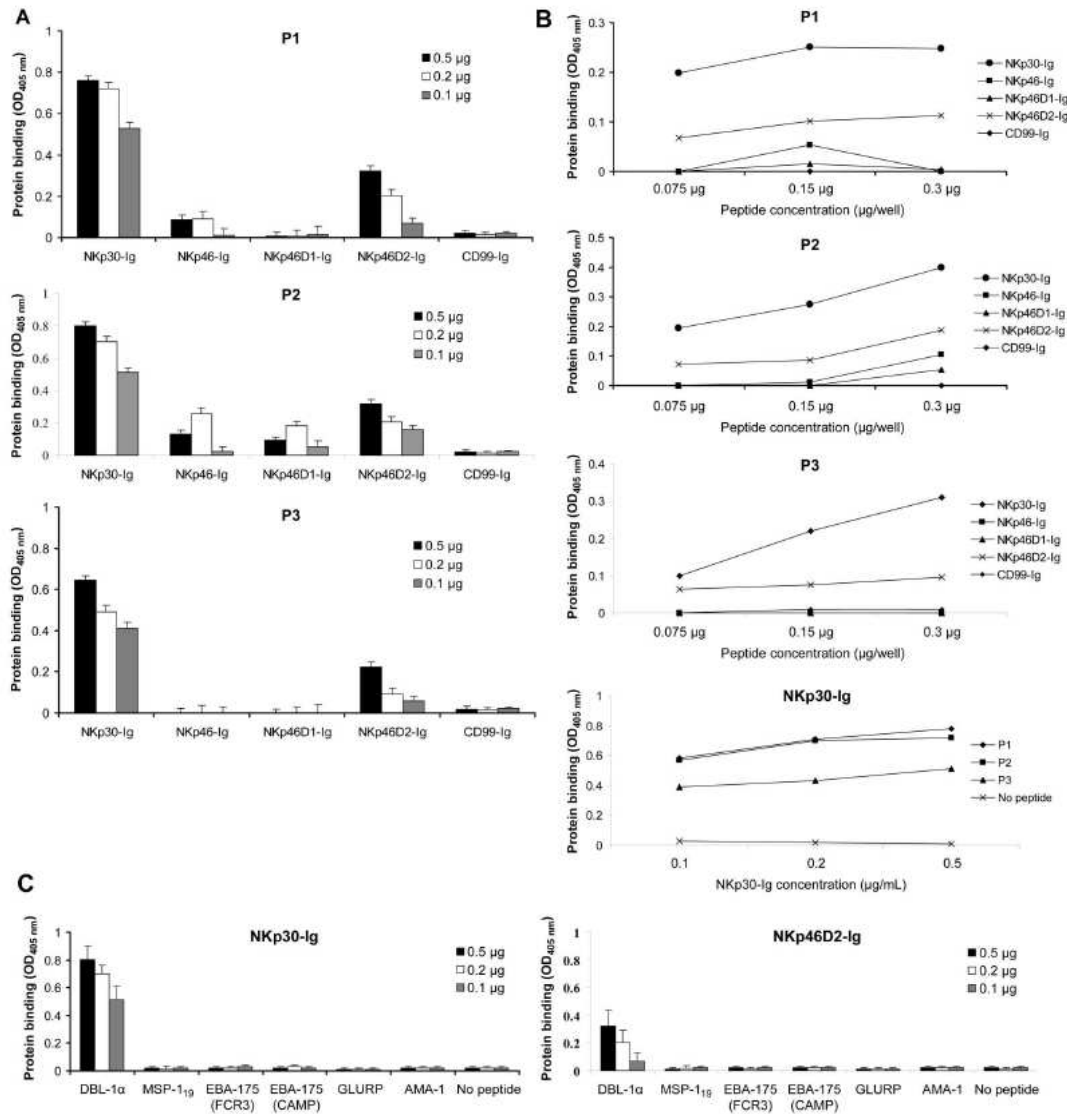
### **2-10/ Expériences de cytotoxicité**

L'activité cytolytique des cellules NK purifiées contre les *Pf*-GRs et celle contre les cellules de la lignée cellulaire CHO-K1 étaient réalisées dans des expériences de libération de chrome radioactif (<sup>51</sup>Cr) en quatre heures comme nous l'avons précédemment décrit [14]. Pour les expériences de blocage, les anticorps anti-NKp30 et anti-NKp46 étaient utilisés à une dilution au 1/100, concentration à laquelle la fixation est saturée, comme le montre les mesures en cytométrie.

### **3. Résultats**

#### **3-1/ Les protéines de fusion NKp30-Ig et NKp46-Ig interagissent directement avec les peptides de DBL-1 $\alpha$**

Nous avons d'abord examiné la spécificité de la reconnaissance de DBL-1 $\alpha$  par NKp30 et NKp46. Nous avons utilisé les protéines NKp30 et NKp46 fusionnées avec l'immunoglobuline G1 (IgG1) humaine et évalué la fixation de NKp30-Ig et NKp46-Ig à trois peptides de DBL-1 $\alpha$  dans un test enzymatique dénommé ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). NKp30-Ig et NKp46-Ig se fixent aux trois différents DBL-1 $\alpha$  (Figure 1). NKp30-Ig ne se fixe spécifiquement au DBL-1 $\alpha$  alors que la protéine de fusion NKp46-Ig se fixe que très faiblement ou pas du tout aux peptides de DBL-1 $\alpha$  (Fig. 1A, a-c). NKp46D2-Ig se fixe plus efficacement que NKp46-Ig, et NKp46D1-Ig ne se fixe pas au premier domaine de PfEMP-1. Cette fixation spécifique de NKp30-Ig sur DBL-1 $\alpha$  dépendant de la concentration était observée avec des concentrations variées de peptides de DBL-1 $\alpha$  (Figure 1B, a-c) ou de protéines de fusion (Figure 1B, d). DBL-1 $\alpha$  ne se fixe pas à d'autres antigènes de *P.falciparum* (i.e., EBA-175, MSP-1<sub>19</sub>, GLURP et AMA-1) (Figure 1C). Toutefois, ces résultats négatifs ne doivent pas écarter l'idée que d'autres portions de la protéine entière ne pourraient jamais être reconnues (i.e., dans une région non représentée par les peptides). Ces résultats indiquent que la reconnaissance de DBL-1 $\alpha$  par NKp30 et NKp46 est directe, et ne nécessite pas la présence d'autres molécules accessoires ou intermédiaires.



**Figure 1.** Fixation directe de NKp30-Ig et NKp46-Ig au DBL-1 $\alpha$ . **A.** Les plaques ELISA sont coâtées avec 0,1  $\mu$ g de 3 peptides de DBL-1 $\alpha$  (P1, P2 et P3), puis incubées avec 0,1, 0,2 et 0,5  $\mu$ g de protéine de fusion relevant comme mentionné. CD99-Ig était utilisé comme contrôle négatif. Le domaine DBL-1 $\alpha$  de *PfEMP-1* est reconnu par NKp30 de manière dose-dépendante. **B.** Les plaques ELISA étaient coâtées avec des concentrations variées de peptides de DBL-1 $\alpha$  (P1, P2 et P3) allant de 0,075 à 0,3  $\mu$ g/ml, ou avec des concentrations variées de NKp30-Ig allant de 0,1 à 0,5  $\mu$ g/ml comme indiqué, et étaient ensuite incubées avec 0,2  $\mu$ g/ml de protéine de fusion relevant. Les protéines fixées étaient détectées en utilisant l'anticorps IgG de chèvre anti-humain couplé à la peroxydase (spécifique à la portion Fc). Les récepteurs de la cytotoxicité naturelle (NCRs) ne se fixent pas aux autres antigènes de *P.falciparum*. **C.** Les plaques ELISA ont été coâtées avec 0,1  $\mu$ g de NKp30-Ig ou NKp46-Ig puis incubées avec 0,1 ; 0,2 et 0,5  $\mu$ g d'antigènes parasitaires relevant comme indiqué. **A-C.** Les plaques étaient lavées et incubées 2 heures de plus avec 50  $\mu$ l d'un pool de sérum de 50 adultes Africains semi immuns dilué au 1 :5000. Les peptides fixés étaient détectés avec de l'anti IgG de chèvre anti-humain conjugué à la peroxydase. Les valeurs d'absorbance à 405 nm sont présentées. Chaque diagramme présente 1 expérience

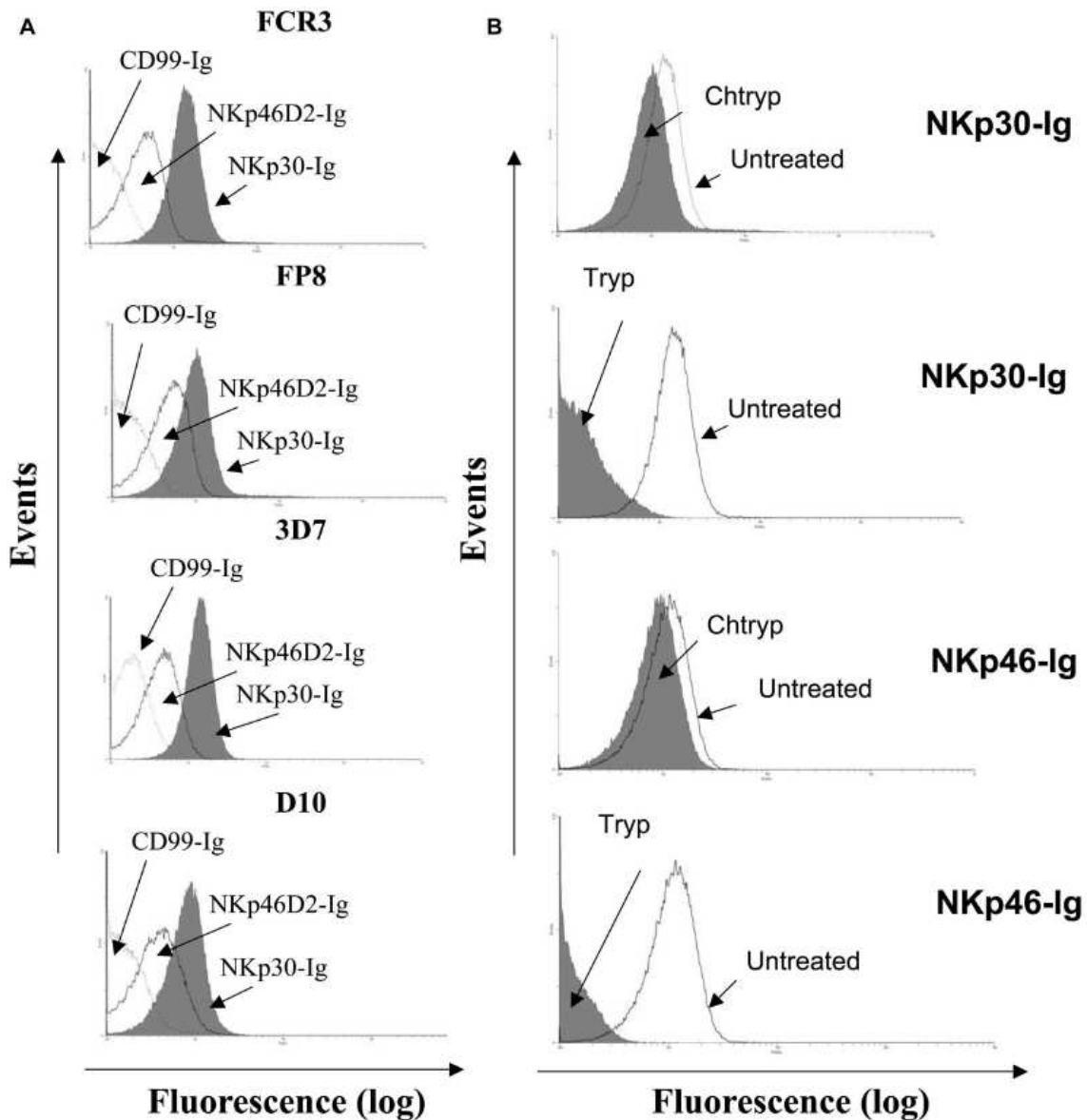
représentative de 3 réalisées. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs de déviation standard (SD). AMA-1 : antigène de la membrane apicale ; EBA : antigène de la fixation des érythrocytes ; GLURP : protéine riche en glutamate ; MSP-1<sub>19</sub> : fragment C-Terminale de 19 Kda de la protéine-1 de surface du mérozoïte.

### **3-2 / Interaction des protéines de fusion NKp30-immunoglobuline et NKp46-immunoglobuline avec DBL-1 $\alpha$ à la surface des Pf-GRs**

Nous avons examiné l'implication des NCRs dans la reconnaissance des érythrocytes parasités par *P.falciparum*, en marquant la surface membranaire de ces derniers avec les protéines de fusion NKp30-immunoglobulines et NKp46-immunoglobulines. L'analyse des globules rouges en cytométrie en flux a révélé une coloration des cellules parasitées avec NKp30-immunoglobuline et NKp46-immunoglobuline (Figure 2A), mais une telle coloration n'était pas observée avec les érythrocytes non parasités. Nous avons utilisé quatre souches de *P.falciparum* pour ces expériences. Une souche faiblement cytoadhérente (i.e. 3D7) et une autre très fortement cytoadhérente (FCR3). NKp30-immunoglobuline et NKp46-immunoglobuline se fixent sur les érythrocytes parasités par toutes ces souches. Ainsi donc, NKp30-immunoglobuline et NKp46-immunoglobuline interagissent avec le DBL-1 $\alpha$  exprimé à la surface des érythrocytes parasités par *P.falciparum*. Pour toutes les quatre souches de *P.falciparum* utilisées l'intensité de fluorescence à la surface était significativement plus élevée avec NKp30-immunoglobuline qu'avec NKp46-immunoglobuline (Figure 2A). Comme la région extracellulaire de NKp46 contient deux domaines de type C2-immunoglobuline-like [9], nous avons recherché si le site de fixation de DBL-1 $\alpha$  était

localisé dans le domaine de la membrane distale (NKp46D1-immunoglobuline) ou dans celui de la membrane proximale (NKp46D2-immunoglobuline). Pour toutes les quatre souches de *P.falciparum* utilisées, l'infection conduit à une augmentation de la fixation à la fois de NKp46-immunoglobuline et de NKp46D2-immunoglobuline mais ne modifie pas la fixation de NKp46D1-immunoglobuline (Table 1). Comme *PfEMP-1* est hautement sensible à la trypsinisation mais pas au traitement à chymotrypsine, alors que les protéines de *Plasmodium* sont relativement résistantes, nous avons alternativement pré traité les *Pf*-GRs avec l'un de ces deux enzymes avant le marquage des cellules avec NKp30-immunoglobuline ou NKp46-immunoglobuline. Les *Pf*-GRs pré traités à la trypsine perdent la capacité de se fixer aux NCRs (Figure 2B).

Une expérience de fixation modifiée des érythrocytes a été utilisée pour vérifier la viabilité des protéines de fusion NKp30-immunoglobuline et NKp46D2-immunoglobuline :  $10^7$  - $10^8$  cellules ont été utilisées à un volume final de 170  $\mu$ l ; les concentrations des protéines de fusion iodées étaient comprises entre 20 et 2400 nmol/L. La protéine de fusion non marquée radioactivement était de 40  $\mu$ mol/L. Les cellules étaient lavées avec du tampon HBS, et la fixation de la fusion était quantifiée [22,23]. Les constantes d'affinité ( $K_d$ ), comme déterminée en utilisant GraphPad Prism (version 4.03 ; trial) de Windows (Logiciel GraphPad ; disponible à <http://www.graphpad.com>), étaient comme suit : NKp30-immunoglobuline, 80 nmol/L ; et NKp46D2-immunoglobuline, 173 nmol/L. Les coefficients de Hill étaient respectivement de 1,6 et 0,7. Ainsi, la reconnaissance de DBL-1 $\alpha$  par NKp30 et NKp46 serait un phénomène commun et, dans le cas de NKp46, l'interaction serait principalement médiée par le domaine membranaire proximal.



**Figure 2.** Fixation de NKp30-immunoglobulin (Ig) et NKp46-Ig sur des érythrocytes parasités par différentes souches de *Plasmodium falciparum*. (A) et la perte de la capacité de fixation par les globules parasités par *P.falciparum* des récepteurs de cytotoxicité après prétraitement avec la trypsine (tryp) (B). Pour la figure A, les globules rouges parasités par FCR3, FP8, 3D7 et D10 étaient incubés avec les protéines de fusion NKp30-Ig ou NKp46-Ig ou CD99-Ig suivi par l'incubation avec les anticorps de chèvre anti-IgG humaine de Fc conjugués à la fluoresceine isothiocyanate (FITC). Pour la figure B, les érythrocytes étaient parasités par D10, incubés avec

10 µg/ml de tryp ou de chymotrypsine (chtryp), puis marqués avec les protéines de fusion NKp30-Ig ou NKp46D2-Ig suivi par les anticorps de chèvre anti-IgG humaine de F(ab')<sub>2</sub> conjugués à la FITC et analysés en cytométrie en flux. Les cellules non traitées étaient utilisées comme contrôles négatifs. Les panneaux présentent une expérience représentative de quatre réalisées.

**Table 1.**

**Reconnaissance du domaine DBL-1 $\alpha$  par différentes souches de *P.falciparum* par NKp30 et par le domaine membranaire proximal de NKp46.**

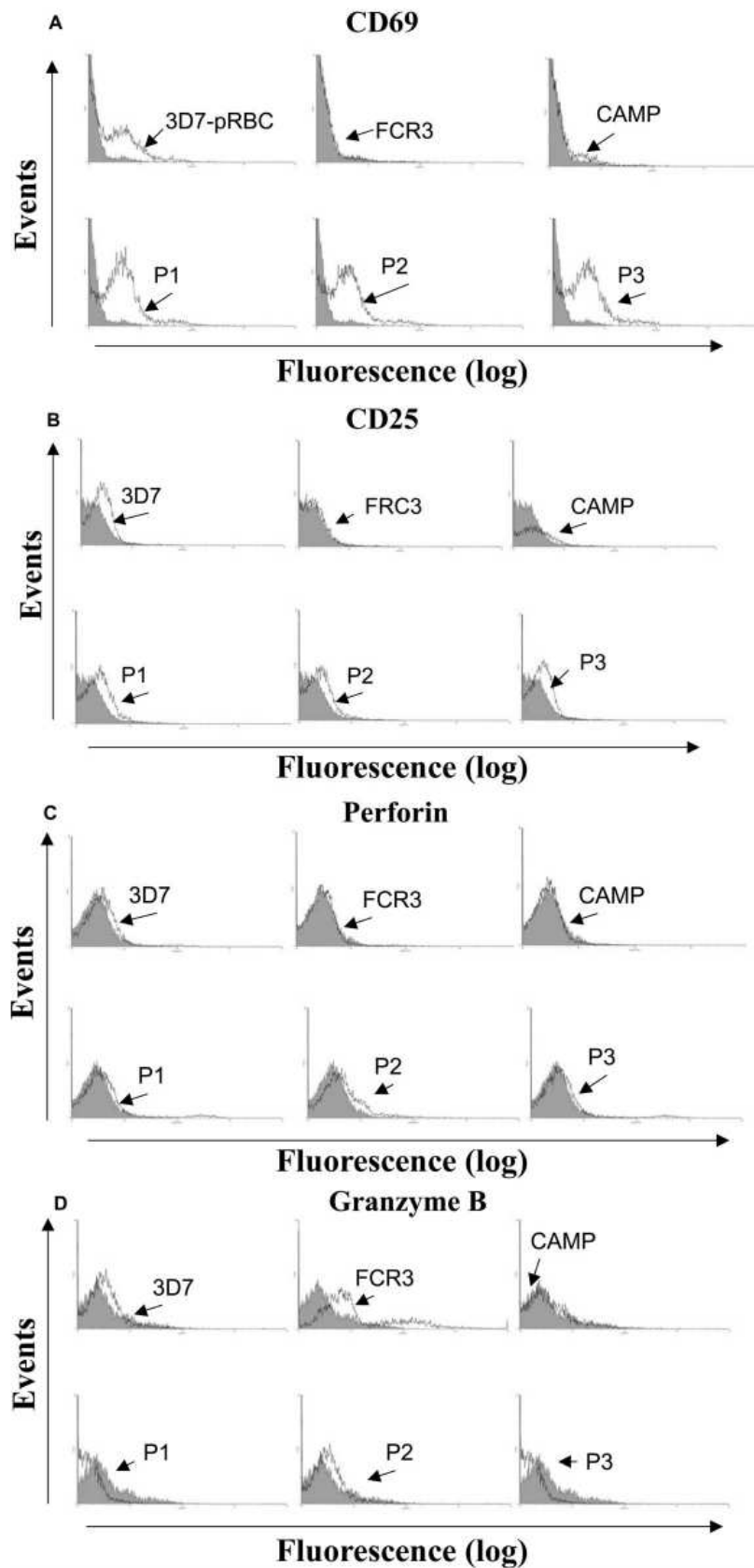
<i>P. falciparum</i> clones	NKp30-Ig	NKp46-Ig	NKp46D1-Ig	NKp46D2-Ig
Uninfected	0	0	0	0
3D7	458	45	7	112
D10	136	54	5	78
FCR3	350	37	2	99
FP8	109	52	4	85

NOTE. Ig, immunoglobulin.

### **3-2/ L'activation des cellules NK par des peptides de DBL1 $\alpha$**

L'activation des cellules NK humaines par *P.falciparum* des stades asexués du développement sanguin dépend de deux signaux : (i) Les cytokines libérées par les cellules « spectatrices », les monocytes ou les cellules dendritiques et (ii) par la reconnaissance directe de érythrocytes parasités par l'intermédiaire des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK [24]. Nous avons montré qu'il y a une forte interaction spécifique entre NKp30, NKp46, et DBL-1 $\alpha$ . Puisque PfEMP-1 est une protéine membranaire qui peut ainsi servir de ligand activateur de NKp30 et NKp46, cette reconnaissance pourrait vraisemblablement être d'une grande importance fonctionnelle. Nous avons par conséquent analysé les conséquences d'une telle

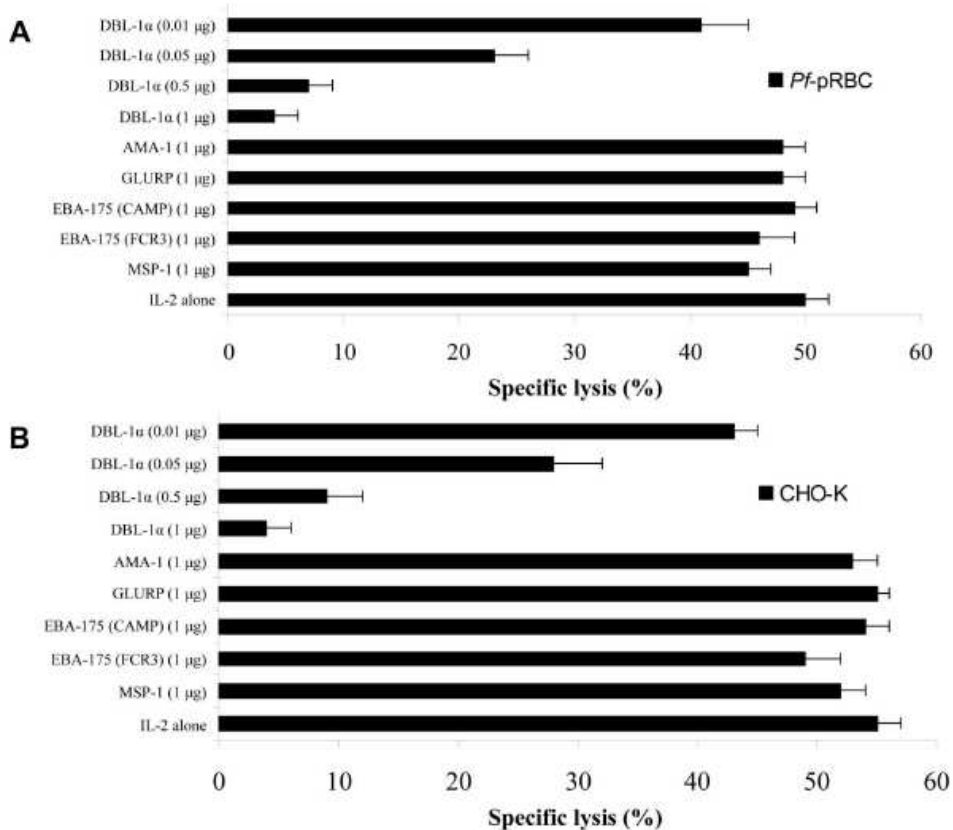
interaction en évaluant la régulation des marqueurs précoces de l'activation par DBL-1 $\alpha$ . Les marqueurs précoces de l'activation choisis étaient CD69 et CD25. Ils sont connus comme des marqueurs sensibles respectivement de l'activation leucocytaire et de la capacité proliférative des cellules NK [25-27]. Nous avons aussi évalué la production des granules cytotoxiques, parce que la cytotoxicité des cellules NK est médiée par les granules préformés, via particulièrement la perforine et les granzymes. Dans toutes ces expériences, nous avons utilisé la stimulation des cellules NK par la souche 3D7 comme contrôle. L'expression de CD69 et de CD25 par les cellules était analysée en cytométrie en flux après co-culture avec des globules rouges parasités par la souche 3D7 ou avec des érythrocytes non parasités pendant 18-24 heures en présence de doses suboptimales d'interleukine (IL-2). L'incubation préalable des cellules NK avec DBL-1 $\alpha$  augmente l'expression de CD69 et de CD25 (Figure 3A et 3B) et des marqueurs de l'activité cytotoxique des cellules NK, comme l'indique le marquage intracellulaire de perforine et granzyme B analysé en cytométrie en flux (Figure 3C et 3D). Ces résultats démontrent, bien que faiblement, que l'interaction entre DBL-1 $\alpha$  et les cellules NK induit la production de perforine et de granzyme B.



**Figure 3.** Expression de CD69 (**A**), CD25 (**B**), perforine (**C**) et granzyme B (**D**) sur les cellules NK en réponse aux globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* (*Pf*-GRs) ou à DBL-1 $\alpha$ . Les cellules NK étaient cultivées avec des *Pf*-GRs seuls ou en association avec 3 peptides de DBL-1 $\alpha$  (P1, P2 et P3), FCR3 et CAMP, 2 peptides de EBA-175, étaient utilisés comme contrôles. Les taux de CD69 et CD25 étaient évalués par marquage direct et en cytométrie en flux. Les taux de perforine et granzyme B étaient évalués par marquage intracellulaire et en cytométrie en flux. Pour chaque marquage les résultats sont analysés sur la base de 10.000 événements.

### **3-4/ Suppression de la lyse des *Pf*-GRs par l'incubation préalable des cellules NK avec DBL-1 $\alpha$ .**

Les cellules NK peuvent détruire les *Pf*-GRs [14]. Nous avons comparé la capacité des cellules NK traitées ou non avec DBL-1 $\alpha$  à détruire les *Pf*-GRs. Nous avons analysé la sensibilité des *Pf*-GRs à être lysés par des cellules NK autologues cultivées en présence ou en absence de concentrations variées de DBL-1 $\alpha$  (de 0,01 à 1  $\mu$ g/ml). Une expérience représentative est présentée à la figure 4A : les *Pf*-GRs étaient efficacement détruites par les cellules NK cultivées en présence d'IL-2. À l'inverse, les cellules NK cultivées avec de fortes concentrations de DBL-1 $\alpha$  détruisent les cellules parasitées beaucoup moins efficacement. Les cellules NK ont aussi été testées pour leur capacité à détruire les cellules CHO-K, une lignée cellulaire qui est lysée de façon NKp30-dépendante [28]. Les résultats obtenus pour la cytotoxicité NK dirigée contre les CHO-K est parallèle à celle obtenue pour *Pf*-GRs (Figure 4B). L'incubation préalable des cellules NK avec de fortes concentrations de EBA-175 (FCR3 ou CAMP), MSP-1<sub>19</sub>, AMA-1 et GLURP utilisés comme contrôles ne modifie pas l'activité cytolytique des cellules NK (Figure 4A et 4B). Ainsi, la cytolyse des *Pf*-GRs et des cellules CHO-K médiée par les cellules NK est spécifiquement inhibée l'incubation préalable des cellules NK avec DBL-1 $\alpha$  et cette cytolyse est au moins partiellement dépendante de l'expression de NKp30.

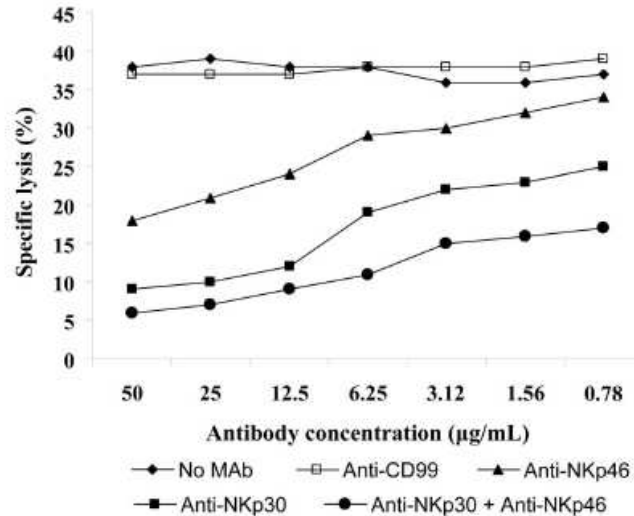


**Figure 4.** La diminution de la cytotoxicité des cellules NK contre les globules rouges parasités par *P.falciparum* (*Pf*-GRs) après incubation avec DBL-1α. L'incubation préalable des cellules effectrices avec DBL-1α inhibe la cytotoxicité des cellules NK des sujets sains n'ayant jamais contractés le paludisme, incubées pendant 5 jours avec de l'interleukine 2 (IL-2) seule ou en association avec des concentrations variées de DBL-1α (0,005 – 1 μg/ml), en utilisant des *Pf*-GRs (**A** : le rapport cellules effectrices/ cellules cibles [E :T] était de 20 :1) ou des cellules de la lignée cellulaire CHO-K (**B** : le rapport cellules effectrices/ cellules cibles [E :T] était de 5 :1 ). Les cellules NK incubées avec 1 μg/ml de MSP-1, EBA-175 (FCR3 et CAMP), GLURP ou AMA-1 étaient utilisées comme contrôles.

### 3-5/ Blocage de la lyse.

Une absence de blocage de la lyse a été observée en utilisant un isotype apparié de l'anticorps monoclonal anti-CD99. Le blocage de la lyse des *Pf*-GRs survient en utilisant l'anti immunoglobuline NKp30 et dans une moindre mesure en utilisant l'anti immunoglobuline NKp46D2. Cela révèle que NKp30 et NKp46 peuvent directement

participer à la lyse des *Pf*-GRs par les cellules NK et que NKp30 et NKp46 sembleraient agir en synergie (Figure 5). Les cellules NK ont vraisemblablement plusieurs récepteurs capables de médier la cytolyse directe des *Pf*-GRs. La lyse des *Pf*-GRs qui ne peut pas être bloquée par les anticorps anti immunoglobuline NKp30 et anti immunoglobuline NKp46 utiliserait un récepteur de lyse différent exprimé à la surface des cellules NK.

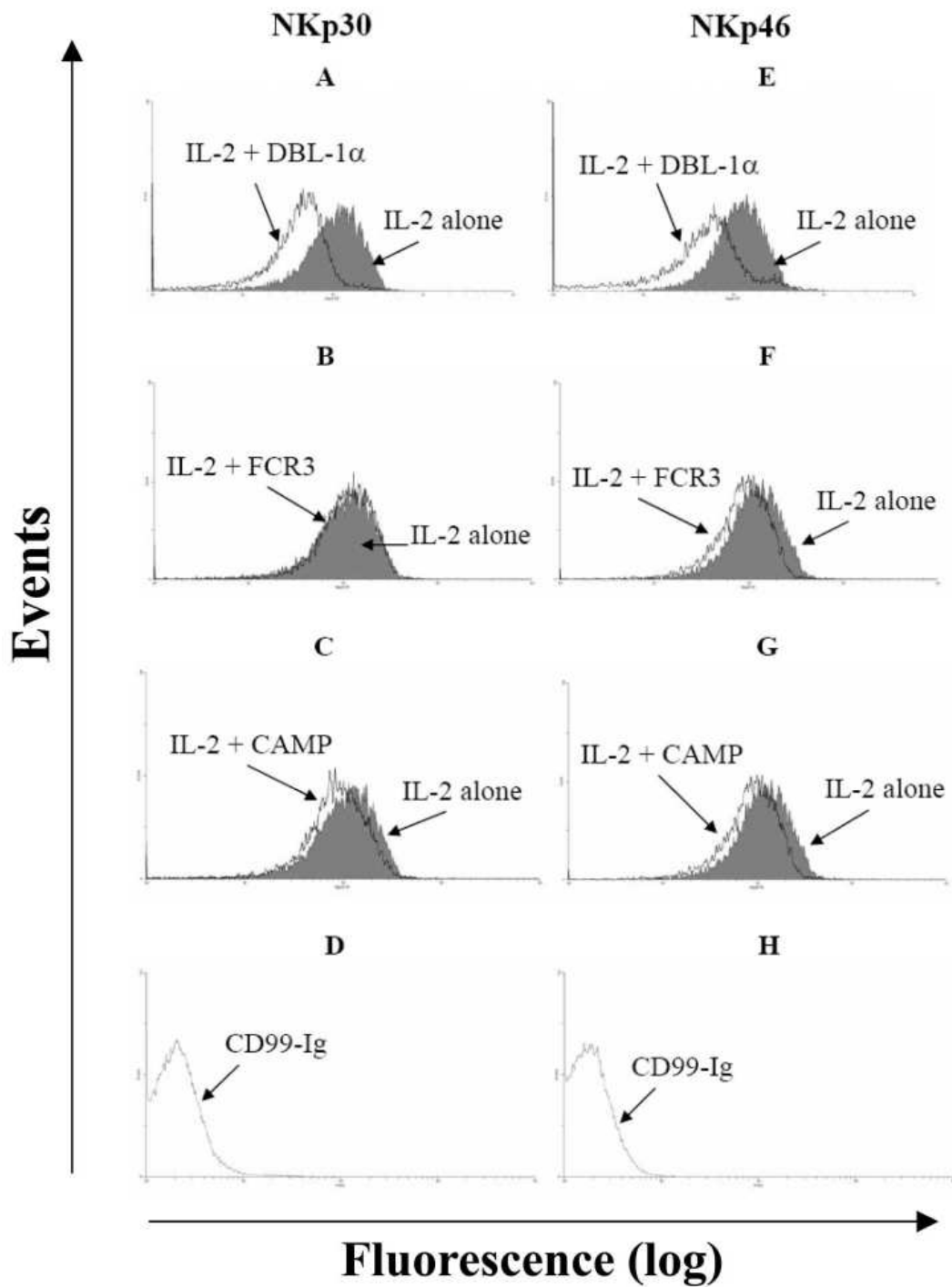


**Figure 5.** Relation proportionnelle entre le blocage de la lyse des cibles *Pf*-GRs et le taux d'anticorps monoclonal (MAb) ajouté. Les cellules NK purifiées étaient incubées avec des concentrations variées de fragments F(ab')<sub>2</sub> des anticorps monoclonaux anti-NKp30-immunoglobuline (Ig), anti-NKp46-Ig ou anti-CD99 pendant 1 heure sur de la glace. Les cellules NK purifiées incubées sans aucun anticorps monoclonal étaient utilisées comme contrôles. Les cellules étaient lavées et incubées avec des *Pf*-GRs marqués au chrome radioactif (<sup>51</sup>Cr) au rapport cellules effectrices/cellules cible de 20 :1 dans des expériences de cytolyse de 4 heures. Une expérience représentative de 3 réalisées est présentée.

### **3-6/ L'incubation préalable des cellules NK avec DBL-1 $\alpha$ conduit à une faible expression de NKp30 et NKp46.**

Nous avons montré dans une précédente étude que la diminution de la cytotoxicité des cellules NK humaines est associée à une grande diminution de l'expression de NKp30 et de NKp46 après un traitement au cortisol [29]. Ces résultats

suggèrent une possible implication des NCRs à la surface des cellules NK ; nous avons par conséquent analysé si NKp30 est nécessaire au contrôle de l'infection. Pour atteindre ce but, nous avons analysé l'expression de NKp30 et de NKp46 en cytométrie en flux, après incubation des cellules NK avec DBL-1 $\alpha$ . Nous avons observé un marquage de NKp30 et de NKp46 sur les cellules NK cultivées en présence d'IL-2 (Figure 6, images ombrées) et les cellules cultivées en présence à la fois d'IL-2 et de 1  $\mu$ g/ml de DBL-1 (Figure 6, images claires). L'incubation préalable des cellules NK avec DBL-1 $\alpha$  diminue l'expression de ces marqueurs sur les cellules NK de façon beaucoup plus prononcée (Figure 6A et 6E).



**Figure 6.** Diminution de l'expression de NKp46 et de NKp30 à la surface des cellules NK résultant de l'incubation préalable des cellules avec DBL-1 $\alpha$ . L'incubation préalable des cellules effectrices avec DBL-1 $\alpha$  inhibe l'expression de NKp30 et de NKp46 à la surface des cellules NK. Nous avons analysé l'expression de NKp30 et de NKp46 sur les cellules de sujets sains n'ayant

jamais contracté le paludisme. Ces cellules ont été incubées pendant 5 jours avec de l'interleukine (IL-2) seule ou en combinaison avec DBL-1 $\alpha$ , FCR3 ou CAMP en cytométrie en flux.

#### **4. Discussion**

Nous avons antérieurement montré que les cellules NK inhibent la croissance de *P.falciparum* au cours des stades sanguins asexués en détruisant les *Pf*-GRs [14]. L'interaction physique entre les cellules NK et les *Pf*-GRs, condition préalable pour la destruction de *Pf*-GRs, a récemment été rapportée [30], mais très peu est connu sur les événements moléculaires et cellulaires précis impliqués dans l'interaction entre ces deux types cellulaires. Nous montrons dans la présente étude que cette reconnaissance est conservée chez différentes souches de *P.falciparum* malgré la séquence hétérogène de DBL-1 $\alpha$  entre ces différentes souches, et pourrait par conséquent représenter un mécanisme général par lequel les cellules NK reconnaissent et détruisent les *Pf*-GRs. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité que DBL-1 $\alpha$  fixent aussi d'autres protéines inconnues exprimées à la surface des cellules NK, mais nous avons démontré une fixation sélective à DBL-1 $\alpha$  qui stimule la cytolyse médiée par NKp30, et dans une moindre mesure celle médiée par NKp46. Cette démonstration prouvant que DBL-1 $\alpha$  est un ligand activateur de NKp30 et NKp46 révèle un nouveau mécanisme du déclenchement direct de la lyse des *Pf*-GRs par les cellules NK.

La capacité des cellules NK à reconnaître et à détruire les cellules infectées, dangereuses pour l'organisme dépend en grande partie de la fixation de ligands activateurs spécifiques sur les récepteurs de la cytotoxicité, y compris ceux des NCRs (NKp30, NKp44 et NKp46) et des récepteurs activateurs NKG2 du type lectine C exprimés à la surface des cellules cibles [6, 12, 31]. Actuellement, très peu est connu à propos des ligands des NCRs. Il a été suggéré que les protéoglycanes arborant les molécules de sulfate d'héparine pourraient être des composants de structures fixés par NKp30 et NKp46 [32], mais d'autres groupes de recherche n'ont pas pu reproduire cette observation [29]. NKp46 contient deux domaines d'immunoglobulines de type C2 [33].

Nous montrons dans cette étude que le domaine D2 de la membrane proximale suffit à la fixation de DBL-1 $\alpha$ . Il a été rapporté dans la littérature que la capacité de NKp46 à reconnaître les cellules cibles (hemagglutinine du virus de la grippe et la neuraminidase hémagglutinine du virus de Sendai) est restreinte au domaine membranaire proximal et dépend du groupement de sucre conservé portant l'acide aminé Thr225 [34].

L'un des facteurs de confusion concerne la variabilité génétiquement déterminée des individus pour l'activation des cellules NK. En effet, l'activation des cellules NK après l'interaction avec des globules rouges parasités par *P.falciparum* et les globules rouges était décrite comme étant corrélée à une forte expression du récepteur CD94/NKG2A de type lectine, qui déclenche la capacité de production d'interféron gamma des cellules NK [35]. Cette réponse était rapportée comme étant hétérogène entre différents donneurs et avait été considéré comme le reflet du polymorphisme allélique du génotype KIR. Toutefois, la présente étude évalue l'effet cytolytique des cellules NK dans lequel les NCRs activateurs non polymorphiques sont impliqués. En outre, les expériences de blocage soutiennent l'idée que les effets cytotoxiques dirigés contre les *Pf*-GRs dépendent du taux d'expression de NCR. Nos résultats prouvent que les cellules NK reconnaissent les *Pf*-GRs par l'intermédiaire du premier domaine de *Pf*EMP-1, la molécule de DBL-1 $\alpha$ . DBL-1 $\alpha$  n'est pas exprimé à la surface des érythrocytes non parasités. Cela suppose qu'il soit possible que les cellules NK différencient les érythrocytes parasités de ceux non parasités, qui expriment les mêmes glycoprotéines, par l'expression ou non de DBL-1 $\alpha$ . La démonstration que DBL-1 $\alpha$  est nécessaire à la reconnaissance constitue une étape majeure dans l'élucidation du processus de la lyse des *Pf*-GRs par les cellules NK activées. Ces études *in vitro* soulèvent la possibilité que les cellules NK joueraient un rôle dans l'immunité contre le paludisme à *P.falciparum*. Toutefois, comme DBL-1 $\alpha$  a été décrit comme un ligand majeur participant à la fixation à des récepteurs variés [36,37], l'interaction entre les cellules NK et *P.falciparum* mérite une attention plus approfondie.

## **Remerciements**

Nous remercions tous les donneurs de sang anonyme pour leur contribution à l'étude. Nous remercions aussi le Professeur O. Mandelboim, du Centre général Lautenberg d'Immunologie des tumeurs de l'université hébraïque de l'école médicale de Hadassah, Jérusalem, Israël pour le don des réactifs et pour ses conseils avisés. Ce travail a été réalisé grâce à l'appui reçu financier de l'UNICEF/PNUD/Banque Mondiale/OMS par l'intermédiaire du programme spécial de recherches et de formation sur les maladies tropicales (Subvention n° A50073).

## **Références bibliographiques**

1. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47, 187-376, 1989.
2. Ljunggren HH, Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK recognition. *Immunol. Today* 11:237, 1990.
3. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Receptors for HLA-class I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14:619-648, 1996.
4. Lanier LL. Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 6:371-318, 1997.
5. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 23:255-259, 2004.
6. Bottino C, Biassoni R, Millo R, Moretta L, Moretta A. The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I independent NK cell triggering. *Hum Immunol.* 61:1-6, 2000.
7. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 190:1505-1516, 1999.
8. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 189:787-796, 1999.
9. Biassoni R, Pessino A, Bottino C, Pende D, Moretta L, Moretta A. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 29:1014-1020, 1999.
10. Pessino A, Sivori S, Bottino C et al. Molecular cloning of NKp46: novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188:953-960, 1999.
11. Sivori S, Pende D, Bottino C, et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells: correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic, or xenogeneic target cells. *Eur. J. Immunol.* 29:1656-1666, 1999.
12. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and co receptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:197-223, 2001.
13. Arnon TI, Achnout H, Levi O, et al. Inhibition of the NKp30 activation receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6:515-523, 2005.

14. Mavoungou E, Luty AJF, Kremsner 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. Kyes S, Horrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:673-707, 2001.
16. Howard RJ, Barnell JW, Rock EP, et al. Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:207-223, 1988.
17. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675, 1976.
18. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060, 2001.
19. Oguariri RM, Mattei D, Tena-Tomas C, Uhlemann AC, Kremsner PG, Kun JF. Recombinant Duffy binding-like-domains of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 elicits antibodies in rats that recognize conserved epitopes. *Parasitol. Res.* 90:467-472, 2003.
20. Oguariri RM, Borrmann S, Klinkert MQ, Kremsner PG, Kun JF. High prevalence of human antibodies to recombinant Duffy binding-like $\alpha$  domains of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1 in semi-immune adults compared to that in no immune children. *Infect. Immun.* 69:7603-7609, 2001.
21. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, et al. Cloning the *P.falciparum* gene encoding PfEMP-1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82: 77-87, 1995.
22. Curtidor H, Urquiza M, Suarez JE, et al. *Plasmodium falciparum* acid basic repeat antigen (ABRA) peptides: erythrocyte binding and biological activity. *Vaccine* 19:4496-4504, 2001.
23. Hulme EC. Receptor-ligand interactions: a practical approach. New York: Oxford University Press, 1993.
24. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int. J. Parasitol.* 34:1517-1528, 2004.
25. Test R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today.* 15:479-483, 1994.
26. Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, et al. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J. Exp. Med.* 167:1572-1585, 1988.
27. Clausen I, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* 207:85-93, 2003.
28. Warren HS, Jones AL, Freeman C, Battadapura J, Parish CR. Evidence that the cellular ligand for the human NK cell activation receptor NKp30 is not a heparan sulfate glycosaminoglycan. *J. Immunol.* 175:207-212, 2005.
29. Mavoungou E, Bouyou-Akotet MK, Kremsner P. Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30). *Clin. Exp. Immunol.* 139:287-296, 2005.
30. Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM. Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 175:7466-7473, 2005.
31. Augugliaro R, Parolini S, Castriconi R, et al. Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 33: 1235-1241, 2003.
32. Bloustein N, Qimron U, Bar-Ilan A, et al. Membrane associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J. Immunol.* 173:2392-2401, 2004.
33. Pessino A, Sivori S, Bottino C, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188:953-960, 1998.

34. Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, et al. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103:664-672, 2004.
35. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, et al. Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 171:5396-5405, 2003.
36. Barragan A, Fernandez V, Chen Q, Von Euler A, Whalgren M, Spillman D. The Duffy-binding like domain 1 $\alpha$  of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood* 95:3594-3599, 2000.
37. Russel C, Mercereau-Puijalon O, Le Scanf C, Steward M, Arnot DE. Further definition of PfEMP-1 DBL-alpha domains mediating rosetting adhesion of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 144:109-113, 2005.