

Université de Montréal

**Étude de la mort cellulaire via CD40 et BCR en fonction de
l'activation cellulaire.**

par Lydia AOUDJIT

Département de Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)
en Sciences biomédicales
option Médecine expérimentale

Avril, 2017

© Lydia AOUDJIT, 2017

Université de Montréal

**Étude de la mort cellulaire via CD40 et BCR en fonction de
l'activation cellulaire.**

par

Lydia AOUDJIT

A été évalué par un jury composé de :

Dr. Guy Rousseau, président-rapporteur.

Dr. Walid Mourad, directeur de recherche.

Dr. Hassan Fahmi, membre du jury.

Résumé

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (TNFRs). Il est exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques, principalement les cellules B, et les cellules non-hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes. Son principal ligand, le CD154, est exprimé de façon transitoire à la surface de différents types cellulaires tels que les lymphocytes T activés. Le CD40 est capable d'interagir avec les deux formes du CD154: la forme membranaire et la forme soluble.

Le CD40 joue un rôle important dans la réponse immunitaire humorale. Son engagement avec le CD154 induit la prolifération et la différenciation des cellules B, la commutation isotypique des anticorps, la formation du centre germinale, l'augmentation de la génération de cellules B mémoire et la survie des cellules B. D'autres études ont démontré son implication dans la mort cellulaire. En effet, nos études ont démontré que la signalisation via CD40 conduit à une mort rapide des cellules B, principalement observée dans les lignées de cellules B transformées par le virus d'Epstein-Barr (EBV) alors qu'il est bien documenté que son engagement sur des cellules B immatures les protège de la mort induite via le récepteur des cellules B (BCR). Il n'est cependant pas connu si l'effet apoptotique du CD40 se produit dans des lignées de lymphocytes B qui ne sont pas transformées par EBV.

Le travail illustré dans ce mémoire porte sur l'étude du rôle du CD40 dans la mort cellulaire des Ramos qui est un modèle de cellules B immatures, EBV négatives, et à comprendre son influence sur la signalisation apoptotique induite via le BCR. Nos résultats montrent que le CD40 n'induit pas la mort des cellules Ramos mais leur activation par l'ester de phorbol (PMA) les sensibilise à la mort via le CD40, qui est plus significative suite à son interaction avec le ligand (CD154) résistant au clivage. Par contre, cette interaction est aussi capable d'inhiber la mort cellulaire induite via le BCR aussi bien sur les cellules au repos ou activées par le PMA. Cette inhibition de la mort cellulaire est comparable avec les deux formes du CD154.

L'ensemble des études suggèrent que le CD40 peut réguler la réponse immune en induisant des signaux de survie nécessaires à la production d'anticorps et peut participer à la résolution de celle-ci en induisant la mort cellulaire des cellules B activées. Par ailleurs, le CD40 peut aussi constituer une cible thérapeutique pour les traitements des lymphomes B.

Mots-clés : mort cellulaire, BCR, CD40, CD154.

Abstract

CD40 is a type I glycoprotein belonging to the tumor necrosis factor receptor (TNFRs) superfamily. The CD40 is expressed on hematopoietic cells, mainly B cells, and on non-hematopoietic cells such as epithelial cells and fibroblasts. Its classical ligand, CD154, is transiently expressed on different cell types such as activated T cells. CD40 is able to interact with both the membrane-bound and the soluble forms of CD154.

CD40 plays an important role in the humoral immune response. Its ligation with CD154 induces B cell proliferation and differentiation, antibody class switching, germinal center formation, memory B cell generation and B cell survival. Other studies have demonstrated its implication in cell death. Indeed, our studies have demonstrated that signalling via CD40 leads to a rapid B cell death mainly observed in Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cell lines, although it is well documented that the engagement of CD40 on immature B cells rescues them from IgM-mediated death. However, it is unknown if CD40-mediated cell death occurs in non-EBV B cell lines.

The work presented in this thesis focuses on the study of the role of CD40 in Ramos cell death, which is an immature B-cell model, EBV negative, and on its influence on the apoptotic signaling induced via the B-cell receptor (BCR). Our results show that CD40 is unable to induce Ramos cell death but Ramos activation with the phorbol ester (PMA) sensitises them to death via CD40, which is more significant following its interaction with the ligand (CD154) resistant to cleavage. However, CD40 interaction with CD154 is also able to protect both resting and activated Ramos from BCR-mediated death and this occurs equally well with both forms of CD154.

Together these studies suggest that CD40 can regulate the immune response by delivering survival signals necessary for antibody production and can contribute to the resolution of the immune response by inducing death in activated B cells. Furthermore, CD40 can also represent a therapeutic target in B cell lymphomas.

Keywords: cell death, BCR, CD40, CD154.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xii
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 La mort cellulaire.....	2
1.1.1 Différentes formes de mort cellulaire	2
1.1.1.1 La nécrose	3
1.1.1.2 L'apoptose.....	4
1.1.2 Les différentes phases de la mort cellulaire	5
1.1.2.1 La phase d'activation.....	5
1.1.2.2 La phase de contrôle	5
1.1.2.2.1 La famille des protéines BCL2	5
1.1.2.2.2 Les mitochondries.....	7
1.1.2.3 La phase d'exécution.....	7
1.1.2.3.1 Les caspases	7
1.1.3 Les Récepteurs impliqués dans la mort cellulaire.....	8
1.1.3.1 CD95-CD95L (Fas-Fas ligand).....	9
1.1.3.2 Le TNFR1	11
1.1.3.3 TRAIL-R1 et TRAIL-R2	12
1.2 BCR.....	12
1.2.1 Structure du BCR.....	12
1.2.2 Expression du BCR.....	14
1.2.3 Voies de signalisation et rôle dans l'activation des cellules B	14
1.3 Le CD40.....	18
1.3.1 La structure du CD40.....	19
1.3.2 L'expression du CD40 à la surface des cellules	20
1.3.2.1 Expression du CD40 sur les cellules B	20

1.3.2.2	Autres types cellulaires exprimant le CD40	20
1.3.3	Le CD154: Principal Ligand du CD40	21
1.3.4	La signalisation intracellulaire du CD40	22
1.3.4.1	Activation des protéines tyrosine kinase.....	22
1.3.4.2	Activation des protéines sérine/thréonine kinase.....	23
1.3.4.3	Activation des protéines associées au CD40	23
1.3.4.3.1	La famille des TRAFs.....	23
1.3.4.3.2	Autres molécules associées.....	25
1.3.5	Le rôle du CD40 dans la réponse immunitaire	26
1.3.6	Le rôle du CD40 dans la mort cellulaire.....	27
1.3.7	CD40: une cible thérapeutique dans de nombreuses maladies	28
	RATIONNEL ET OBJECTIS.....	30
	Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	32
	Chapitre 3 : Résultats	36
3.1	L'activation des cellules Ramos les sensibilise à la mort via le CD40	37
3.2	Les cellules Ramos activées restent sensibles à la mort via le BCR	38
3.3	Inhibition de la mort des Ramos induite via le BCR suite à l'engagement de leur CD40 avec l'anticorps monoclonal G28.5	39
3.4	L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec son ligand naturel le CD154 inhibe la mort via le BCR	39
3.5	L'interaction du CD40 à la surface des Ramos activées avec le CD154 résistant augmente leur sensibilité à la mort.....	40
3.6	L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec le CD154 wt ou le CD154 résistant inhibe la mort via le BCR d'une façon comparable	41
	Chapitre 4 : Discussion	51
	Chapitre 5 : Conclusion et perspectives	57
	Bibliographie	59

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1. Changement morphologique lors de l'apoptose vs nécrose.....	4
Figure 2. Membres de la famille des protéines Bcl-2.....	6
Figure 3. Activation des caspases	8
Figure 4. Les Différents récepteurs de mort et leurs ligands	9
Figure 5. Mort cellulaire via Fas/Fas L.....	11
Figure 6. Structure du BCR et de son précurseur le Pré-BCR.....	13
Figure 7. Le récepteur des cellules B et les radeaux lipidiques dans le développement des cellules B.....	16
Figure 8. Voies de signalisation via BCR.....	17
Figure 9. Structure du gène et de la protéine du hCD40.....	19
Figure 10. Structure du gène et de la protéine du hCD154.....	21
Figure 11. Structure des différents membres des TRAFs	24
Figure 12. Signalisation CD40 TRAFs-dépendante et indépendante.	26

Chapitre 3 : Résultats

Figure 1. L'activation des cellules Ramos les sensibilise à la mort via CD40 par son engagement avec l'anticorps monoclonal G28.5.....	42
Figure 2. Stratégie d'analyse de la mort des Ramos dans le système de co-culture.....	43
Figure 3. L'activation des cellules Ramos les sensibilise à la mort via CD40 par interaction avec leur ligand naturel le CD154.	44
Figure 4. Les cellules Ramos activées restent sensibles à la mort via le BCR	45
Figure 5. L'engagement du CD40 à la surface des Ramos avec le G28.5 inhibe la mort via le BCR.....	46
Figure 6. L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec son ligand naturel le CD154 inhibe la mort via le BCR	47
Figure 7. Le CD40 lie le hCD154 wt et le hCD154 résistant.	48
Figure 8. L'interaction du CD40 avec le hCD154 résistant à la surface des Ramos activées les rend plus sensibles à la mort.	49

Figure 9. L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec le hCD154 wt ou le hCD154 résistant inhibe la mort via le BCR d'une façon comparable : 50

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF: Facteur d'induction d'apoptose

ATP: Adénosine triphosphate

BCR: Récepteur des cellules B

CD40L: CD40 Ligand

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

DAG: Diacylglycérol

DAMP: Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires

DD: Domaine de mort

DED: Domaine effecteur de mort

DISC: Complexe de signalisation inducteur de mort

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

E112 : Acide glutamique

EBV : Virus d'Epstein Barr

ERK: Kinase régulée par des signaux extracellulaires

FADD: Protéine associée à Fas avec un DD

FBS: Sérum fœtal bovin

GAM: Chèvre anti-souris

HDGF: Facteur de croissance dérivé de l'hépatome

HEK: Cellules rénales embryonnaires humaines

hIgG : IgG humaine

HMGB1: Protéine B1 du groupe de haute mobilité

HSP70: Protéine de choc thermique 70

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IP3: Inositol triphosphate

ITAM: Motifs d'activation des immuno-récepteurs basé sur la tyrosine

Jak3: Janus kinase 3

JNK: Kinase N-terminale c-jun

LMP-1 : Protéine membranaire latente-1

M113 : Méthionine

MAPK: Protéine kinase à action mitogène

NF-kB: Facteur nucléaire kB

NK: Cellules tueuses naturelles

PARP: Poly (ADP-Ribose) polymérase

PI : Iodure de propidium

PKC : Protéine kinase C

PMA : Phorbol myristate acétate

PSG : Pénicilline, Streptomycine et L-Glutamine

PTK: Protéine tyrosine kinase

RIP: Protéine interagissant avec les récepteurs

sCD154: soluble CD154

TCR: Récepteur des cellules T

TNF: Facteur de nécrose tumorale

TNFRs : Récepteurs des TNF

TRADD: Protéine associée au récepteur TNFR1 avec un DD

TRAFs: Facteurs associés au TNFRs

TRAIL: Ligand inducteur d'apoptose relié au TNF

WT : Wild-type

Je dédie ce mémoire à

Mes parents

Mes beaux-parents

Mon mari

Ma petite princesse Maelys

Mon frère

Remerciements

L'aboutissement de mon travail par ce mémoire s'est fait grâce au concours de plusieurs personnes qui m'ont supporté, conseillé et soutenu tout le long de mon parcours.

Mes premiers remerciements et ma reconnaissance vont tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr Mourad Walid qui m'a accueilli et offert l'opportunité de rejoindre son laboratoire au CHUM, pour sa disponibilité et son support ainsi que pour ses judicieux conseils qui ont grandement contribué à améliorer mon travail.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire et plus particulièrement Loubna, Meriem et Suzanne pour leur soutien, leurs encouragements et leur contribution durant toute cette période.

Je tiens aussi à exprimer mon profond respect et gratitude aux membres du jury, Dr Guy Rousseau et Dr Hassan Fahmi qui ont accepté et trouver le temps d'évaluer mon travail.

Enfin, un grand Merci à mes parents qui ont toujours été à mes côtés, à mes beaux-parents pour leur soutien, à mon mari qui m'a beaucoup soutenu et aidé, à tous les membres de notre famille ici au Québec qui ont beaucoup contribué à la réussite de mon projet ainsi qu'à tous nos proches en Algérie et tous mes amis pour leurs encouragements.

Chapitre 1: Introduction

Notre système immunitaire nous protège et nous défend en permanence contre toutes les agressions des agents pathogènes qui nous entourent. C'est un ensemble complexe faisant intervenir de nombreux organes, cellules et autres molécules. L'immunité innée ou naturelle constitue la première ligne de défense qui est immédiate et généralement non spécifique alors que l'immunité adaptative ou acquise est plus lente nécessitant l'intervention de cellules effectrices spécifiques impliquant les lymphocytes T et B. La réponse humorale implique principalement les lymphocytes B et aboutit à la sécrétion d'anticorps spécifiques permettant l'élimination de l'agent pathogène. Cette réponse est initiée par la reconnaissance de l'antigène par le récepteur des cellules B (BCR) qui sera internalisé, manipulé et présenté à la surface par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). La reconnaissance du complexe peptide/CMHII par le récepteur des cellules T (TCR) est à l'origine du premier signal d'activation des cellules B et permet aux cellules T la sécrétion et l'expression de différentes molécules qui amplifient le signal d'activation des cellules B. Ainsi, l'interaction du CD154 à la surface des cellules T activées avec le CD40 des cellules B joue un rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules B. Le CD40 joue ainsi un rôle clé dans la réponse immunitaire humorale mais intervient aussi dans la réponse à médiation cellulaire, son engagement à la surface de plusieurs types cellulaires mène à une variété de réponses le plus souvent associée à la survie mais ces dernières années des études ont démontré son implication dans la mort cellulaire mettant en évidence son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

1.1 La mort cellulaire

L'homéostasie organique dépend d'un équilibre complexe entre la prolifération et la mort cellulaire qui est nécessaire pour l'équilibre des populations cellulaires, des tissus et des organes.

1.1.1 Différentes formes de mort cellulaire

Plusieurs formes de mort cellulaire ont été décrites qui se distinguent chacune par des changements morphologiques particuliers tout au long du processus [1]. Les deux formes majeures de mort cellulaire sont l'apoptose et la nécrose qui interviennent de manière générale

dans des contextes différents. Il existe néanmoins des similitudes entre la mort cellulaire apoptotique et la mort cellulaire nécrotique. En effet, les stimuli, les molécules et les voies de signalisation impliqués peuvent être les mêmes. La différence majeure réside dans les caractéristiques morphologiques (Figure 1) de la cellule et les conséquences sur son environnement avoisinant.

1.1.1.1 La nécrose

Le terme «nécrose» était utilisé pour tous les types de mort cellulaire jusqu'en 1971. Cette année-là, Kerr, Wyllie et Currie observent une mort non pathologique dans certains tissus, ils la nomment alors «nécrose contractée» avant de la rebaptiser Apoptose en 1972.

La nécrose correspond à un processus de mort accidentel qui échappe au contrôle de l'organisme, survenant suite à des événements pathologiques tel que l'hypoxie. C'est un phénomène passif caractérisé par une inhibition de la production d'ATP. La caractéristique fondamentale qui distingue la plupart des formes de la nécrose de l'apoptose est la perte rapide du potentiel membranaire. Ainsi, l'incapacité de maintenir ce potentiel électrochimique entraîne un gonflement cytoplasmique, la rupture de la membrane plasmique et cytolysse [2].

La perte de l'intégrité de la membrane plasmique entraîne la libération du contenu cellulaire. Ainsi, différentes composantes cellulaires se retrouvent dans le milieu tels que les lysosomes et les protéases responsables du déclenchement d'une réponse inflammatoire provoquée par l'activation des macrophages environnants et libération de cytokines [3]. Bien que la majeure partie du contenu intracellulaire soit libérée de la membrane plasmique pendant la nécrose, une poignée de molécules ont été identifiées à ce jour qui peuvent induire une réponse immune telles que les DAMP (Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires) ou encore la protéine B1 du groupe de haute mobilité (HMGB1) [4]. D'autres molécules immunostimulatrices sont libérées par les cellules nécrotiques telles que adénine phosphate [5, 6], l'acide urique [7], et les protéines du choc thermique [8-10]. En plus de la réponse pro-inflammatoire, il y a activation des voies de signalisation favorisant la croissance cellulaire et la réparation tissulaire suite à la libération de molécules telles que le facteur de croissance dérivé de l'hépatome (HDGF) [11].

Par ailleurs, pas de changements notables au niveau du noyau durant la nécrose, contrairement à l'apoptose, il n'y a pas de condensation de la chromatine [2].

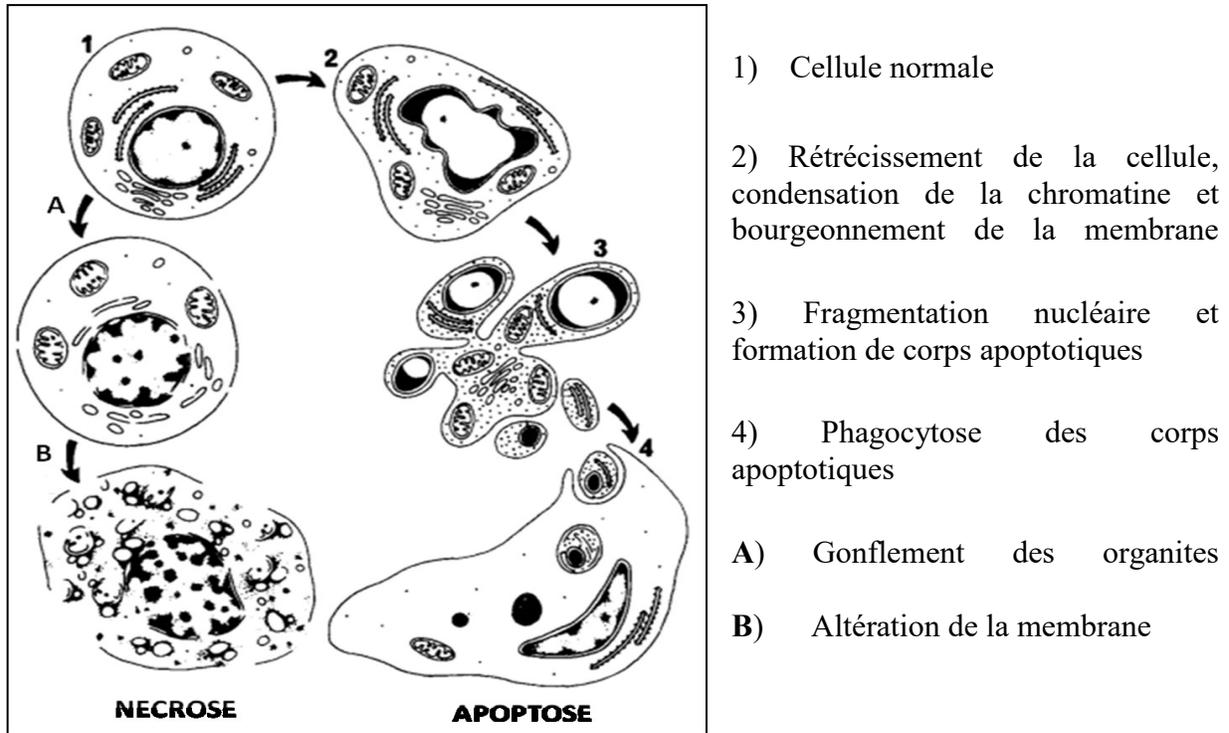


Figure 1. Changement morphologique lors de l'apoptose vs nécrose (Kerr et coll. 1994) [12].

1.1.1.2 L'apoptose

Contrairement à la nécrose considérée comme une mort cellulaire passive, l'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus actif qui dépend de l'ATP [2], hautement contrôlé et ordonné jouant un rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire notamment celle du système immunitaire et assure le bon fonctionnement des organismes multicellulaires.

L'apoptose a été décrite grâce à des observations en microscopie électronique à transmission. Elle aboutit à la formation de corps apoptotiques qui exposent à leur surface des résidus de phosphatidylsérines qui seront reconnus et phagocytés notamment par des macrophages. Ainsi, l'apoptose ne conduit pas à une réaction inflammatoire grâce à la formation de ces corps apoptotiques qui empêchent le déversement du contenu cellulaire dans

le milieu. Cette formation des corps apoptotiques est précédée de plusieurs événements: condensation de la chromatine le long de l'enveloppe nucléaire, fragmentation nucléaire, dégradation de l'ADN, condensation du noyau et du cytoplasme, rétrécissement de la cellule et bourgeonnement de la membrane cytoplasmique [13].

1.1.2 Les différentes phases de la mort cellulaire

1.1.2.1 La phase d'activation

La mort cellulaire peut être déclenchée par différents signaux intra ou extra-cellulaires. Il peut s'agir de signaux émis à la suite de dommages subis par l'ADN (radiations, agents cytotoxiques), ou sur les organites tels que le réticulum endoplasmique, ou par des signaux hormonaux. La mort cellulaire peut aussi être induite par l'engagement de certains récepteurs membranaires "Death receptors" tels que TNFR1, Fas, TRAIL R1/R2 [14] ou encore suite à une carence en facteurs de croissance. En effet, la présence permanente de certains facteurs de croissance est nécessaire à la survie cellulaire dont la privation active le signal apoptotique.

1.1.2.2 La phase de contrôle

Plusieurs molécules interviennent dans cette phase de contrôle qui selon le contexte ont des propriétés pro et/ou anti-apoptotiques.

1.1.2.2.1 La famille des protéines BCL2

Les membres de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma (gene) 2*) sont des protéines caractérisées par la présence d'au moins un des quatre domaines conservés Bcl-2 Homology (BH1,2,3 et 4). Ces molécules sont des régulateurs importants de l'apoptose, classées en deux sous-familles de protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques (Figure 2). Elles transmettent des signaux de survie ou de mort à l'intérieur de la cellule.

Les membres de la famille pro-apoptotique ne possèdent pas de domaine BH4; on distingue les protéines multi-domaines possédant les régions d'homologie BH1,2 et 3 comme Bax [15], Bak [16] et Bok [17], et les protéines possédant uniquement le domaine BH3 connus sous le nom de "BH3-only" tels que Bad, Bid ou encore Bik [18]. Les membres anti-

apoptotiques partagent trois ou quatre domaines d'homologie, Bcl-2 [19] et Bcl-xl [20] font partie de ce groupe. En condition pro-apoptotique, le groupe des "BH3-only" active les protéines multi-domaines Bax et Bak favorisant ainsi leur oligomérisation et provoque la perméabilisation des mitochondries et la libération de facteurs apoptotiques tels que l'AIF (Facteur d'induction d'apoptose) et l'endonucléase G.

La protéine Bcl-2 anti-apoptotique est capable d'inhiber l'apoptose en agissant à différents niveaux notamment en empêchant la translocation des Bax/Bak vers la mitochondrie ou en inhibant les "BH3-only" [20].

L'équilibre entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques décide de la vie ou la mort de la cellule.

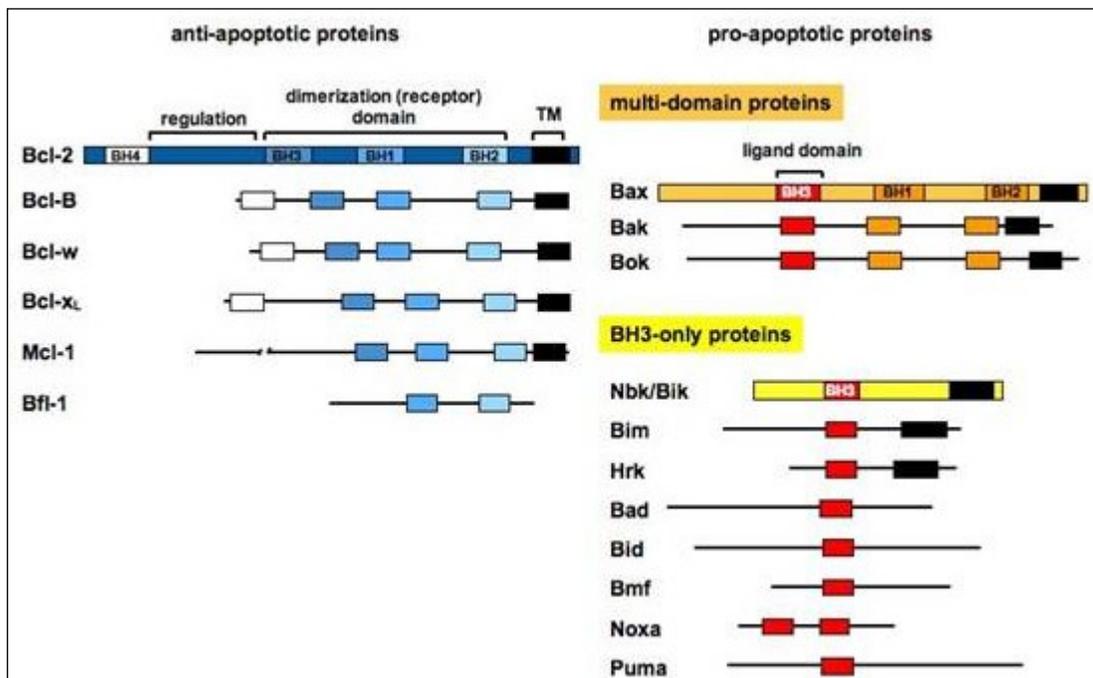


Figure 2. Membres de la famille des protéines Bcl-2 : Tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins une région d'homologie, classés selon leur capacité d'inhiber ou d'activer la mort cellulaire. Les membres pro-apoptotiques sont subdivisés en deux sous-groupes: protéines multi-domaines et les "BH3-only" (Forro G. 2009) [21].

1.1.2.2.2 Les mitochondries

Une multitude d'évènements clés survenant lors de l'apoptose mettent l'accent sur les mitochondries, qui jouent un rôle dans le contrôle et la régulation du processus et initient la voie intrinsèque de l'apoptose dite la voie mitochondriale. Cette voie est généralement induite par des signaux internes notamment lors des dommages de l'ADN mais aussi par la voie des récepteurs de mort et aboutit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et libération dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome C, Smac/Diablo, AIF ou encore l'endonucléase G. Le cytochrome C va se lier à la protéine adaptatrice Apaf-1 (*Apoptotic protease activating protein1*) qui une fois activée lie à son tour la procaspase-9, formant ainsi un complexe trimoléculaire appelé l'apoptosome. La procaspase-9 est alors activée en caspase-9 qui induira le clivage de la procaspase-3 en une caspase effectrice, la caspase-3 [3]. Smac/DIABLO ciblent et inhibent les protéines de la famille des IAP (Inhibiteur de l'apoptose) favorisant ainsi l'activité des caspases [22]. Le facteur AIF est redistribué vers le cytosol puis vers le noyau cellulaire pour induire une mort par apoptose qui a la particularité d'être indépendante des caspases [23].

D'autres organites sont aussi impliqués dans la mort cellulaire programmée tels que le réticulum endoplasmique et les lysosomes qui libèrent suite à la perméabilisation de leurs membranes, des protéases comme les cathépsines qui activent les protéines pro-apoptotiques Bax et Bid.

1.1.2.3 La phase d'exécution

1.1.2.3.1 Les caspases

Les caspases (cysteinyll aspartate protéinases) sont des protéines clés dans le processus apoptotique. Elles clivent spécifiquement leurs substrats après un résidu aspartate [24]. Elles sont synthétisées sous forme inactives, les procaspases, composées de trois domaines: un prodomaine N-terminal, dont la longueur varie, un large domaine appelé p20 et un petit domaine p10. En réponse à certains stimuli, elles sont activées soit par clivage protéolytique par d'autres caspases ou par autocatalyse [25, 26] pour former un tétramère composé de deux hétéro-dimères p20/p10 (Figure 3).

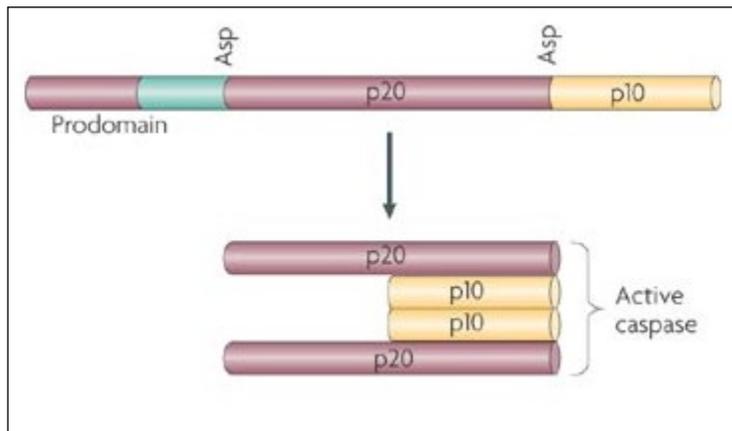


Figure 3. Activation des caspases : Une fois activées, les caspases clivent leurs substrats après des résidus d'aspartate conservés (Clarke P. et Tyler K.L. 2009) [27].

On dénombre 14 membres de la famille des caspases. On distingue les caspases initiatrices ou activatrices et les caspases effectrices qui sont les principales responsables de la protéolyse des substrats cellulaires dans les cellules apoptotiques [20]. Dans le cas des caspases initiatrices (caspases -1,-2,-4,-5,-8,-9,-10 et -12), le prodomaine de la forme inactive est plus long que celui des caspases effectrices, il contient des sites d'interaction protéine-protéine. Il s'agit du domaine DED (Domaine effecteur de mort) dans le cas de la caspase-8,-10 et du domaine CARD, (Domaine de recrutement des caspases) dans le cas de la caspase-2 et -9 [28]. Le domaine CARD va permettre à ces caspases d'interagir avec des molécules adaptatrices telles que FADD (Protéine associée à Fas avec un DD) ou Apaf-1 respectivement.

1.1.3 Les Récepteurs impliqués dans la mort cellulaire

Les récepteurs impliqués dans la mort cellulaire font partie de la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (TNFRs). Ce sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité intracellulaire C-terminale comporte une séquence de 80 acides aminés formant un "domaine de mort" (DD). Ce domaine est essentiel pour la transduction du signal apoptotique initiant ainsi la voie extrinsèque de l'apoptose suite à leur

activation par des ligands spécifiques [29]. On compte parmi les membres de cette famille: Fas, TNFR1 ou encore TRAIL-R1/R2 (Figure 4).

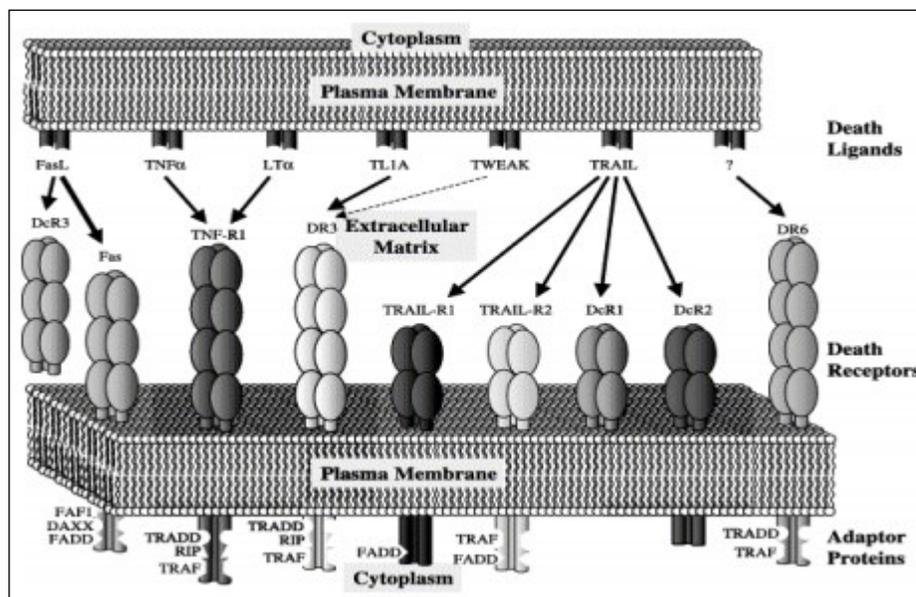


Figure 4. Les Différents récepteurs de mort et leurs ligands : Les ligands des récepteurs de mort sont majoritairement membranaires. Les protéines adaptatrices recrutées par ces récepteurs sont aussi représentées: FADD, TRADD (Curtin et Cotter, 2003) [14].

1.1.3.1 CD95-CD95L (Fas-Fas ligand)

Fas (CD95/Apo1) est un récepteur transmembranaire glycosylé de type I, exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires et composé de 335 acides aminés. Son poids moléculaire est d'environ 45 à 52 kDa. Son ligand (FasL/CD95L) est exprimé de façon plus restreinte, essentiellement sur les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules tueuses naturelles (NK).

Après interaction avec son ligand, le CD95 est activé et se trimérise, cette oligomérisation du Fas est nécessaire pour la transduction du signal apoptotique. En effet, les dimères CD95 ne provoquent pas l'apoptose [30]. Comme pour les autres récepteurs de mort, le CD95 recrute des protéines impliquées dans l'apoptose par l'intermédiaire de protéines

adaptatrices. Ainsi, une fois activés, les trimères du CD95 recrutent des protéines adaptatrices FADD [31, 32], qui comportent des domaines DD qui reconnaissent et lient les domaines DD correspondant de la partie cytoplasmique du CD95. FADD lie à son tour des caspases initiateuses (procaspases-8 et -10) par interaction avec leur domaines DED respectifs formant ainsi le complexe DISC (Complexe de signalisation inducteur de mort) qui conduit à l'activation autocatalytique des caspases initiateuses telles que la procaspase-8 qui une fois activée en caspase-8 active directement la procaspase-3 en caspase-3 ou indirectement en empruntant la voie mitochondriale amplifiant ainsi le signal apoptotique. L'activation indirecte de la procaspase-3 intervient après clivage de la protéine pro-apoptotique BID qui active Bak et Bax au niveau de la mitochondrie induisant la libération du cytochrome c et formation de l'apoptosome [33, 34].

La mort cellulaire via Fas peut être régulée par certaines molécules telles que FLIP (Protéine inhibitrice de FLICE). FLIP partage des séquences homologues avec caspase-8 bien qu'ils soient codés par des gènes distincts. Il possède notamment des domaines DED qui peuvent lier FADD en compétition avec la procaspase-8. Une surexpression in vivo de FLIP empêche ainsi le recrutement et l'activation de procaspase-8 au sein du complexe DISC [35] et inhibe par conséquent la mort médiée par Fas (Figure 5).

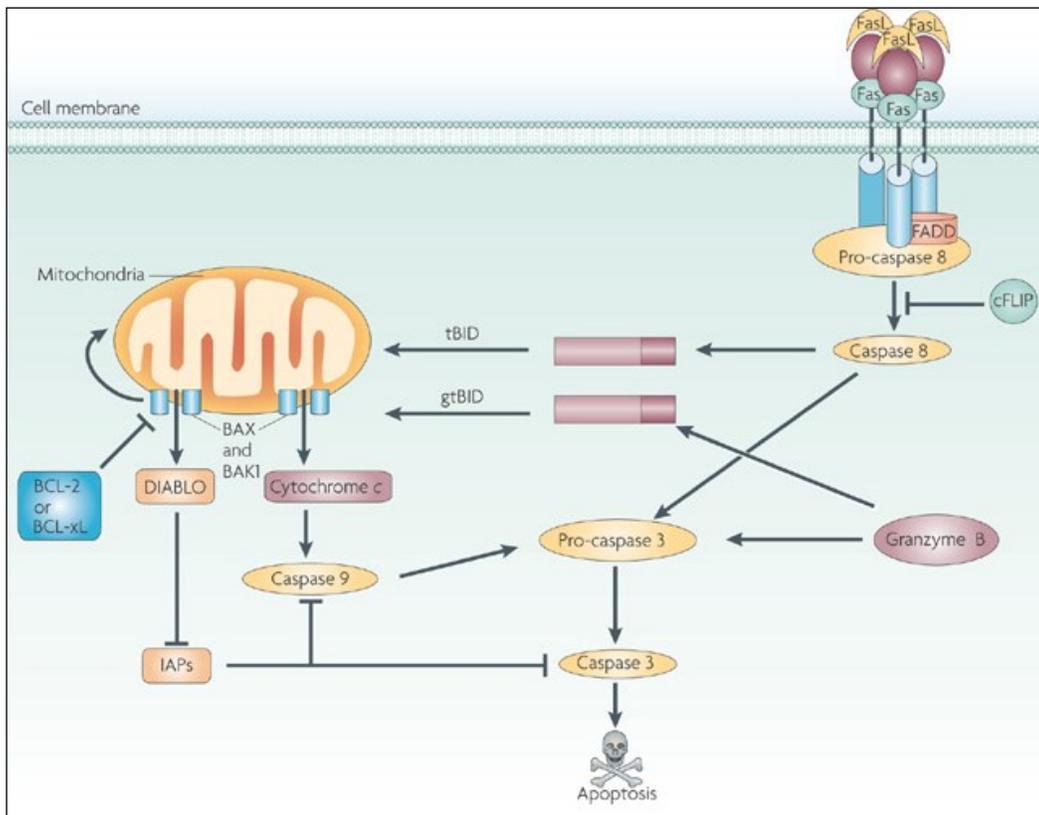


Figure 5. Mort cellulaire via Fas/Fas L : L'interaction Fas/FasL conduit directement à l'activation de la caspase-3 ou indirectement en empruntant la voie mitochondriale (Clarke P. et Tyler K.L. 2009) [27].

1.1.3.2 Le TNFR1

Le TNFR1 est l'un des principaux récepteurs qui se lient au TNF- α . Ce récepteur peut activer le facteur de transcription NF- κ B, réguler l'inflammation mais aussi médier l'apoptose. Le TNFR1 comme Fas doit recruter des protéines adaptatrices pour aboutir à la formation du complexe DISC et l'activation de la caspase-3 mais contrairement au Fas qui interagit avec FADD, le TNFR1 activé fixe aussi le TRADD (Protéine associée au récepteur TNFR1 avec un DD) qui possède des sites de liaison pouvant être reconnu par le RIP (Protéine interagissant avec les récepteurs) qui en s'associant avec TRAF-2 aboutit à l'activation du NF- κ B [36, 37].

1.1.3.3 TRAIL-R1 et TRAIL-R2

TRAIL (Ligand inducteur d'apoptose relié au TNF) fut identifié pour la première fois en 1995 et décrit pour induire une mort de type apoptotique de diverses cellules cancéreuses [38]. TRAIL est capable de lier plusieurs récepteurs notamment TRAIL-R1 et TRAIL-R2 faisant partie des récepteurs de mort. Leur interaction avec leur ligand TRAIL induit leur oligomérisation [39] suivi du recrutement de la protéine adaptatrice FADD [40], ce qui aboutit au final à l'activation de la caspase-3. Cette signalisation est régulée par d'autres récepteurs de TRAIL: TRAIL-R3 [41] et TRAIL-R4 [42] dont la liaison à TRAIL n'induit pas de signal apoptotique et favorise la survie par un effet de compétition.

1.2 BCR

Les cellules B jouent un rôle central dans la réponse immunitaire adaptative par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques et spécialisés appelés BCR qui contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules B [43]. Ils sont comme les récepteurs des cellules T (TCR), des molécules de reconnaissance de l'antigène.

1.2.1 Structure du BCR

Le BCR est composé d'une immunoglobuline membranaire qui est associée par sa région transmembranaire à une sous-unité de signalisation, un hétérodimère CD79a/CD79b, également appelé $I\alpha /I\beta$ [44]. Cette immunoglobuline comprend deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques reliées entre-elles de manière covalente par des ponts disulfures. Chacune des chaînes lourdes et légères contient des régions constantes à leur extrémité carboxyle et des régions variables à leur extrémité N-terminale. Ces dernières représentent le site de liaison à l'antigène et sont différentes pour chaque lymphocyte B qui produit ainsi des immunoglobulines d'une spécificité unique. Le BCR est donc caractérisé par une vaste gamme de spécificité antigénique, cette diversité est le résultat de recombinaisons des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères.

Contrairement aux TCR qui ne peuvent reconnaître l'antigène que sous forme de peptide présenté par les molécules du CMH après dégradation de l'antigène et sa manipulation dans les cellules présentatrices, les BCR procurent aux cellules B la propriété de reconnaître directement les épitopes antigéniques natifs.

Les BCR ne sont pas impliqués directement dans la transduction du signal car ils possèdent une très courte région intra-cytoplasmique. L'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ qui possède une plus longue portion intracellulaire, est responsable de la transmission du signal intracellulaire après contact avec l'antigène. L' $Ig\alpha$ et l' $Ig\beta$ contiennent dans leur domaine cytoplasmique C terminal, un motif ITAM (Motifs d'activation des immuno-récepteurs basé sur la tyrosine). Ce motif contient des résidus tyrosine qui jouent un rôle central dans l'activation des cellules B (Figure 6).

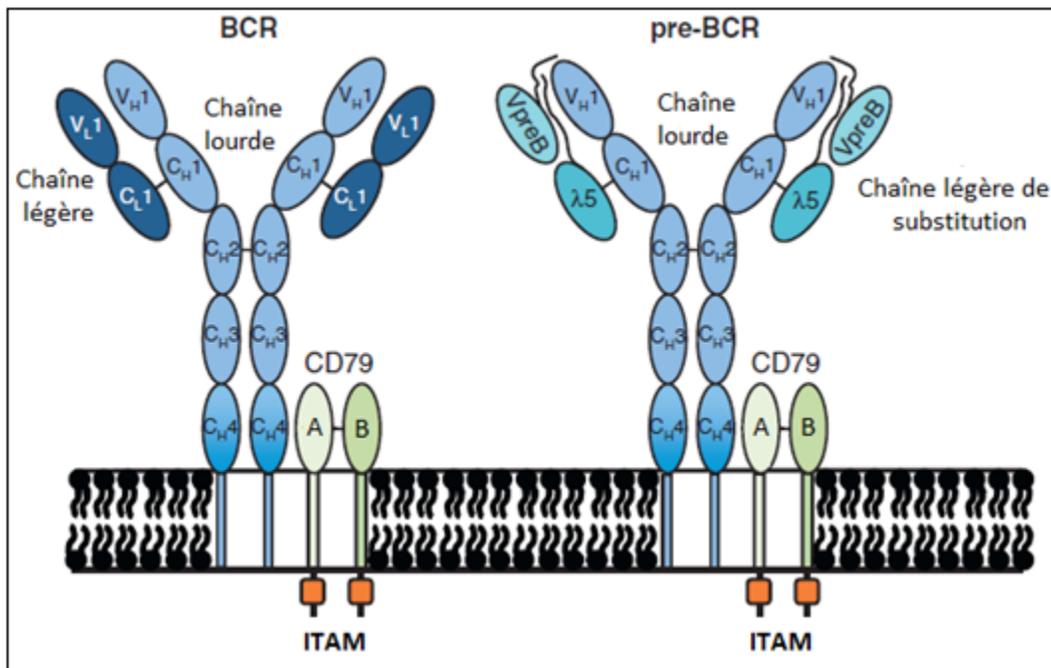


Figure 6. Structure du BCR et de son précurseur le Pré-BCR : Les deux récepteurs sont représentés sous forme monomérique associés aux deux sous-unités du CD79 (CD79a/CD79b) (Berry R. et coll. 2011) [45].

1.2.2 Expression du BCR

Les lymphocytes B dérivent des cellules souches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse qui se différencie par la suite en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Une partie de ces CLP se développera en cellule B, on parlera de cellules pro-B qui se caractérisent par des réarrangements des gènes d'immunoglobulines codant la chaîne lourde. C'est au stade de pré-B que le complexe pré-BCR est formé par l'association des chaînes lourdes avec un complexe de chaîne légère de substitution constitué des protéines V_{pré-B} et $\lambda 5$. Le pré-BCR exprimé à la surface des cellules pré-B associé à l'hétérodimère Ig α /Ig β permettra à ces cellules de se différencier en cellules B immatures exprimant le BCR où la chaîne de substitution est remplacée par une chaîne légère réarrangée κ ou λ (Figure 7). Les cellules B acquièrent donc leur BCR au cours de leur développement dans la moelle osseuse.

Les IgM représentent avec les IgD, le type de BCR le plus fréquemment exprimé par les cellules B. Les BCR des lymphocytes B matures sont de type IgM et IgD [46, 47], alors que les BCR des lymphocytes B mémoires sont de type IgM et IgG.

1.2.3 Voies de signalisation et rôle dans l'activation des cellules B

Les lymphocytes B peuvent être activés par différentes formes d'antigènes. De nombreuses études chez la souris ont montré que les antigènes polyvalents sont plus efficaces que les antigènes monovalents pour induire une réponse humorale [48]. D'autres études ont également montré que les cellules B étaient plus efficacement activées par des antigènes membranaires [49]. Cependant, de petits antigènes solubles tel que l'ovalbumine sont capables d'activer les cellules B *in vivo* [50, 51]. En général, les antigènes polyvalents sont plus puissants que les antigènes monovalents pour induire une signalisation via BCR dans les cellules B cultivées. Ceci se traduit par une augmentation de la phosphorylation des motifs ITAM et de la réponse au calcium [52-56]. Néanmoins, plusieurs groupes ont montré que des antigènes monovalents peuvent activer des cellules B, également *in vitro* [52, 54, 57].

Les cellules B peuvent également être activées par exposition à divers anticorps anti-immunoglobuline mais seuls les fragments bivalents F(ab')₂ de ces anticorps peuvent

efficacement activer le BCR [58]. D'une manière générale, l'état de développement de la cellule B dicte le résultat de l'engagement du BCR [59-61] (Figure 7).

La rencontre de l'antigène au stade immature élimine les cellules B auto-réactives par apoptose ou anergie. Dans le cas contraire, elle progresse vers le stade mature, au cours duquel la rencontre avec l'antigène conduit à l'activation. En plus, l'association du BCR avec les radeaux lipidiques semble jouer un rôle important dans l'activation des cellules B. En effet, une corrélation existe entre l'association du BCR avec les radeaux lipidiques et leur capacité à induire un signal d'activation.

Dans les cellules B matures au repos, les BCR sont exclus des radeaux lipidiques, mais elles les rejoignent rapidement dans les minutes qui suivent leur rencontre avec l'antigène. En revanche, dans les lymphocytes B immatures, la liaison de l'antigène au BCR n'induit pas d'association stable du BCR avec les radeaux lipidiques, le signal via le BCR, exclu des radeaux lipidiques, conduit alors à l'apoptose [62, 63]. Dans les cellules pré-B, une proportion significative du BCR (Pré-BCR) est associée de manière constitutive aux radeaux [64]. Bien que la fonction de signalisation du pré-BCR ne soit pas connue, il est probable que le pré-BCR associé aux radeaux pourrait générer un signal de survie et de prolifération nécessaires pour leur développement.

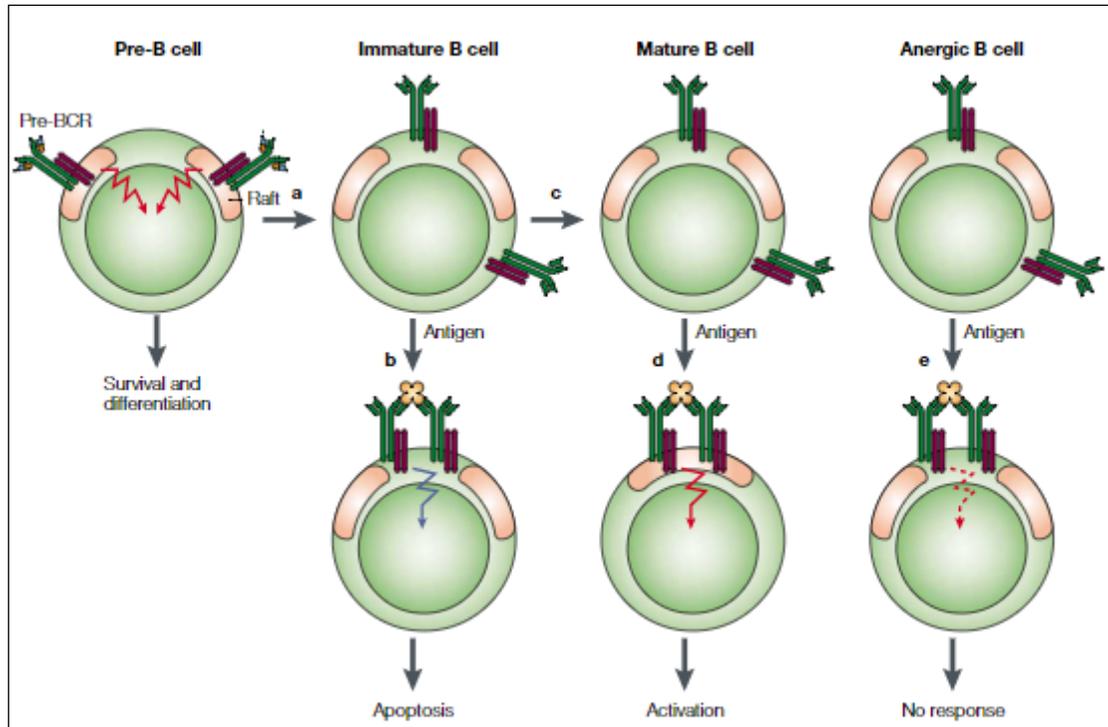


Figure 7. Le récepteur des cellules B (BCR) et les radeaux lipidiques dans le développement des cellules B :

Dans les cellules pré-B, le pré-BCR est constitutivement associé aux radeaux lipidiques, le signal via Pré-BCR conduit au réarrangement des chaînes légères et à la différenciation en cellules B immatures (a) Au stade de cellules B immatures, le BCR est exclu des radeaux lipidiques même après liaison avec l'antigène ce qui conduit à l'apoptose (b) Si la cellule B immature ne rencontre pas d'antigène, le développement se poursuit au stade de cellules B matures (c) Dans les cellules B matures, la liaison de l'antigène conduit au recrutement du BCR dans les radeaux lipidiques et à l'activation des cellules B (d) Le BCR, exprimé par les cellules B tolérantes ou anergiques à la suite d'une exposition chronique à l'antigène, est exclu des radeaux lipidiques même après liaison de l'antigène, et ne parvient pas à activer ces cellules (e) (Pierce, S.K. 2002) [65].

L'activation des cellules B commence par l'interaction entre l'antigène et les immunoglobulines de surface. Le recrutement rapide des BCR au niveau des radeaux lipidiques servirait au rapprochement de la protéine tyrosine kinase (PTK) Lyn qui est constitutivement associée aux radeaux lipidiques et facilite la phosphorylation par Lyn des motifs ITAM au niveau des queues cytoplasmiques du dimère $I\alpha/I\beta$ associé au BCR déclenchant ainsi une cascade de signalisation [66]. La PTK Syk lie rapidement les ITAMs

phosphorylés, qui ainsi activée recrute et phosphoryle la protéine adaptatrice BLNK [67, 68] qui organise un signalosome contenant la Btk (Bruton's tyrosine kinase) et la phospholipase PLC γ 2 [69]. La PLC γ 2 activée induit l'hydrolyse de PIP2 en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) et aboutit à l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium et à l'activation de la protéine kinase C (PKC). Ce qui active différents facteurs de transcription dont NF κ B et NFAT (Figure 8).

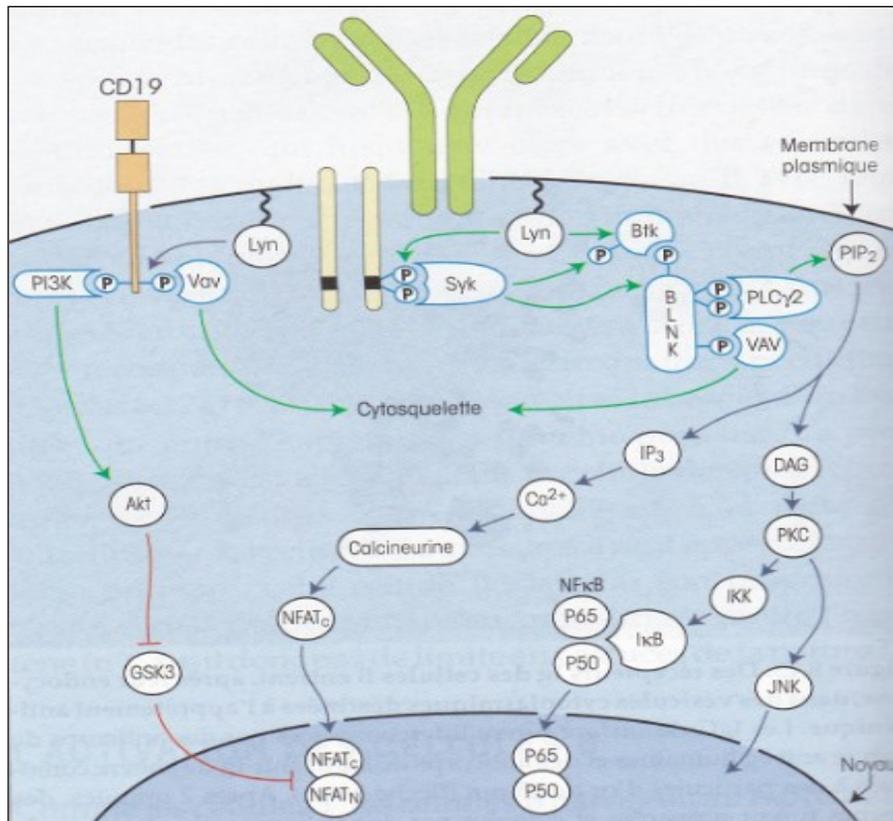


Figure 8. Voies de signalisation via BCR : Une cascade de signalisation est déclenchée suite à l'interaction de l'antigène avec les récepteurs des cellules B, amorcée par la phosphorylation des ITAM par les PTK et aboutissant à l'activation d'une panoplie de facteurs de transcription (Delves et coll. 2008) [66].

Des signaux de co-stimulation sont indispensables pour une activation plus efficace des cellules B permettant une amplification du signal transmis par le BCR. Il s'agit du complexe du co-récepteur des BCR composé du CD19, CD21, CD81 et LEU31. Le CD19 joue un rôle particulier dans ce processus en supprimant les effets inhibiteurs de GSK3 sur NFAT par la voie PI3K/Akt (Figure 8).

D'autres récepteurs de surface ont la capacité d'atténuer l'activation des cellules B tels que FC γ RIIB, CD22 ou encore PIRB (*Paired Immunoglobulin-like Receptor B*) qui possèdent des motifs ITIM (Motifs d'inhibition des immuno-récepteurs basé sur la tyrosine) au niveau de leurs queues cytoplasmiques et recrutent la tyrosine phosphatase SHP-1. Cette dernière agit par antagonisme sur l'activité de Lyn sur Syk et Btk bloquant ainsi le recrutement de PLC γ 2.

Après déclenchement de la cascade de signalisation, le complexe BCR est internalisé par la cellule B et l'antigène dégradé. Les fragments peptidiques obtenus sont associés à des molécules du CMHII et transportés vers la surface cellulaire où ils seront reconnus par le TCR des cellules T auxiliaires conduisant à leur activation. Ces dernières ainsi activées complètent l'activation des cellules B par la sécrétion de cytokines et par des interactions cellule-cellule médiées par le couple CD40/CD40L. L'activation des cellules B entraîne leur prolifération et maturation se traduisant par une expansion clonale et la différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de la même spécificité que leur BCR.

Des études ont démontré qu'après reconnaissance d'un antigène par le BCR, la liaison CD40/CD40L induisait la survie cellulaire par l'expression des gènes anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 notamment le Bcl-XL [70].

1.3 Le CD40

Le CD40 a été identifié par deux équipes indépendantes à la surface des cellules B et des carcinomes en utilisant des anticorps monoclonaux. En 1985, Paulie S et coll. ont identifié pour la première fois l'antigène p50 à l'aide de l'anticorps monoclonal S2C6 [71], alors qu'en 1986, Clark et coll. ont démontré des effets co-stimulateurs pour les cellules B en utilisant l'anticorps monoclonal G28.5 dirigé contre le Bp50 [72]. Cet antigène a été désigné comme CD40 en 1989 lors du "Fourth International Workshop on leukocyte antigens" à Vienne.

L'ADN codant pour le CD40 a été isolé quelques années plus tard par Stamenkovic I et coll. [73].

1.3.1 La structure du CD40

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de 45-50 KDa appartenant à la superfamille des TNFR. Protéine de type I, le CD40 possède une extrémité C-terminale intracellulaire et une extrémité N-terminale extracellulaire. Le gène codant pour le CD40 humain est localisé sur le chromosome 20 et l'ARNm correspondant est transcrit en une protéine de 277 acides aminés répartis en trois domaines: 193 acides aminés dans le domaine extracellulaire, 22 transmembranaire et 62 intracellulaire. Le domaine extracellulaire est riche en cystéines, capables de former des ponts disulfures et permettant ainsi le repliement de la molécule (Figure 9).

Le CD40 humain et murin partage 78% d'homologie au niveau du domaine intracellulaire et 62% au niveau extracellulaire, les résidus cystéines sont notamment conservés ce qui suggère un repliement semblable de la molécule chez les deux espèces [74, 75].

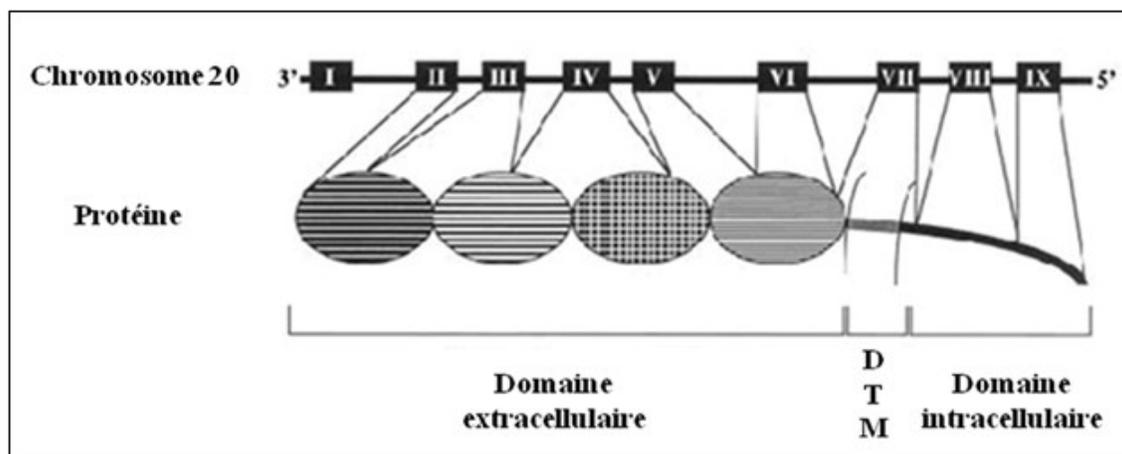


Figure 9. Structure du gène et de la protéine du hCD40 : Le gène codant pour le CD40 humain est localisé sur le chromosome 20, constitué de 9 exons. Les exons 2, 3, 4, 5 et 6 constituent le domaine extracellulaire, l'exon 7 est le seul exon constituant le domaine transmembranaire et les exons 8 et 9 constituent le domaine intracellulaire (Schonbeck U. et coll. 2001) [76].

1.3.2 L'expression du CD40 à la surface des cellules

1.3.2.1 Expression du CD40 sur les cellules B

Le CD40 a été considéré initialement comme un antigène de la cellule B [77], découvert par l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique induisant la prolifération des lymphocytes B [71, 72]. Le CD40 est exprimé à tous les stades de développement des lymphocytes B et son rôle dépend et varie selon le stade du développement lymphocytaire B [75]. Il a été détecté sur tous les lymphocytes B isolés à partir du sang, du cordon, des amygdales et des rates [74]. Une forme soluble du CD40 peut être secrétée par les lymphocytes B transformés ou les cellules B de l'amygdale, relarguée par protéolyse et capable de s'associer au CD154, son ligand, à la surface des cellules T [76].

1.3.2.2 Autres types cellulaires exprimant le CD40

En plus d'être exprimé à la surface des cellules B, plusieurs études ont permis de détecter la présence du CD40 sur d'autres types cellulaires. En plus, le rôle du CD40 ainsi que les voies de signalisation induites via sa stimulation varient selon le type cellulaire. Ainsi, le CD40 est exprimé à la surface des macrophages et monocytes. Sa stimulation induit entre autres la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 et la production de monoxyde d'azote. Sur les cellules dendritiques, le CD40 induit l'expression de molécules co-stimulatrices et stimule leur croissance. Le CD40 stimule l'activité pro-coagulante à la surface des cellules endothéliales et induit la co-stimulation des cellules T [75]. D'autres types cellulaires expriment le CD40 à leur surface telles que les cellules épithéliales, les basophiles et les fibroblastes.

Le niveau d'expression de CD40 qui est constitutive sur la plupart des types cellulaires peut être augmenté par plusieurs stimuli notamment par des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ , l'IL-1, l'IL-3, l'IL-4, ou encore par le VIH, le virus Epstein-Barr et la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* [76].

1.3.3 Le CD154: Principal Ligand du CD40

Le CD154, principal ligand du CD40, aussi connu sous le nom de CD40L, gp39, TRAP (TNF-related activation protein) ou encore TBAM (T-B activating molecule) [75], a été découvert par Armitage et coll. En 1992 [78]. Le CD154 est une glycoprotéine transmembranaire de 33-39 KDa appartenant à la superfamille des TNF [79]. Protéine de type II, le CD154 possède une extrémité C-terminale extracellulaire et une extrémité N-terminale intracellulaire. Le gène codant pour le CD154 est localisé sur le chromosome X [75, 80]. Le CD154 humain (hCD154) est formé de 261 acides aminés répartis en trois domaines: 215 acides aminés dans le domaine extracellulaire, 24 transmembranaire et 22 intracellulaire. Le hCD154 humain partage 80% d'homologie avec le CD154 murin [75] (Figure 10).

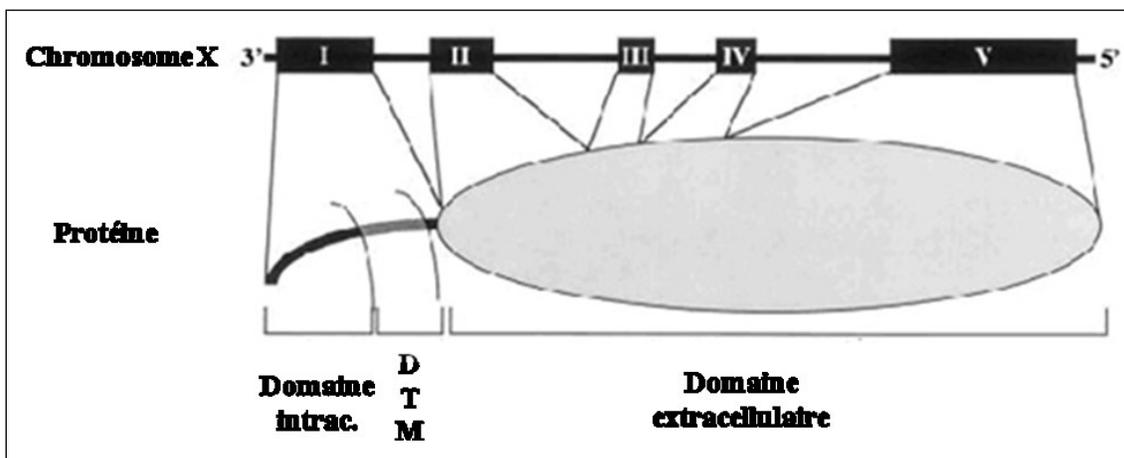


Figure 10. Structure du gène et de la protéine du hCD154 : Le gène codant pour le CD40 humain est localisé sur le chromosome X, constitué de 5 exons (Schonbeck U. et coll. 2001) [76].

Le CD154 est exprimé à la surface de différents types cellulaires: cellules T activées, plaquettes activées, monocytes, cellules dendritiques, basophiles et éosinophiles. D'autres types cellulaires expriment le CD154 dans des cas pathologiques tels que les fibroblastes pulmonaires, cellules du muscle lisse et cellules épithéliales [81, 82].

En plus de la forme membranaire, une forme soluble du CD154 (sCD154) de 18KDa a été identifiée qui préserve sa capacité de former un trimère et d'interagir avec le CD40 [83]. Il a

été démontré par notre laboratoire que suite à sa liaison avec le CD40, le CD154 membranaire était clivé spécifiquement, entre l'acide glutamique 112 (E112) et la méthionine 113 (M113), par l'intervention de métalloprotéinases ADAM-10 et ADAM-17 [84].

Chacune des formes membranaires et solubles du CD154 va s'assembler pour former des homo-trimères par des liaisons non-covalentes, forme nécessaire pour leur activité biologique. Ils sont capables d'interagir avec le CD40 via les résidus arginine 203 (R203) et tyrosine (Y145) [85, 86] favorisant la trimérisation du récepteur et initiant ainsi le signal intracellulaire. Il en résulte la formation de dimères CD40 au sein des oligomères médiée par la formation de ponts disulfure entre deux cystéines en position 238 dans leur domaine intracellulaire. Cette dimérisation est requise pour l'activation de PI-3K, l'expression du B7.2 et la sécrétion de l'IL-8 dans les cellules B.

En plus du CD154, principal ligand du CD40, des études ont identifié deux autres ligands: le C4b Binding Protein (C4BP) [87] et le HSP70 (Protéine de choc thermique 70) [88].

1.3.4 La signalisation intracellulaire du CD40

L'engagement du CD40 mène à l'activation de différentes voies de signalisation par l'activation de nombreuses protéines telles que les protéines tyrosine kinase (PTK), les protéines sérine/thréonine kinase et les STATs. Le CD40, n'ayant pas de domaine kinase dans sa partie cytoplasmique ne peut interagir directement avec ces molécules de signalisation, il nécessite donc l'intervention de molécules adaptatrices que sont les TRAFs [75, 76, 89].

1.3.4.1 Activation des protéines tyrosine kinase

L'engagement du CD40 et sa trimérisation à la surface des cellules B, recrute des PTK telles que Lyn, Syk ou Fyn qui sont activées par phosphorylation d'une tyrosine à partir d'une molécule d'ATP. Cette phosphorylation survient très rapidement après liaison du CD40 au CD154 [90]. De plus, la liaison du CD40 induit la phosphorylation de la phospholipase C γ qui catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) induisant la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG).

En effet, une augmentation du niveau d'IP3 a été démontrée dans des cellules B stimulées via le CD40 [91]. L'IP3 augmente le niveau de calcium intracellulaire alors que le DAG est un activateur physiologique de PKC.

De plus, l'engagement du CD40 induit l'activation du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [92] qui induit généralement un signal de survie [89].

1.3.4.2 Activation des protéines sérine/thréonine kinase

L'engagement du CD40 induit l'activation de différentes sérine/thréonines kinase, membres de la famille des MAPK, ainsi le CD40 active différentes voies MAPK telles que JNK/SAPK, p38 MAPK et ERK. Toutefois, l'activation de la voie ERK suite à l'engagement du CD40 reste incertaine. En effet, il existe des études contradictoires quant à l'implication de ERK. Certaines études rapportent que cette voie n'est pas activée suite à l'engagement du CD40 [93, 94] alors que d'autres démontrent que le CD40 active ERK1 et ERK2 [95]. En plus, il a été relevé que ERK2 était plus activé que ERK1 [81]. L'engagement du CD40 active la voie JNK dans les cellules B humaines particulièrement JNK1 [96].

1.3.4.3 Activation des protéines associées au CD40

1.3.4.3.1 La famille des TRAFs

Les TRAFs (Facteurs associés au TNFRs) sont des protéines adaptatrices qui en s'associant avec les récepteurs de la famille des TNFRs notamment le CD40, initient et activent différentes voies de signalisation.

Six membres de la famille des TRAFs ont été identifiés (TRAF-1,-2,-3,-4,-5,-6) et possèdent une structure similaire. Tous les membres de TRAFs partagent un domaine TRAF N-terminal et un domaine TRAF C-terminal. De plus, ils comportent plusieurs motifs "Zinc finger" et un motif "Ring finger" à l'exception de TRAF-1 (Figure 11).

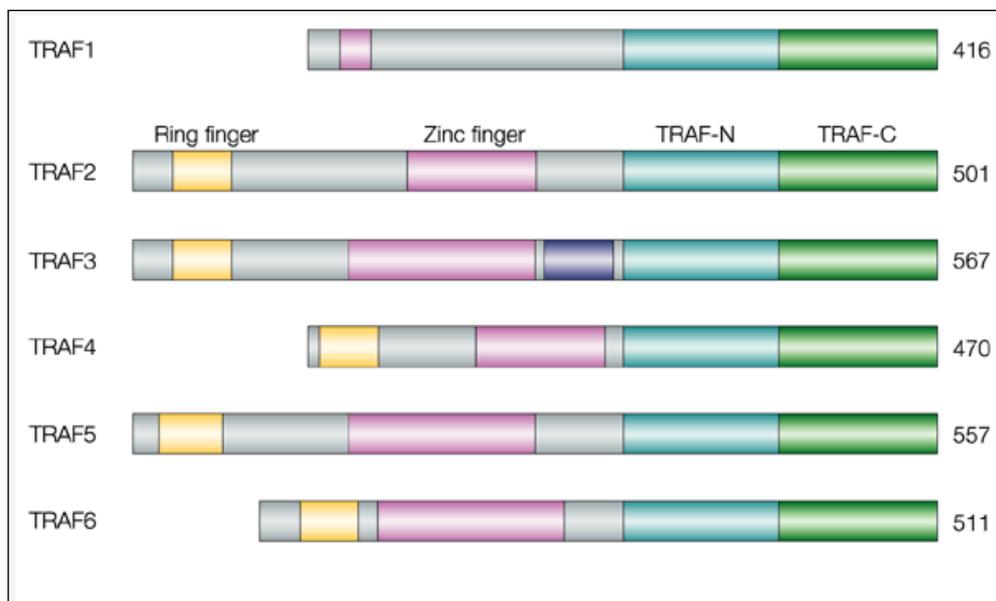


Figure 11. Structure des différents membres des TRAFs (Aggarwal BB. 2003) [97] .

Chacun de ces domaines a un rôle particulier, le domaine TRAF C-terminal interagit avec la partie cytoplasmique du récepteur alors que le domaine TRAF N-terminal est caractérisé par la formation d'une super hélice et permet aux différents membres des TRAFs d'interagir entre eux pour former des homo- et hétéro-trimères [98]. Cependant, ces deux rôles ont été attribués au domaine TRAF C-terminal selon Aggrawal [97]. Les motifs "Zinc finger" et "Ring finger" représentent des sites de liaison permettant différentes interactions et leur présence est primordiale pour l'activation des voies de signalisation [99].

Suite à l'engagement du CD40 et son activation, les différents membres de TRAFs sont recrutés au niveau de la queue cytoplasmique. Le CD40 a deux différents sites de liaison pour les TRAFs. TRAF-1,-2 et -3 se lient au site distal alors que TRAF-6 lie le site proximal. Les membres de TRAFs peuvent former des hétéro-oligomères, ce qui explique la liaison indirecte de TRAF-5 au CD40 via le TRAF-3. A noter que TRAF-6 peut également lier le CD40 via TRAF-2 [100].

Par ailleurs, certains membres de la famille des TRAFs ont un rôle de régulateur sur d'autres membres comme l'interaction TRAF-1/TRAF-2.

Le premier membre identifié comme une protéine associée au CD40 est TRAF-3, également connu sous le nom CRAF1, CD40bp, LAP1 et CAP1 [101]. TRAF-3 est exprimé dans presque tous les types cellulaires. Il contient plusieurs domaines fonctionnels impliqués notamment dans l'association avec CD40 et la transduction du signal. Les souris TRAF-3 knockout conservent une signalisation apparemment normale dans les cellules B, alors que l'activation des cellules T est altérée [102].

L'association du CD40 avec TRAF-2 induit l'activation du facteur nucléaire κ -B (NF- κ B). En effet, des études ont démontré que la déficience en TRAF-2 pouvait prévenir l'activation du NF- κ B [103, 104].

Des études ont mis en évidence d'autres membres de TRAFs capables de s'associer au CD40, TRAF-5 et -6 [105, 106]. L'inactivation du gène TRAF-5 compromet la prolifération des cellules B [107].

Ces différentes interactions avec le CD40 et les différentes voies de signalisation activées par les membres de TRAFs dépendent du type cellulaire. De manière générale, tous les TRAFs sont capables d'activer NF- κ B et d'induire les voies de signalisation MAPKs qui conduisent à l'activation de JNK, p38 et ERK [76] (Figure 12).

1.3.4.3.2 Autres molécules associées

Le CD40 peut aussi induire un signal par une voie indépendante des TRAFs. En effet, il est capable de se lier à d'autres molécules de la famille JAK (Janus tyrosine Kinase) telles que Jak3 (Figure 12). Des études montrent que l'engagement du CD40 induit la phosphorylation et l'activation de Jak3 qui à son tour conduit à la phosphorylation et activation de STAT3 [76]. Jak3 est constitutivement associé au CD40 sur les cellules B. Cette interaction nécessite une séquence riche en proline dans la région proximale du CD40. La délétion de cette séquence supprime la capacité du CD40 à induire l'expression des gènes CD23, ICAM-1 et lymphotoxine- α dans les cellules B [108, 109].

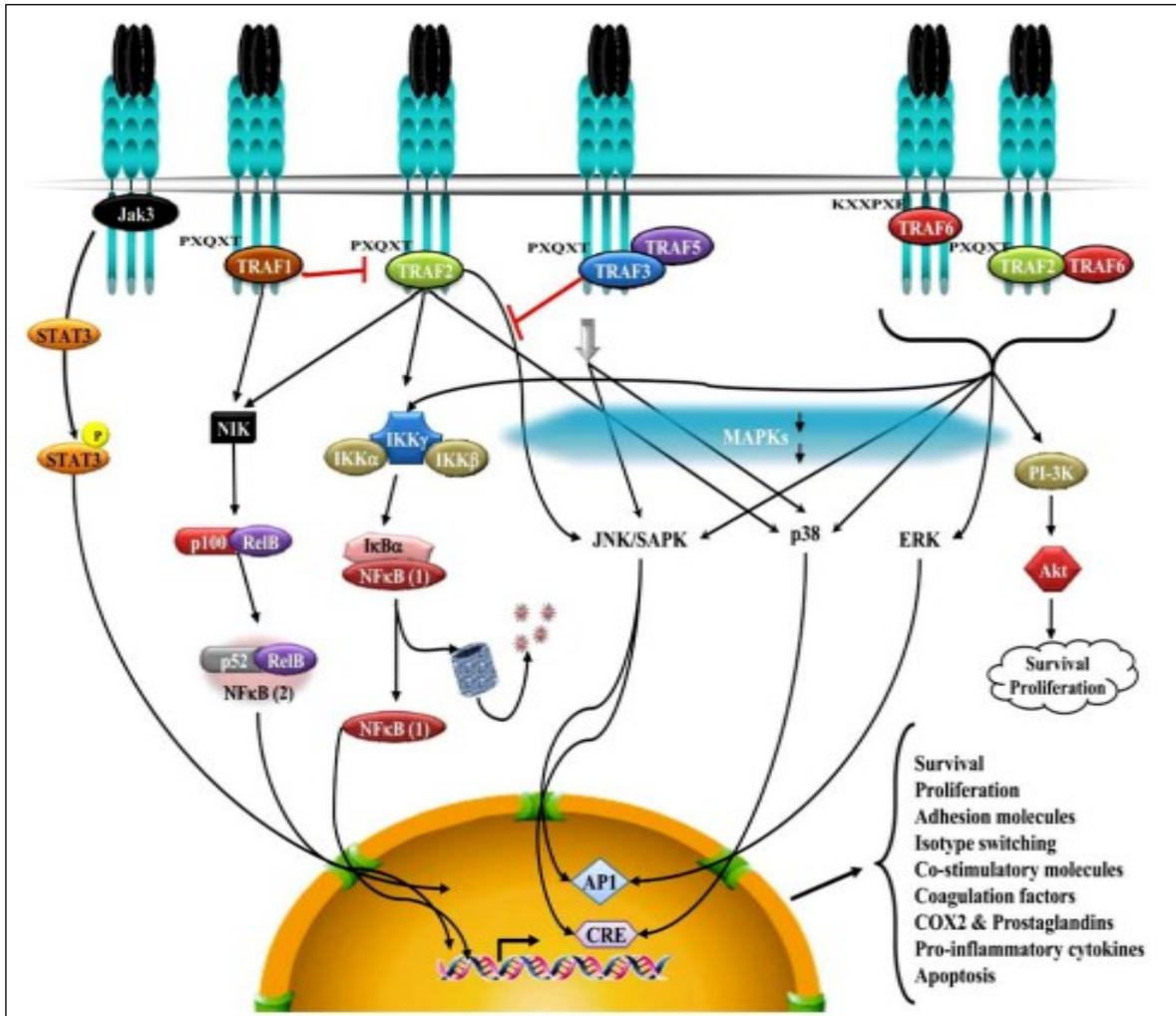


Figure 12. Signalisation CD40 TRAFs-dépendante et indépendante (Hassan G. et coll. 2009) [110].

1.3.5 Le rôle du CD40 dans la réponse immunitaire

L'interaction du CD40 avec son ligand CD154 joue un rôle important dans la réponse immunitaire humorale. En effet, des études approfondies sur l'activation CD40 des cellules B *in vitro* ont démontré que l'activation du CD40 a des effets importants sur tous les stades du développement des cellules B [74, 111, 112]. Ainsi, l'engagement du CD40 induit la prolifération et la différenciation des cellules B, la commutation isotypique, formation du centre germinale, augmentation de la génération de cellules B mémoires et la survie des cellules

B [111]. De plus, le CD40 peut induire l'activité télomérase dans les cellules B mémoires, ce qui contribue au prolongement de leur durée de vie [113].

Les lymphocytes B sont aussi des cellules présentatrices d'antigène et interviennent dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. L'engagement du CD40 est alors impliqué dans d'autres fonctions faisant intervenir d'autres cellules présentatrices d'antigène (CPA) comme les monocytes en induisant l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et de co-stimulation telles que le B7.1, B7.2 et la production de cytokines (IL-12,-6,-10, TNF α).

La démonstration *in vivo* du rôle critique de l'interaction CD40/CD40L vient de la découverte du syndrome d'hyper-IgM causé par une immunodéficiency liée au X qui est due à une altération du gène CD40-L [98]. Cette maladie se caractérise par une déficiency de la réponse immunitaire dépendante des cellules T, il en résulte une incapacité de générer des cellules B mémoires et d'effectuer la commutation isotypique avec une concentration faible voire nulle d'anticorps circulants de classe IgG, IgA, IgE. La génération de souris CD40 et CD40L knockout a révélé un phénotype comparable à celui des patients souffrant du syndrome d'hyper-IgM [114-116]. En plus, des patients ayant une immunodéficiency similaire est causée par des déficiencies de la signalisation CD40 [75].

1.3.6 Le rôle du CD40 dans la mort cellulaire

Le CD40 est le plus souvent associé à un rôle bénéfique. En effet, son engagement à la surface des cellules qui l'expriment induit leur survie et leur prolifération [111] mais depuis quelques années, plusieurs études ont démontré la capacité du CD40 à induire soit un signal de survie ou de mort cellulaire jouant ainsi un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, comme pour les autres membres de la famille des TNFR (Fas, TNFR-1...), le CD40 est aussi impliqué dans la mort cellulaire, bien qu'il ne possède pas de domaine de mort dans sa partie cytoplasmique. Notre laboratoire a démontré que l'induction du signal de mort nécessitait le recrutement de la molécule adaptatrice TRAF-6 [117].

Le CD40 a été pour la première fois impliqué dans la mort cellulaire suite à son engagement à la surface des lymphomes B menant à une profonde déplétion de ces cellules [118, 119]. D'autres équipes ont démontré par la suite que l'activation du CD40 induisait la mort d'autres types cellulaires, notamment les carcinomes [120, 121], les myélomes [122, 123]. Léveillé et

coll. ont démontré que la signalisation via CD40 conduit à une mort rapide des cellules B, principalement observée dans les lignées de cellules B transformées par l'EBV. Cette mort cellulaire induite par CD40 ne nécessite pas de synthèse protéique de novo, mais implique l'intégrité du cytosquelette. De plus, les caspases ne sont pas impliquées dans cette réponse, de même que les systèmes Fas-FasL et TNF-TNFR [124]. Une autre équipe, suggère l'implication des céramides dans la mort induite suite à l'engagement du CD40 à la surface des lymphocytes B transformés à l'EBV [125].

Des observations expérimentales et cliniques récentes suggèrent que la voie CD40 peut être exploitée pour le traitement des tumeurs malignes [126].

1.3.7 CD40: une cible thérapeutique dans de nombreuses maladies

Le CD40 est impliqué dans diverses pathologies incluant l'inflammation, le rejet des transplantations et l'auto-immunité. En effet, le couple CD40/CD154 intervient entre autres dans le développement, la progression et le maintien des maladies auto-immunes. Dans ce cas, l'engagement du CD40 conduit à la production d'auto-anticorps et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la prolifération des cellules impliquées dans le processus pathologique. L'activation du CD40 intervient aussi dans le développement des lymphomes en activant la voie NF- κ B favorisant ainsi la prolifération et la survie de ces cellules. Le couple CD40/CD154 constitue donc une bonne cible thérapeutique contre ces maladies. Une des approches thérapeutiques consiste à inhiber la stimulation du CD40 en administrant des anticorps bloquant les voies de signalisation des cellules ciblées, ce qui mène à l'inhibition de la survie de ces cellules ou encore l'inhibition de la production d'auto-anticorps. En plus des anticorps anti-CD154, plusieurs anticorps dirigés contre le CD40 ont été générés. Ces derniers diffèrent par leurs sites de liaison avec le CD40 et par leur fonction agoniste ou antagoniste [127]. Parmi les anticorps antagonistes, un anticorps totalement humanisé, le lucatumumab (HCD122) est capable de bloquer l'interaction du CD154 avec le CD40 et d'induire la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Cet anticorps a montré son efficacité dans le traitement des lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens en inhibant la prolifération et la survie des cellules B malignes induite par l'activation du CD40 exprimé à leur surface [126]. Le ch5D12, un anticorps chimérique, est utilisé dans la maladie de Crohn [127]. Le

Dacetuzumab (SGN-40) est un anticorps partiellement agoniste qui constitue un traitement potentiel contre les leucémies lymphoïdes chroniques et les lymphomes non hodgkiniens.

Enfin, cette cible thérapeutique s'est avérée aussi prometteuse dans plusieurs modèles tels que l'athérosclérose ou l'arthrite [128].

RATIONNEL ET OBJECTIS

Le CD40, membre de la superfamille des TNFR, est exprimé à tous les stades de développement des lymphocytes B et son rôle dépend et varie selon le stade du développement de ces dernières [75]. On a souvent associé le CD40 à un rôle bénéfique, son engagement initie des voies de signalisation qui contribuent à la prolifération, la différenciation et la survie des cellules B [111]. Il est bien établi que l'engagement du CD40 sur les cellules B immatures les protège de la mort induite via le BCR [129, 130] alors que d'autres travaux ont démontré que ce dernier jouait également un rôle dans l'induction de la mort cellulaire. En effet, des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré la sensibilité de plusieurs lignées B à la mort cellulaire. Léveillé et coll. ont démontré que la signalisation via CD40 conduit à une mort rapide des cellules B qui est observée principalement dans les cellules B transformées par le virus d'Epstein-Barr [131]. D'autre part, Al-Zoobi et coll. avaient observé que l'activation des lignées cellulaire B immatures les sensibilisaient à la mort via CD20 induite par l'anticorps monoclonal anti-CD20, le Rituximab [132]. D'autres études ont montré que l'interaction du CD40 avec son ligand naturel jouait un rôle dans la réponse anti-tumorale, et que l'apoptose des cellules tumorales était considérablement augmentée en présence du CD154 résistant au clivage [133].

A la lumière de toutes ces observations, nous voulions étudier le rôle du CD40 dans la mort cellulaire des Ramos qui est un modèle de cellules B immatures, EBV négatives, et comprendre son influence sur la signalisation apoptotique induite via le BCR.

Pour répondre à cela, nous avons:

- 1) Etudier le rôle du CD40 dans la mort cellulaire suite à son engagement avec un anticorps monoclonal G28.5.
- 2) Etudier le rôle de l'interaction CD40/CD154 dans l'induction de la mort cellulaire via CD40.

- 3) Etudier l'influence du couple CD40/CD154 sur la mort cellulaire induite via le BCR.

- 4) Etudier l'effet de l'interaction du CD40 avec son ligand CD154 résistant au clivage sur la mort cellulaire via CD40 et le BCR.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Lignées cellulaires

Les lignées de cellules de lymphomes de Burkitt Ramos qui sont négatives à l'EBV (Virus de l'Epstein Barr) ainsi que les cellules rénales embryonnaires humaines HEK 293 ont été obtenues d'ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, VA, USA).

Les lignées cellulaires HEK exprimant le hCD154 sauvage (Wild type, wt) ou le hCD154 résistant au clivage ont été générées au laboratoire par transfection des cellules HEK 293 par la méthode calcium phosphate. Le plasmide d'expression pcDNA4.1 contenant le gène hCD154 wt a été utilisé comme plasmide de base pour la génération du CD154 résistant au clivage par substitution des résidus E112 et M113 du site de clivage par deux cystéines (hCD154 sub EM/CC) [134]. Les HEK vecteurs ont été transfectées avec le plasmide pcDNA4.1 vide.

Les lignées cellulaires Ramos ont été maintenues en culture dans du milieu RPMI 1640 et les cellules HEK dans du milieu DMEM dans une atmosphère régulée à 5% de CO₂ et une température de 37°C. Ces milieux proviennent de la compagnie Invitrogen Life Technology (Burlington, Ontario, Canada) et ont été supplémentés avec 5% de FBS (Sérum foetal bovin) inactivé (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et 1% de PSG (Pénicilline, Streptomycine et L-Glutamine) (GIBCO, Burlington, ON, Canada).

Anticorps et Réactifs

Les anticorps monoclonaux anti-humain CD40 (G28.5), anti-humain CD154 (C4), anti-humain TSST1 (2H8), anti-humain SEA (6E3) ont été purifiés du surnageant de la culture des hybridomes sur colonne de protéine G Sepharose (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Les hybridomes de ces anticorps ont été obtenus d'ATCC (Manassas, VA). Le fragment F(ab')₂ purifié de l'anticorps chèvre anti-humain IgM qui résulte de la digestion par la pepsine de l'anticorps correspondant provient de Southern Biotech. Le chèvre anti-souris marqué à l'Alexa 488 (le GAM-Alexa488), la Streptavidine marquée à l'Alexa 488 et l'iodure de propidium (PI) proviennent de la compagnie Invitrogen Life Technology (Burlington, Ontario, Canada).

Le soluble CD40-Fc a été généré dans notre laboratoire selon la méthode décrite en 2010 [135] et marqué à la biotine (sCD40-Fc-B) selon la technique proposée par Pierce (Rockford, IL, USA). Le PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) provient de Sigma-Aldrich.

Cytométrie en flux

Pour quantifier l'expression du CD40 (à la surface des Ramos) et du CD154 (à la surface des HEK), les cellules ont été respectivement incubées avec les anticorps monoclonaux G28.5 ou C4 (1µg/100µL) pendant 30 min sur glace. Ensuite, elles ont été lavées avec du PBS froid puis incubées 30 min à l'obscurité avec l'anticorps GAM couplé à l'Alexa-488 (1µg/1000µl). Les cellules ont été analysées par FACS Calibre (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) et le programme Flow jo (BD Biosciences). Les anticorps 2H8 et 6E3 ont été utilisés comme isotype contrôle pour le G28.5 et le C4 respectivement.

Pour étudier la liaison du CD40 avec le hCD154 wt ou le hCD154 résistant, les cellules HEK-hCD154 wt et les HEK-hCD154 sub EM/CC ont été incubées avec le sCD40-Fc-B à différentes concentrations: 125ng/100µl, 62.5ng/100µl et 31.25ng/100µl, suivi par la streptavidine-Alexa488 (1µg /1000µL). L'hIgG-Biotine a été utilisée comme isotype contrôle.

Induction de la mort des Ramos

a) Induction de la mort via CD40

Les cellules Ramos (1×10^6 /ml) non-traitées ou traitées au PMA à différentes concentrations (0.05ng/ml, 0.10ng/ml, 0.20ng/ml) ont été incubées avec différentes concentrations de l'anticorps monoclonal G28.5 (0.25µg/ml, 0.50µg/ml et 1µg/ml) pendant 24h à 37°C. L'hIgG a été utilisée comme contrôle négatif.

Pour étudier l'inhibition de la mort via le BCR, l'anticorps anti-IgM (5µg/ml) est rajouté après 1 h de pré-incubation avec le G28.5. Après 24 h d'incubation supplémentaires, les cellules sont recueillies et la mort cellulaire quantifiée par absorption de PI.

b) Induction de la mort via le BCR

Les cellules Ramos (1×10^6 /ml) ont été incubées avec différentes concentrations de l'anticorps anti-IgM (1.25µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml) et la mort quantifiée après différents temps d'incubation 16 h, 20 h et 24 h.

Pour étudier l'effet de l'activation des cellules Ramos avec le PMA sur la mort via le BCR, les cellules non-traitées ou traitées au PMA ont été incubées avec différentes concentrations de l'anticorps anti-IgM (1.25µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml). Après 24 h d'incubation, les cellules sont recueillies et la mort cellulaire quantifiée par absorption de PI.

c) Co-culture: induction de la mort via le CD154

Les cellules Ramos non-traitées ou traitées au PMA (0.10ng/ml) pendant 24 heures ont été recueillies, lavées, et co-cultivées avec des cellules adhérentes HEK-vecteur ou exprimant le hCD154 wt ou résistant. Ces cellules avaient préalablement été déposées dans des puits à fond plat et laissées adhérentes 3 h à 37°C (plaque 96 puits). Le ratio utilisé est de 1:7 (10.000 cellules adhérentes pour 70.000 cellules en suspension Ramos). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont recueillies et la mort cellulaire quantifiée par absorption de PI.

Pour étudier l'inhibition de la mort des Ramos suite à l'interaction de leur CD40 avec leur ligand naturel CD154 (wt ou résistant) exprimé à la surface des HEK, l'anticorps anti-IgM a été rajouté après 1h de contact. Les cellules ont été par la suite recueillies et la mort cellulaire quantifiée après 24 h d'incubation supplémentaires.

Quantification de la mort cellulaire

Après incubation, les cellules ont été transférées dans des tubes FACS et marquées avec le PI pendant 10 min sur glace et à l'obscurité à une concentration finale de 1µg/ml. Les cellules ont été par la suite analysées par cytométrie en flux, la mort cellulaire est évaluée par l'absorption de l'iodure de propidium (PI) et exprimée en pourcentage.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 L'activation des cellules Ramos les sensibilise à la mort via le CD40

Le CD40 joue un rôle important dans la prolifération et la survie des cellules B [111]. Cependant, diverses études ont démontré que le CD40 peut également jouer un rôle direct dans l'induction de la mort cellulaire spécifique et dans l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales [118-123]. Une étude réalisée dans notre laboratoire, démontre que la signalisation via CD40 conduit à une mort rapide des cellules B et que cette mort médiée par le CD40 était principalement observée dans les cellules B transformées par le virus d'Epstein-Barr qui influençait très significativement leur sensibilité à la mort [131].

Dans ce présent travail, nous avons utilisé la lignée de lymphome de Burkitt Ramos qui est un modèle de lymphocyte B immature EBV-négative, pour étudier la mort cellulaire suite à l'engagement du CD40 (exprimé de manière constitutive à leur surface) avec l'anticorps monoclonal G28.5. Etant donné que les cellules Ramos sont insensibles à la mort, nous avons évalué la possibilité de stimuler cette réponse en traitant ces dernières avec différentes concentrations de PMA. En effet, les cellules Ramos ont été préalablement incubées 24 h avec des concentrations croissantes de PMA ou laissées sans traitement. Ces cellules ont été par la suite recueillies, lavées puis incubées 24 h supplémentaires avec différentes concentrations de G28.5. L'IgG a été utilisée comme contrôle négatif.

La figure 1A représente le niveau d'expression du CD40 à la surface des cellules Ramos traitées ou non avec différentes concentrations du PMA. Nos résultats montrent que le traitement des cellules Ramos avec le PMA augmente l'expression du CD40 à leur surface.

En analysant la mort des cellules Ramos induite via le CD40 avant et après traitement avec le PMA (Figure 1B), nous avons observé que ce dernier influençait la sensibilité des Ramos à la mort cellulaire. En effet, les cellules non-traitées restent insensibles à la mort quel que soit la concentration de G28.5 utilisée, alors que les cellules traitées au PMA deviennent de plus en plus sensibles à la mort dépendamment de la concentration en PMA et celle du G28.5.

Nous avons voulu par la suite tester et comparer cet effet suite à l'interaction du CD40 avec son ligand naturel, le CD154. Pour ce faire, nous avons utilisé un système de co-culture où les

cellules Ramos non-traitées ou traitées au PMA ont été co-cultivées avec des cellules HEK exprimant le CD154 humain (hCD154).

La figure 3A représente le niveau d'expression du CD154 à la surface des cellules HEK 293 stablement transfectées avec le hCD154 wt, les HEK vecteur ont été utilisées comme contrôle négatif.

En analysant la mort des cellules de façon à prendre en considération que les cellules Ramos excluant ainsi les cellules HEK de la co-culture (Figure 2), nos résultats (Figure 3B) montrent que le traitement des cellules Ramos avec le PMA influençait aussi leur sensibilité à la mort suite à l'interaction de leur CD40 avec leur ligand naturel CD154.

3.2 Les cellules Ramos activées restent sensibles à la mort via le BCR

Plusieurs études notamment celles réalisées dans notre laboratoire montrent que les cellules Ramos activées par des anticorps anti-IgM induisent une apoptose directe.

Dans un premier temps, on a réalisé une expérience de dose réponse pour étudier la mort des cellules Ramos via le récepteur des cellules B induite par le fragment bivalent purifié de l'anticorps chèvre anti-humain IgM (Fragment F(ab')₂). Les cellules Ramos ont été incubées avec différentes concentrations de l'anti-IgM et la réponse à la mort a été mesurée à différents temps d'incubation (Figure 4A).

On a observé que la mort induite via le BCR était significative même à la plus faible concentration utilisée de l'anticorps (1.25µg/ml) et après le temps d'incubation le plus court (16 h) comparée aux contrôles. Ce taux de mortalité augmentait en fonction de la concentration de l'anticorps utilisée et du temps d'incubation. Cependant les taux de mortalité observés avec les concentrations de 5 et 10µg/ml de l'anticorps plafonnent et sont comparables.

On a étudié par la suite l'effet de l'activation des Ramos par le PMA sur la mort cellulaire induite via le BCR. Les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été incubées avec différentes concentrations de l'anti-IgM et la mort cellulaire a été mesurée après 24 h d'incubation. Les résultats montrent que les cellules Ramos traitées au PMA restaient sensibles à la mort via le BCR (Figure 4B).

A la lumière des résultats obtenus, on utilisera une concentration de 5µg/ml de l'anti-IgM pour un temps d'incubation de 24 h pour les expériences suivantes.

3.3 Inhibition de la mort des Ramos induite via le BCR suite à l'engagement de leur CD40 avec l'anticorps monoclonal G28.5

Il est bien documenté dans la littérature que l'engagement du CD40 sur des cellules B immatures inhibait la mort induite via le BCR [129, 130]. Pour étudier cette inhibition de la mort sur les Ramos (mort induite via le BCR) suite à l'engagement du CD40 avec l'anticorps monoclonal G28.5, les cellules Ramos traitées ou non avec du PMA, ont été incubées 24 h avec l'anti-IgM. Les cellules Ramos ont été préalablement incubées 1 h avec le G28.5.

Les résultats montrent (Figure 5) que l'engagement du CD40 avec le G28.5 à la surface des cellules Ramos non-traitées inhibait en partie la mort induite via le BCR. Cette inhibition semble être maintenue même après activation des cellules par le PMA mais à un degré moindre.

3.4 L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec son ligand naturel le CD154 inhibe la mort via le BCR

Comme déjà mentionné, plusieurs études se sont intéressées à l'étude de l'inhibition de la mort des cellules B immatures via le BCR mais exclusivement suite à l'engagement de leur CD40 avec un anticorps monoclonal. Nous avons donc voulu étudier l'effet de l'interaction du CD40 avec son ligand naturel sur la mort induite via le BCR.

Pour répondre à cela, les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules HEK 293 stablement transfectées avec le hCD154 wt ou avec des cellules HEK vecteur (Ratio 1:7). Les cellules Ramos ont été laissées 1h en contact avec les cellules HEK avant de rajouter l'anticorps anti-IgM pour 24 h d'incubation supplémentaires.

Les résultats montrent (Figure 6) une inhibition conséquente de la mort cellulaire des Ramos aussi bien pour les cellules non-traitées que celles traitées au PMA.

3.5 L'interaction du CD40 à la surface des Ramos activées avec le CD154 résistant augmente leur sensibilité à la mort

Comme déjà décrit, le ligand naturel du CD40, le CD154, existe aussi sous forme soluble (sCD154) résultant d'un clivage protéolytique. Cette forme soluble de 18 KDa préserve sa capacité d'interagir avec le CD40 et d'induire la mort des cellules tumorales. Cependant il a été démontré que la forme membranaire interagissait plus efficacement et augmentait significativement l'apoptose des cellules cancéreuses exprimant le CD40 [133, 136].

Des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que suite à sa liaison avec le CD40, le CD154 membranaire était clivé spécifiquement, entre l'acide glutamique 112 (E112) et la méthionine 113 (M113), par l'intervention de métalloprotéinases ADAM-10 et ADAM-17.

En se basant sur cette étude, un CD154 résistant au clivage par substitution de ces deux résidus d'intérêt a été généré au laboratoire.

Notre objectif est d'étudier la mort des Ramos suite à l'interaction de leur CD40 avec le CD154 résistant au clivage et de comparer les résultats avec ceux obtenus avec le CD154 wt. Dans un premier temps, on a vérifié le niveau d'expression du CD154 à la surface des cellules HEK stablement transfectées avec le hCD154 wt ou le hCD154 résistant au clivage. Les résultats montrent (Figure 7A) que le niveau d'expression du CD154 à la surface de ces deux populations préalablement triées, était comparable.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité du CD40 à lier la forme mutée du CD154 en la comparant avec la forme wt. Pour ce faire, nous avons étudié la liaison du sCD40-Fc-Biotine à différentes concentrations au hCD154 wt et hCD154 sub EM/CC.

Les résultats montrent (Figure 7B) que cette mutation n'affectait pas la liaison du sCD40-Fc-Biotine même à la plus faible concentration et donc l'interaction du CD40 avec le CD154.

Cette capacité de liaison conservée ainsi qu'un niveau d'expression comparable entre la forme mutée et wt du CD154, nous permet de comparer l'effet de cette mutation sur la réponse à la mort des Ramos.

A cet effet, les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules HEK-hCD154 wt ou HEK-hCD154 sub EM/CC à différents temps d'incubation (Ratio 1:7), les cellules HEK vecteur ont été utilisées comme contrôle.

Les résultats montrent (Figure 8) que les cellules Ramos non-traitées étaient résistantes à la mort suite à l'interaction de leur CD40 avec les deux formes du CD154, que le taux de mortalité des cellules Ramos activées au PMA augmentait en fonction du temps d'incubation et que la sensibilité à la mort des Ramos activées était plus importante avec le CD154 résistant au clivage.

3.6 L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec le CD154 wt ou le CD154 résistant inhibe la mort via le BCR d'une façon comparable

Nos résultats précédents ont montré que l'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec leur ligand naturel, le CD154, inhibait la mort via le BCR, et que les cellules Ramos activées étaient plus sensibles à la mort suite à l'interaction de leur CD40 avec le CD154 résistant au clivage.

Nous avons donc voulu étudier l'effet de cette mutation du point de vue de l'inhibition de la mort via le BCR. Les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules HEK stablement transfectées avec le hCD154 wt, le hCD154 résistant ou avec des cellules HEK vecteur (Ratio 1:7). Les cellules Ramos ont été laissées 1 h en contact avec les cellules HEK avant de rajouter l'anticorps anti-IgM pour 24 h d'incubation supplémentaires.

Les résultats (Figure 9) montrent que l'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec la forme wt ou mutée du CD154 inhibait de manière comparable la mort cellulaire induite via le BCR quel que soit l'état d'activation des cellules.

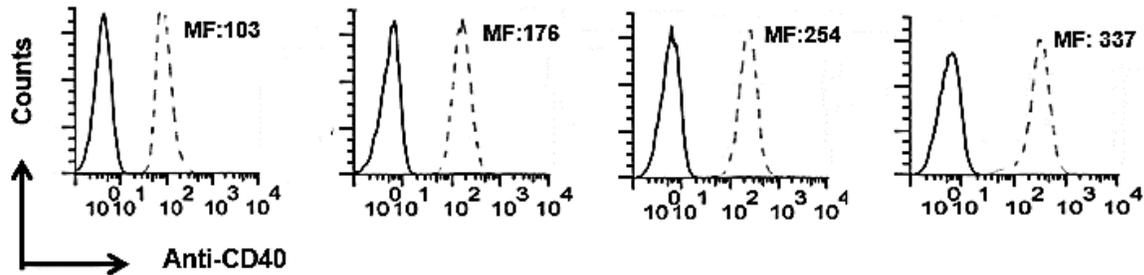
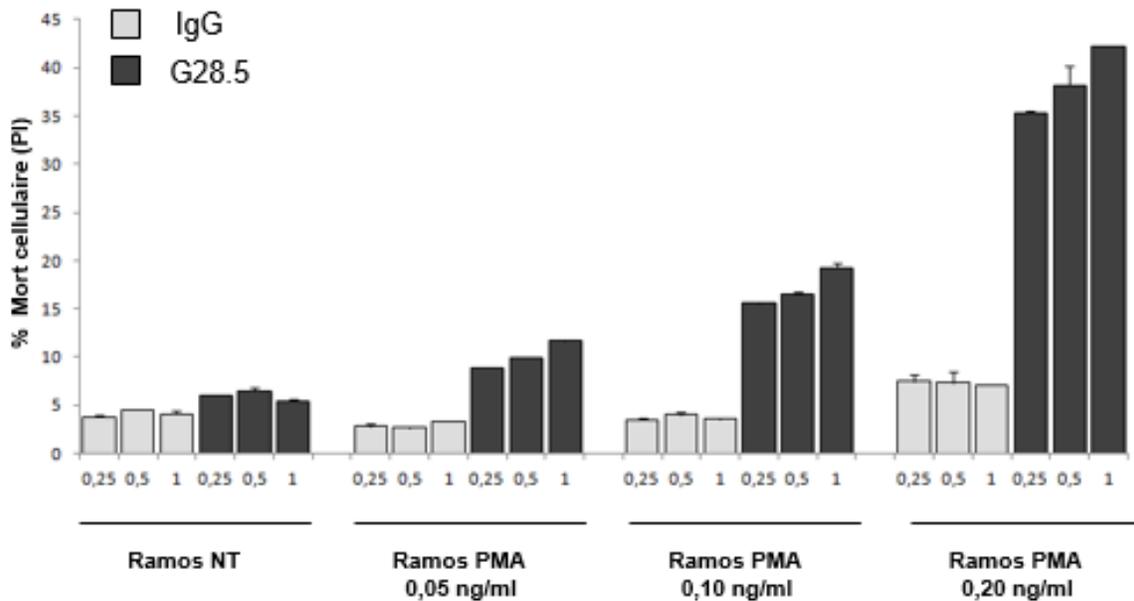
A**B**

Figure 1. L'activation des cellules Ramos les sensibilise à la mort via CD40 par son engagement avec l'anticorps monoclonal G28.5 : (A) L'expression du CD40 à la surface des Ramos non-traitées ou traitées avec du PMA à différentes concentrations a été étudiée par cytométrie en flux. L'Ac primaire utilisé est le G28.5 (1µg/100µl) suivi du GAM-Alexa 488 (1/1000). L'isotype contrôle utilisé est le 2H8 (trait plat). (B) Les cellules Ramos ont été incubées avec différentes concentrations de G28.5 pendant 24 heures. L'IgG a été utilisée comme contrôle négatif. La réponse de la mort cellulaire a été analysée par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium (PI). Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

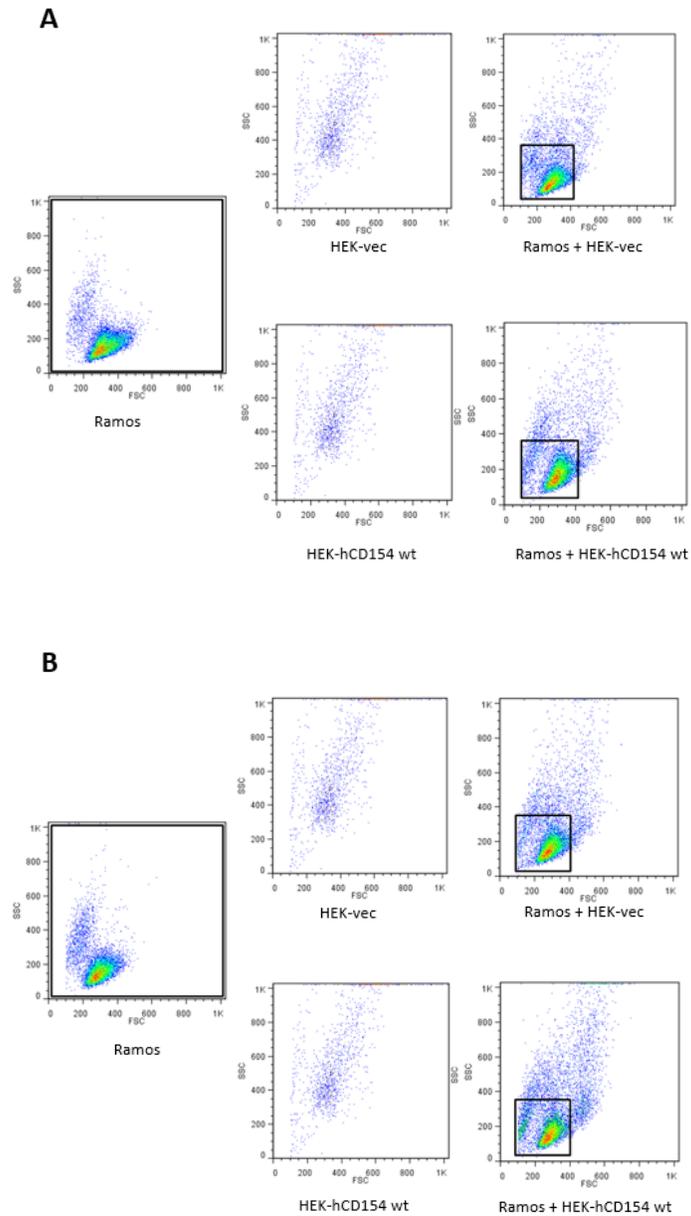


Figure 2. Stratégie d'analyse de la mort des Ramos dans le système de co-culture :

Les cellules Ramos non-traitées (A) ou traitées au PMA (B) ont été co-cultivées avec des cellules HEK exprimant le hCD154 wt ou le vecteur vide. Les cellules sont évaluées selon leur taille (paramètre FSC) et leur granulosité (paramètre SSC). Les cellules Ramos sont de petite taille caractérisées par des valeurs plus faibles de SSC et FSC en comparaison avec les cellules HEK qui sont plus grandes. De ce fait, on peut facilement les exclure lors de l'analyse de mort des cellules Ramos. Cette figure montre la stratégie d'analyse utilisée dans nos expériences de co-culture.

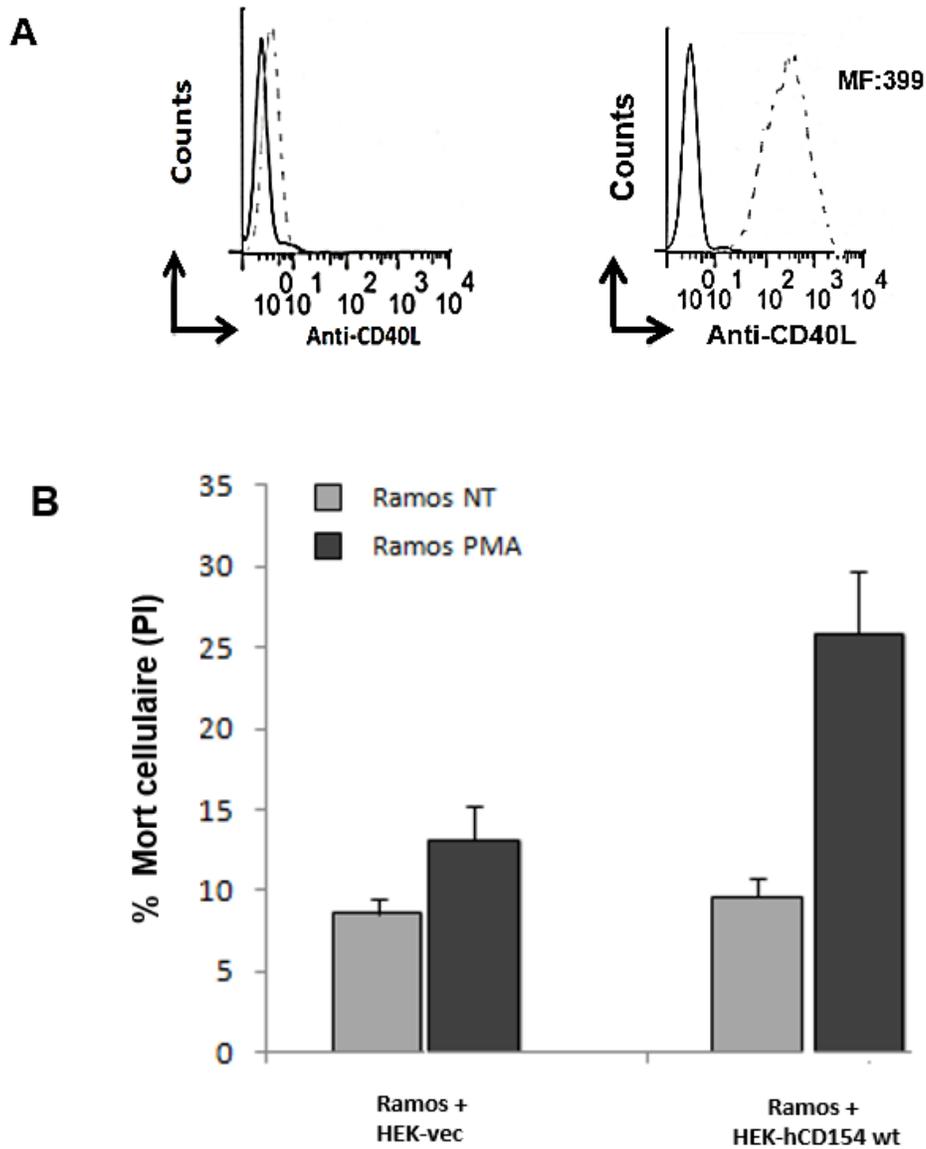


Figure 3. L'activation des cellules Ramos les sensibilise à la mort via CD40 par interaction avec leur ligand naturel le CD154 : (A) L'expression du CD154 à la surface des HEK-hCD154 wt et HEK vecteur (utilisées comme contrôle) a été étudiée par cytométrie en flux. L'Ac primaire utilisé est le C4 (1 μ g/100 μ l) suivi du GAM-Alexa 488 (1/1000). L'isotype contrôle utilisé est le 6E3 (trait plat). (B) Les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules HEK vecteur ou HEK-hCD154 wt, laissées préalablement adhérentes pendant 3 h. La réponse à la mort a été analysée après 24 h d'incubation par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium. Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

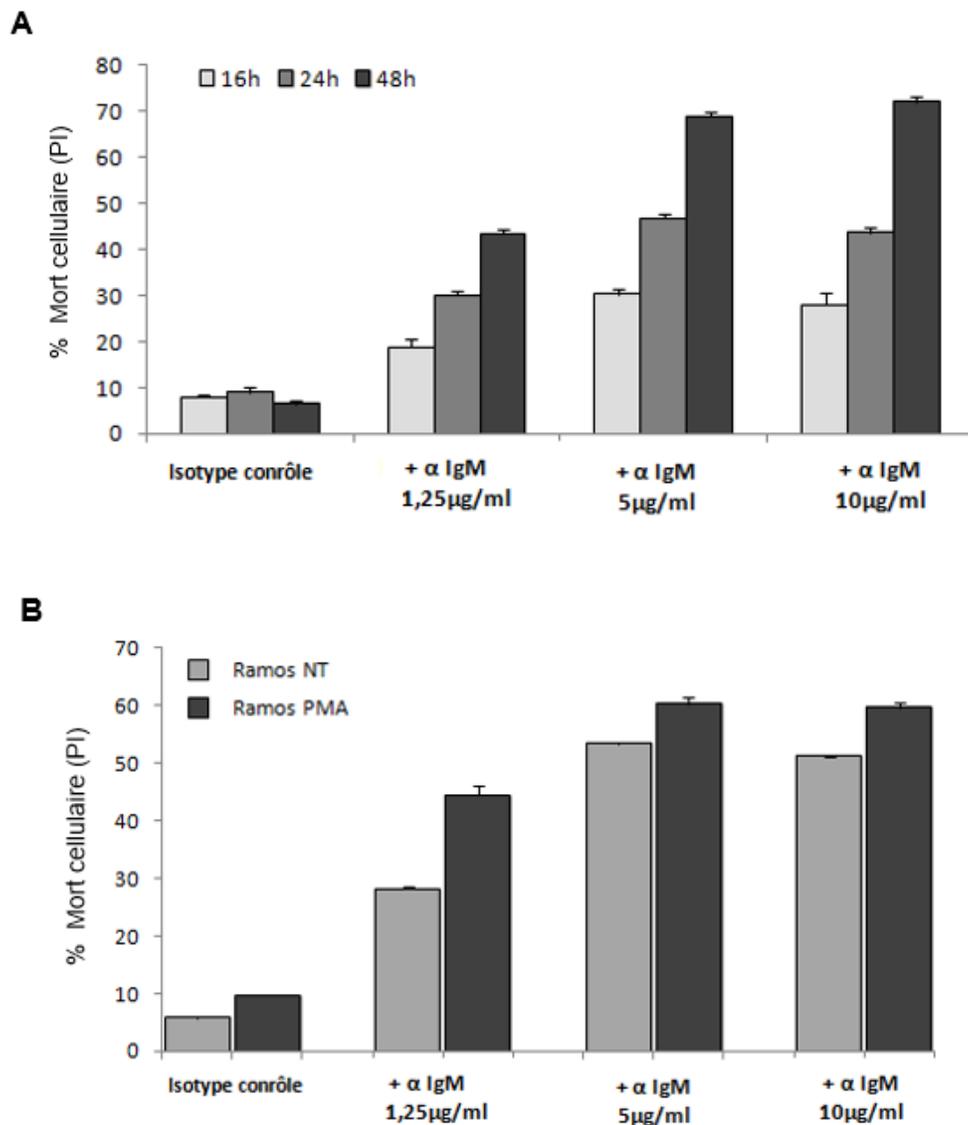


Figure 4. Les cellules Ramos activées restent sensibles à la mort via le BCR : (A) Les cellules Ramos non-traitées ont été incubées avec différentes concentrations de l'anti-IgM F(ab')₂ (Dose réponse). La réponse à la mort a été analysée par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium après différents temps d'incubation 16, 24 et 48 h. (B) Les cellules Ramos non-traitées ou traitées au PMA ont été incubées avec différentes concentrations de l'anti-IgM. La réponse à la mort a été analysée par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium après 24h d'incubation. Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

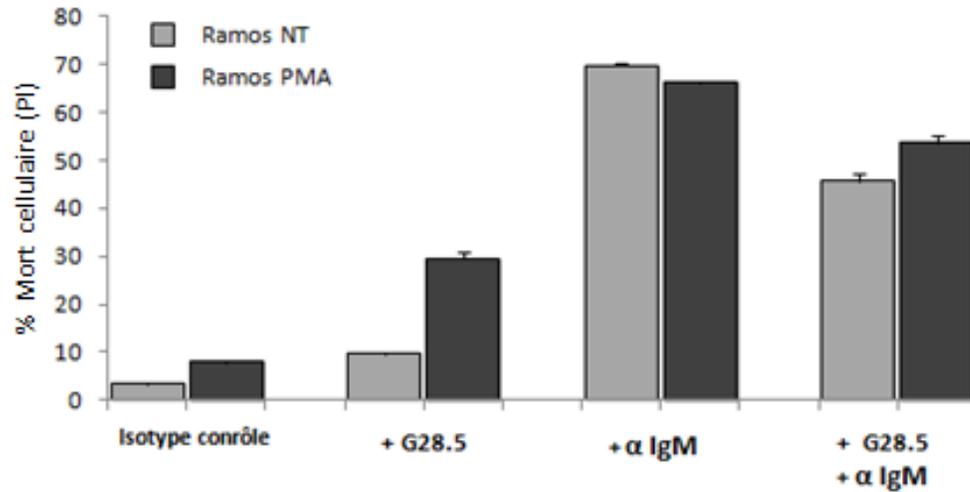


Figure 5. L'engagement du CD40 à la surface des Ramos avec le G28.5 inhibe la mort via le BCR : Les cellules Ramos non-traitées ou traitées au PMA ont été préalablement incubées avec le G28.5 (2µg/ml) pendant 1 h puis l'anticorps anti-IgM a été rajouté (5µg/ml). La réponse de la mort cellulaire a été analysée par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium après 24h d'incubation. Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

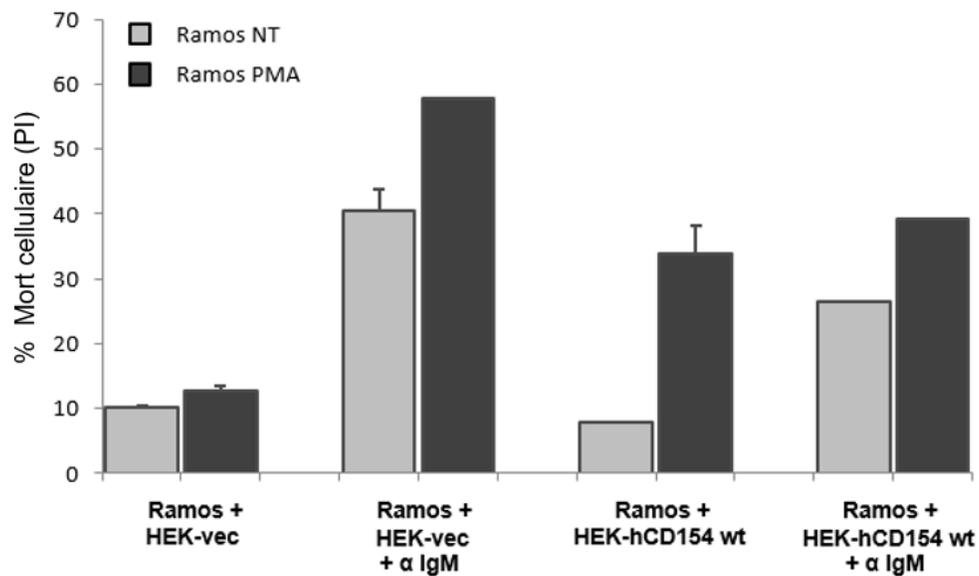


Figure 6. L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec son ligand naturel le CD154 inhibe la mort via le BCR : Les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules exprimant le hCD154 wt ou le vecteur vide, laissées préalablement adhérentes pendant 3 h. L'anticorps anti-IgM a été ajouté 1 h après. La réponse à la mort a été analysée après 24 h d'incubation par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium. Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

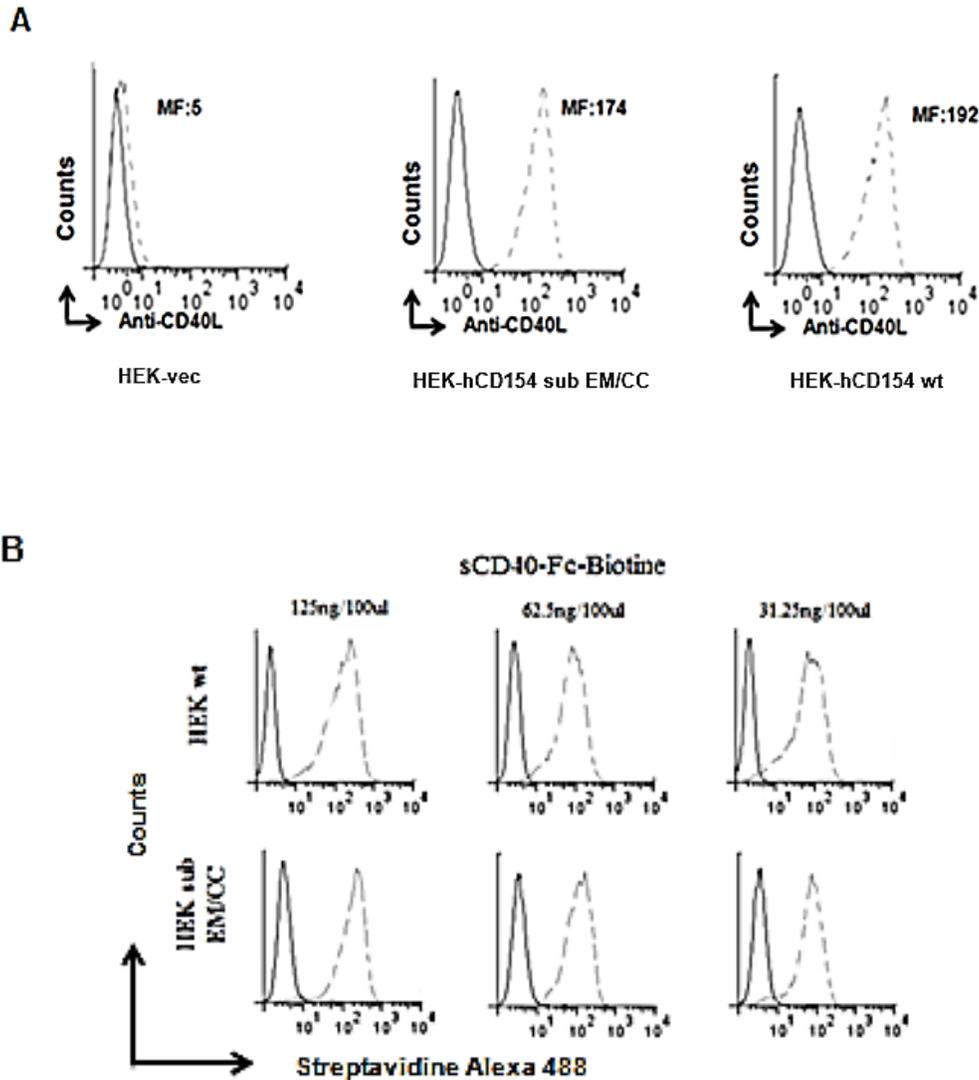


Figure 7. Le CD40 lie le hCD154 wt et le hCD154 résistant : (A) Le niveau d'expression du hCD154 wt et résistant à la surface des HEK-hCD154 wt et HEK-hCD154 sub EM/CC respectivement est comparable: L'expression du CD154 à la surface des HEK a été étudiée par cytométrie en flux. L'Ac primaire utilisé est le C4 (1 μ g/100 μ l) suivi du GAM-Alexa 488 (1/1000). L'isotype contrôle utilisé est le 6E3 (trait plat). (B) Cette figure montre bien que la mutation des résidus E112 et M113 par des cystéines n'affecte pas l'interaction CD154/CD40. Les cellules ont été incubées 30 min à 4°C avec différentes concentrations du sCD40-Fc-Biotine suivi par la Streptavidine-Alexa 488 (30min à 4°C). Cette expérience est représentative d'au moins 3 expériences.

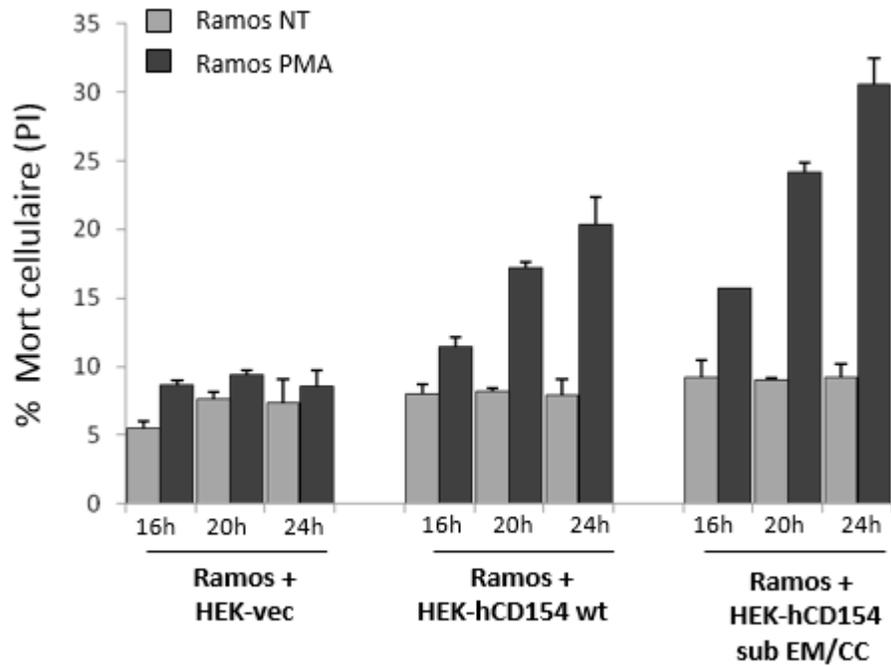


Figure 8. L'interaction du CD40 avec le hCD154 résistant à la surface des Ramos activées les rend plus sensibles à la mort : Les cellules Ramos traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules adhérentes exprimant le hCD154 wt, le hCD154 résistant au clivage ou le vecteur vide. La réponse à la mort a été analysée par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium après 16, 20 et 24 h d'incubation. Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

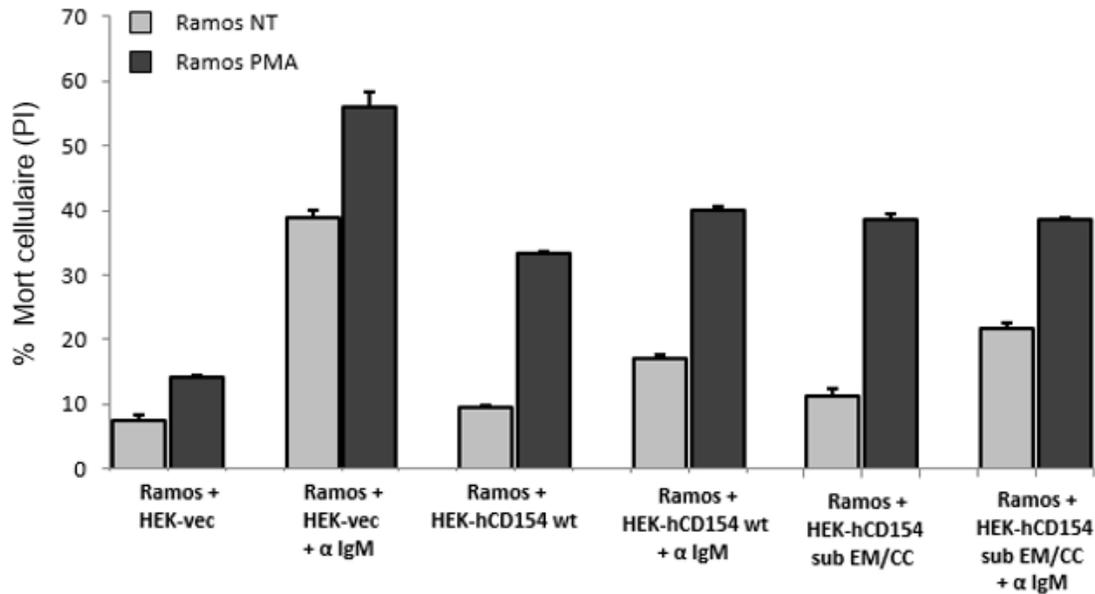


Figure 9. L'interaction du CD40 à la surface des Ramos avec le hCD154 wt ou le hCD154 résistant inhibe la mort via le BCR d'une façon comparable :

Les cellules Ramos, traitées ou non au PMA ont été co-cultivées avec des cellules adhérentes exprimant le hCD154 wt, le hCD154 résistant au clivage ou le vecteur vide, laissées préalablement adhérentes pendant 3 h. L'anticorps anti- IgM a été ajouté 1 h après. La réponse à la mort a été analysée après 24 h d'incubation par cytométrie en flux quantifiée par la mesure de l'absorption de l'iodure de propidium. Les résultats représentent la moyenne d'un duplicata d'une expérience représentative répétée 3 fois.

Chapitre 4 : Discussion

Le CD40, membre de la superfamille des récepteurs des TNF joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. Cette molécule a été initialement identifiée à la surface des cellules B, exprimée à tous les stades du développement lymphocytaire et persiste jusqu'au stade de plasmocyte [74, 76]. Par la suite, plusieurs études ont détecté sa présence sur la plupart des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, il est notamment exprimé sur toutes les cellules présentatrices d'antigènes [75]. Cependant, la conséquence de son engagement diffère selon le type et le stade de maturation cellulaire initiant différentes voies de signalisation. Son engagement à la surface des cellules B est nécessaire pour une réponse immunitaire humorale efficace induisant la prolifération des cellules B, leur différenciation et leur survie [111].

L'engagement du CD40 à la surface des cellules conduit le plus souvent à un signal de survie mais de plus en plus d'études ont mis en évidence son rôle dans la mort cellulaire. Cette sensibilité à la mort via CD40 a été rapportée dans une étude de Léveillé et coll. Les données obtenues montrent que l'engagement des molécules CD40 sur plusieurs lignées de lymphocytes B transformées conduit à une mort cellulaire rapide notamment sur les cellules du lymphome de Burkitt Raji qui sont EBV-positives alors que l'engagement du CD40 à la surface de cellules EBV-négatives induisait au contraire un signal de survie [131]. Ceci suggérerait que la sensibilité des cellules à la mort médiée par CD40 était due à leur état de transformation par le virus d'Epstein Barr. D'autres études appuient l'implication de l'état de transformation sur la mort cellulaire via CD40 sur des cellules d'origine mésenchymateuse et épithéliale [120] et sur des myélomes [123]. L'implication des protéines codées par l'EBV tel que le LMP-1 (Protéine membranaire latente-1) dans cette réponse n'est pas exclue car il est bien établi que le LMP-1 qui est une protéine membranaire, se lie aux TRAFs [137, 138] qui sont également associés aux membres de la famille des TNFR notamment le CD40 [101, 103], et ont été impliqués dans la mort cellulaire. Ainsi, le LMP-1 peut modifier les voies de signalisation couplées au CD40 menant à l'activation d'un système de mort cellulaire. Cependant les mécanismes exacts des interactions entre LMP-1 et TRAFs dans l'induction de la mort cellulaire via CD40 restent à investiguer.

Dans ce présent travail, nous avons investigué la possibilité d'induire la mort cellulaire via CD40 indépendamment de l'influence de l'état de transformation des cellules et/ou la présence

de protéines codées par l'EBV. Pour ce faire, on a étudié la mort dans un modèle de cellules B immatures EBV-négative, soit les Ramos et ce dans un état de repos ou suite à une activation par le PMA. Les résultats démontrent que l'état d'activation semble aussi être un facteur influençant la susceptibilité à la mort via CD40 aussi bien par son engagement avec des anticorps monoclonaux ou par interaction avec son ligand naturel, le CD154. Cependant, il est bien établi que l'engagement du CD40 sur ce type de cellules induit plutôt un signal de survie en inhibant la mort induite via le BCR [129, 130]. La conséquence de l'engagement du CD40 peut donc passer d'un signal de survie à un signal de mort lorsque les cellules sont activées. Ces résultats suggèrent que le CD40 peut activer différentes voies de signalisation dépendamment de l'état d'activation des cellules.

Plusieurs hypothèses sont envisageables, notamment l'implication d'autres membres des TNFRs qui contrairement au CD40 possèdent un "death domain". L'état d'activation pourrait donc augmenter l'expression de ces molécules et sensibiliser ainsi les cellules à la mort via ces derniers. Schattner et coll. ont rapporté que l'engagement du CD40 sur des lymphocytes B humains induisait l'expression de Fas et facilitait l'apoptose en empruntant cette voie de signalisation [139]. Cette étude suggère que les signaux transduits via CD40 et Fas qui semblent contradictoires soient liés dans le processus d'activation des cellules B humaines constituant ainsi une voie immunorégulatrice.

Une autre hypothèse concernerait la forme du CD40 exprimée à la surface des cellules. Nos résultats montrent que le niveau d'expression du CD40 augmente suite au traitement avec le PMA mais la forme sous laquelle était présente n'a pas été déterminée. En effet, la forme du CD40 est cruciale, nos études antérieures ont démontré que l'homo-dimérisation du CD40 était un phénomène essentiel pour l'initiation de certains signaux médiés par le CD40 notamment l'activation de PI-3K et l'expression du B7.2 [140, 141] ce qui suggère le rôle de cette homo-dimérisation dans la survie cellulaire. En plus, Jundi et coll. ont observé que les mutants de CD40 qui sont incapables de former des homo-dimères, présentaient plus de mort cellulaire par rapport au CD40 wt. Ces résultats indiquent que l'homo-dimérisation régule négativement l'effet apoptotique du CD40 [117], et que cette forme n'est possiblement pas celle associée avec l'effet de mort cellulaire de CD40 observé dans les cellules Ramos activées par le PMA

et dans les cellules B-positives pour EBV. Cependant des expériences supplémentaires sont nécessaires pour montrer ce fait.

D'autre part, comme nous l'avons précédemment décrit, le CD40 ne possède ni "death domain" ni domaine kinase dans sa partie cytoplasmique, sa signalisation est alors médiée par son association avec plusieurs effecteurs intracellulaires y compris les membres de la famille des TRAFs ou encore Jak3 qui est constitutivement associé au domaine intracellulaire du CD40. Plusieurs études se sont intéressées au rôle de chacune de ces molécules dans la signalisation via le CD40. Pour déterminer le rôle et l'implication de ces molécules dans la mort cellulaire, Jundi et coll. ont généré des cellules exprimant un CD40 muté au niveau du site de liaison avec Jak3 et d'autres exprimant un CD40 avec une mutation au niveau du site de liaison avec les TRAFs. Le défaut dans la liaison de Jak3 n'avait pas affecté l'apoptose dans les cellules stimulées par l'anticorps monoclonal anti-CD40 alors qu'elle était significativement réduite en l'absence du domaine de liaison de TRAFs. Afin d'identifier spécifiquement le ou les membres de la famille TRAF impliqués dans la mort cellulaire médiée par CD40, des mutations ponctuelles simple ou double dans la queue cytoplasmique de CD40 ont été introduites correspondant aux différents domaines de liaison de TRAF-2/TRAF-3 (T234A), TRAF-3 (Q243A) et TRAF-6 (EE-AA). Leurs résultats ont démontré que l'induction du signal de mort dépendait du recrutement et de l'association de la molécule adaptatrice TRAF-6 avec CD40 alors qu'il n'était pas affecté par TRAF-2/TRAF-3 [117]. Cette étude révèle aussi que la mort cellulaire médiée par CD40 nécessitait une perméabilisation de la membrane lysosomale et la libération subséquente de la cathepsine B. Il serait intéressant de voir dans le modèle Ramos décrit dans ce mémoire si CD40 utilise aussi TRAF-6.

Comme déjà mentionné, bien que le CD40 soit aussi impliqué dans la mort cellulaire, son rôle dans la survie est bien établi. La démonstration de ce rôle a été mise en évidence notamment dans l'inhibition de la mort cellulaire induite via le BCR. En effet, un certain nombre d'études ont établi que l'engagement des immunoglobulines de surface sur des lignées de cellules B immatures conduisait à la mort cellulaire programmée [142-144]. Valentine et coll. ont démontré que suite au traitement des cellules Ramos avec des anticorps dirigés contre leur immunoglobuline de surface, 20 à 40% des cellules devenaient apoptotiques après 18h [144]. L'ajout de plusieurs agents aux cellules Ramos a abrogé la mort induite par les anti-IgM, y

compris le PMA par une voie dépendante de la protéine kinase C [144]. L'implication de PKC dans l'inhibition de cette mort a été confirmée par l'utilisation d'un isomère du PMA, le 4 α PMA, qui contrairement au PMA, n'active pas PKC et n'inhibe pas la mort induite par le BCR. Cependant, dans cette même étude, il a été démontré que l'engagement du CD40 inhibait la mort induite par les anti-IgM mais par une voie indépendante de PKC [144].

Les résultats illustrés dans ce mémoire montrent au contraire que le traitement des cellules Ramos avec le PMA n'affecte pas la sensibilité de ces cellules à la mort via le BCR. De même, l'inhibition de la mort induite par le BCR suite à l'engagement du CD40 n'a pas été affectée par la présence de PMA. Il faudra déterminer par quel mécanisme cette mort se produit. Il n'est pas clair pourquoi le PMA a eu un effet contradictoire dans notre modèle mais des différences au niveau de l'activation du BCR pourraient être un facteur.

Une autre équipe a démontré que les anti-IgM provoquent l'arrêt de croissance et l'apoptose de ces lignées en déclenchant l'activation de la caspase-3 (CPP32) qui est considérée parmi les effecteurs majeurs de la mort apoptotique. Elle agit en clivant un substrat qui joue un rôle important dans la réparation de l'ADN, le poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et inhibe ainsi en grande partie son activité [130]. Ce processus est inhibé par des signaux transduits via le CD40 exprimé à la surface de ces cellules indépendamment de l'expression de Bcl-2 [130].

Les travaux mentionnés ci-haut se sont intéressés à l'inhibition de la mort des cellules B immatures induite via le BCR et ce suite à l'engagement du CD40 avec des anticorps monoclonaux. Nous nous sommes alors intéressés à étudier l'effet de l'interaction du CD40 avec son ligand naturel, le CD154 sur la mort induite via le BCR en co-cultivant des cellules Ramos avec des cellules HEK stablement transfectées avec le hCD154 wt. Nos résultats montrent que cette interaction CD40/CD154 inhibait significativement la mort des Ramos indépendamment de l'état d'activation des cellules. Par ailleurs, des études menées sur des cellules du carcinome montrent que le niveau d'engagement du CD40 influait la réponse physiologique. Un niveau faible favorise la prolifération et la survie alors qu'un niveau d'engagement plus élevé induisait l'arrêt de croissance et l'apoptose [145-147]. La nature du stimulus CD40 affecte aussi ces réponses avec une induction plus importante de la mort cellulaire dans les cellules de carcinome induite par un CD154 lié à la membrane comparée au CD154 soluble recombinant. Bugajska et coll. ont démontré que seule l'interaction du CD40

avec la forme membranaire de son ligand conduisait à l'apoptose dans les tumeurs urothéliales, la liaison du CD40 avec la forme soluble était seulement capable d'arrêter la prolifération de ces cellules [148].

Comme déjà décrit, le ligand naturel du CD40, le CD154, comme tous les membres de la famille des TNF, existe sous 2 formes: une forme membranaire et une forme soluble résultant d'un clivage enzymatique par des métalloprotéinases ADAM10, ADAM17 [84]. Toutefois, le CD40 est capable d'interagir avec les deux formes du CD154.

Nous avons donc généré des cellules HEK-CD154 sub EM/CC exprimant un CD154 résistant au clivage qui suite à son interaction avec le CD40 reste lié à la surface membranaire. L'objectif est d'étudier et comparer l'effet de cette mutation sur la réponse à la mort du couple CD40/CD154 dans notre modèle. Pour pouvoir comparer les résultats obtenus, nous avons utilisé des cellules HEK stablement transfectées avec le hCD154 substitué ou le hCD154 wt avec un niveau d'expression comparable. A noter que la liaison CD40/CD154 n'était pas affectée suite à cette mutation.

Les résultats obtenus montrent que la susceptibilité à la mort des Ramos était plus importante après interaction de leur CD40 avec le hCD154 résistant au clivage ce qui conforte le rôle apoptotique de la forme membranaire. Par contre, l'interaction du CD40 avec le hCD154 wt ou le hCD154 résistant inhibait de façon comparable la mort des Ramos induite via le BCR.

Enfin, un certain nombre d'études ont tenté de décrire le mécanisme impliqué dans la mort cellulaire induite par le CD40 en utilisant un CD154 résistant au clivage, Elmetwali et coll. ont démontré que la forme résistante au clivage du ligand CD154 stabilise TRAF-3 et conduit à une apoptose par une voie JNK dépendante et régule négativement TRAF-6 et ses signaux de survie médiée par PI-3K/Akt [149].

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

Dans nos résultats illustrés dans ce mémoire, on a montré que la lignée Ramos qui est EBV-négative est insensible à la mort via CD40 dans un état non-activé (au repos), mais suite à une activation (activées par le PMA), le CD40 pouvait aussi mener à une mort cellulaire.

Il serait donc intéressant dans un premier temps de voir si on obtient les mêmes effets avec d'autres activateurs comme l'IL-4 qui est importante dans l'activation des lymphocytes B et comprendre comment cet état d'activation sensibilise ces cellules à la mort cellulaire. Pour répondre à cela, il faudrait comparer plusieurs aspects de ces cellules avant et après leur activation: déterminer la forme du CD40 exprimée à leur surface, voir si le CD40 recrute, au niveau de sa partie cytoplasmique, des effecteurs différents qui sont nécessaires pour la transduction du signal via le CD40 et peuvent influencer la réponse cellulaire et enfin vérifier le profil d'expression des autres membres des TNFR impliqués dans la mort cellulaire. Il serait intéressant aussi de voir si cette sensibilité à la mort est observée dans des cellules du sang périphérique ou encore dans un modèle pathologique. Par la suite, il est important de déterminer quelle voie de signalisation emprunte le CD40 pour conduire à cette mort cellulaire.

Par ailleurs, le CD40 pouvait aussi inhiber la mort cellulaire induite par le BCR. Il est donc tentant de spéculer que le CD40 puisse contribuer à la réponse immune en fournissant des signaux de survie durant l'activation des cellules B mais qu'il pourrait aussi contribuer à la résolution de la réponse immune en favorisant la mort cellulaire. Nos études ouvrent donc la voie pour l'étude de cette possibilité dans un contexte physiologique de réponse immune associé au développement et de différenciation des lymphocytes B comme dans les modèles d'influenza ou d'infections bactériennes.

Enfin, la capacité de CD40 d'induire la mort cellulaire dans les lignées B transformées ou pas par EBV pourrait constituer une cible thérapeutique pour améliorer les traitements contre les lymphomes B en général.

Bibliographie

1. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
2. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
3. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 416-23.
4. Zeh, H.J., 3rd and M.T. Lotze, *Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death*. J Immunother, 2005. **28**(1): p. 1-9.
5. Srinivas, S.P., R. Mutharasan, and S. Fleiszig, *Shear-induced ATP release by cultured rabbit corneal epithelial cells*. Adv Exp Med Biol, 2002. **506**(Pt A): p. 677-85.
6. Rich, P.B., et al., *Adenosine triphosphate is released during injurious mechanical ventilation and contributes to lung edema*. J Trauma, 2003. **55**(2): p. 290-7.
7. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
8. Sauter, B., et al., *Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 423-34.
9. Berwin, B., R.C. Reed, and C.V. Nicchitta, *Virally induced lytic cell death elicits the release of immunogenic GRP94/gp96*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21083-8.
10. Somersan, S., et al., *Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 4844-52.
11. Zhou, Z., et al., *Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27320-6.
12. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer, 1994. **73**(8): p. 2013-26.
13. Blagosklonny, M.V., *Cell death beyond apoptosis*. Leukemia, 2000. **14**(8): p. 1502-8.
14. Curtin, J.F. and T.G. Cotter, *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*. Cell Signal, 2003. **15**(11): p. 983-92.
15. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
16. Chittenden, T., et al., *Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak*. Nature, 1995. **374**(6524): p. 733-6.
17. Hsu, Y.T., K.G. Wolter, and R.J. Youle, *Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3668-72.
18. Huang, Q., et al., *Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3428-33.
19. Boise, L.H., et al., *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 597-608.
20. Viktorsson, K., R. Lewensohn, and B. Zhivotovsky, *Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies*. Adv Cancer Res, 2005. **94**: p. 143-96.

21. Forro, G., *Thèse: The signalling pathway of BimL and BimS, two isoforms of the BH3-only protein Bim, in apoptosis.* 2009.
22. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.* Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
23. Cregan, S.P., V.L. Dawson, and R.S. Slack, *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death.* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2785-96.
24. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
25. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis.* Biochem J, 1997. **326 (Pt 1)**: p. 1-16.
26. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.* Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
27. Clarke, P. and K.L. Tyler, *Apoptosis in animal models of virus-induced disease.* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(2): p. 144-55.
28. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death.* Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
29. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
30. Dhein, J., et al., *Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens.* J Immunol, 1992. **149**(10): p. 3166-73.
31. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.* Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
32. Boldin, M.P., et al., *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain.* J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7795-8.
33. Wang, K., et al., *BID: a novel BH3 domain-only death agonist.* Genes Dev, 1996. **10**(22): p. 2859-69.
34. Gross, A., et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death.* J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1156-63.
35. Scaffidi, C., et al., *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.* J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1541-8.
36. Rath, P.C. and B.B. Aggarwal, *TNF-induced signaling in apoptosis.* J Clin Immunol, 1999. **19**(6): p. 350-64.
37. Magnusson, C. and D.L. Vaux, *Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(1): p. 41-6.
38. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.* Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
39. Hymowitz, S.G., et al., *Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5.* Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 563-71.
40. Schneider, P., et al., *TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB.* Immunity, 1997. **7**(6): p. 831-6.
41. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.* Science, 1997. **277**(5327): p. 818-21.

42. Marsters, S.A., et al., *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. *Curr Biol*, 1997. **7**(12): p. 1003-6.
43. Reth, M., *Antigen receptors on B lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 97-121.
44. Hombach, J., et al., *Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class*. *Nature*, 1990. **343**(6260): p. 760-2.
45. Berry, R., et al., *Insight into the basis of autonomous immunoreceptor activation*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(4): p. 165-70.
46. Goding, J.W., D.W. Scott, and J.E. Layton, *Genetics, cellular expression and function of IgD and IgM receptors*. *Immunol Rev*, 1977. **37**: p. 152-86.
47. Vitetta, E.S. and J.W. Uhr, *Cell surface immunoglobulin. XV. The presence of IgM and an IgD-like molecule on the same cell in murine lymphoid tissue*. *Eur J Immunol*, 1976. **6**(2): p. 140-3.
48. Puffer, E.B., et al., *Activating B cell signaling with defined multivalent ligands*. *ACS Chem Biol*, 2007. **2**(4): p. 252-62.
49. Carrasco, Y.R. and F.D. Batista, *B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(3): p. 286-91.
50. Schelling, M.E. and P.H. Silverman, *The effect of route of injection upon the development of circulating antibody in response to a variety of antigens*. *Immunology*, 1968. **14**(6): p. 781-5.
51. Benjamin, C.D., et al., *A predominant idiootype on anti-hen egg white lysozyme antibodies from diverse mouse strains*. *J Immunol*, 1980. **125**(3): p. 1017-25.
52. Kim, Y.M., et al., *Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(9): p. 3327-32.
53. Minguet, S., E.P. Dopfer, and W.W. Schamel, *Low-valency, but not monovalent, antigens trigger the B-cell antigen receptor (BCR)*. *Int Immunol*, 2010. **22**(3): p. 205-12.
54. Mukherjee, S., et al., *Monovalent and multivalent ligation of the B cell receptor exhibit differential dependence upon Syk and Src family kinases*. *Sci Signal*, 2013. **6**(256): p. ra1.
55. Avalos, A.M. and H.L. Ploegh, *Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 92.
56. Ubelhart, R., et al., *Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(5): p. 534-43.
57. Avalos, A.M., et al., *Monovalent engagement of the BCR activates ovalbumin-specific transnuclear B cells*. *J Exp Med*, 2014. **211**(2): p. 365-79.
58. Woodruff, M.F., B. Reid, and K. James, *Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on human lymphocytes in vitro*. *Nature*, 1967. **215**(5101): p. 591-4.
59. Benschop, R.J. and J.C. Cambier, *B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(2): p. 143-51.
60. DeFranco, A.L., *The complexity of signaling pathways activated by the BCR*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(3): p. 296-308.
61. Nussenzweig, M.C., *Immune receptor editing: revise and select*. *Cell*, 1998. **95**(7): p. 875-8.

62. Sproul, T.W., et al., *Cutting edge: B cell antigen receptor signaling occurs outside lipid rafts in immature B cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6020-3.
63. Chung, J.B., M.A. Baumeister, and J.G. Monroe, *Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 736-40.
64. Guo, B., et al., *Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex*. Immunity, 2000. **13**(2): p. 243-53.
65. Pierce, S.K., *Lipid rafts and B-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 96-105.
66. Delves Peter J, Seamus Martin , Dennis-R Burton et Ivan Roitt, *Fondements de l'immunologie*. 2008.
67. Fu, C., et al., *BLNK: a central linker protein in B cell activation*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 93-103.
68. Wienands, J., et al., *SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation*. J Exp Med, 1998. **188**(4): p. 791-5.
69. Takata, M. and T. Kurosaki, *A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 31-40.
70. Choi, M.S., et al., *The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1352-7.
71. Paulie, S., et al., *A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. Cancer Immunol Immunother, 1985. **20**(1): p. 23-8.
72. Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4494-8.
73. Stamenkovic, I., E.A. Clark, and B. Seed, *A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas*. EMBO J, 1989. **8**(5): p. 1403-10.
74. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.
75. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
76. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
77. LING, N.R., MACLENNAN, I.C.M. & MASON, D.Y, *B cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters*. In: *Leucocyte Typing III* 1987: p. 302.
78. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
79. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
80. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby, *CD154 (CD40 ligand)*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(7): p. 687-93.

81. Kaufman, J., P.J. Sime, and R.P. Phipps, *Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1862-71.
82. Santilli, F., et al., *CD40/CD40L system and vascular disease*. Intern Emerg Med, 2007. **2**(4): p. 256-68.
83. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(6): p. 1749-54.
84. Yacoub, D., et al., *CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner*. J Biol Chem, 2013. **288**(50): p. 36083-93.
85. Bajorath, J., et al., *Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction*. Biochemistry, 1995. **34**(6): p. 1833-44.
86. Bajorath, J., et al., *Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1995. **34**(31): p. 9884-92.
87. Brodeur, S.R., et al., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 837-48.
88. Wang, Y., et al., *CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 971-83.
89. Grammer, A.C. and P.E. Lipsky, *CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms*. Adv Immunol, 2000. **76**: p. 61-178.
90. Faris, M., et al., *CD40 signaling pathway: anti-CD40 monoclonal antibody induces rapid dephosphorylation and phosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins including protein tyrosine kinase Lyn, Fyn, and Syk and the appearance of a 28-kD tyrosine phosphorylated protein*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1923-31.
91. van Kooten, C. and J. Banchereau, *Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 330-7.
92. Ren, C.L., et al., *Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 673-80.
93. Sutherland, C.L., et al., *Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3381-90.
94. Berberich, I., et al., *Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases*. EMBO J, 1996. **15**(1): p. 92-101.
95. Gulbins, E., et al., *Activation of the Ras signaling pathway by the CD40 receptor*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2844-50.
96. Sakata, N., et al., *Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30823-8.
97. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
98. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 775-86.
99. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling*. Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 131-51.

100. Davies, C.C., et al., *TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(22): p. 9806-19.
101. Cheng, G., et al., *Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1494-8.
102. Xu, Y., G. Cheng, and D. Baltimore, *Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses*. Immunity, 1996. **5**(5): p. 407-15.
103. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
104. Rothe, M., et al., *I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8241-6.
105. Ishida, T.K., et al., *TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9437-42.
106. Ishida, T., et al., *Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28745-8.
107. Nakano, H., et al., *Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9803-8.
108. Chaudhuri, A., et al., *CD40-mediated signals inhibit the binding of TNF receptor-associated factor 2 to the CD40 cytoplasmic domain*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4244-51.
109. Hanissian, S.H. and R.S. Geha, *Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 379-87.
110. Hassan, G.S., et al., *Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses*. Curr Immunol Rev, 2009. **5**: p. p. 285-299.
111. Foy, T.M., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 591-617.
112. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
113. Hu, B.T., et al., *Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1068-71.
114. Renshaw, B.R., et al., *Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1889-900.
115. Xu, J., et al., *Mice deficient for the CD40 ligand*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 423-31.
116. Kawabe, T., et al., *The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation*. Immunity, 1994. **1**(3): p. 167-78.
117. Jundi, M., et al., *CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment*. Immunobiology, 2012. **217**(3): p. 375-83.
118. Funakoshi, S., et al., *Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation*. Blood, 1994. **83**(10): p. 2787-94.

119. Marches, R., et al., *Tumour dormancy and cell signalling--III: Role of hypercrosslinking of IgM and CD40 on the induction of cell cycle arrest and apoptosis in B lymphoma cells*. *Ther Immunol*, 1995. **2**(3): p. 125-36.
120. Hess, S. and H. Engelmann, *A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells*. *J Exp Med*, 1996. **183**(1): p. 159-67.
121. Hirano, A., et al., *Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand*. *Blood*, 1999. **93**(9): p. 2999-3007.
122. Pellat-Deceunynck, C., et al., *CD11a-CD18 and CD102 interactions mediate human myeloma cell growth arrest induced by CD40 stimulation*. *Cancer Res*, 1996. **56**(8): p. 1909-16.
123. Bergamo, A., R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck, *CD40 and CD95 induce programmed cell death in the human myeloma cell line XG2*. *Br J Haematol*, 1997. **97**(3): p. 652-5.
124. Leveille, C., et al., *CD40 associates with the MHC class II molecules on human B cells*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(11): p. 3516-26.
125. Segui, B., et al., *CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(52): p. 37251-8.
126. Ujjani, C. and B.D. Cheson, *Monoclonal antibodies in advanced B-cell lymphomas*. *Oncology (Williston Park)*, 2010. **24**(2): p. 156-66.
127. Law, C.L. and I.S. Grewal, *Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **647**: p. 8-36.
128. Datta, S.K. and S.L. Kalled, *CD40-CD40 ligand interaction in autoimmune disease*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(10): p. 1735-45.
129. Wang, H., et al., *Repression of apoptosis in human B-lymphoma cells by CD40-ligand and Bcl-2: relationship to the cell-cycle and role of the retinoblastoma protein*. *Oncogene*, 1996. **13**(2): p. 373-9.
130. An, S. and K.A. Knox, *Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP*. *FEBS Lett*, 1996. **386**(2-3): p. 115-22.
131. Leveille, C., et al., *CD40- and HLA-DR-mediated cell death pathways share a lot of similarities but differ in their use of ADP-ribosyltransferase activities*. *Int Immunol*, 1999. **11**(5): p. 719-30.
132. Al-Zoobi, L., et al., *Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface*. *Int Immunol*, 2014. **26**(8): p. 451-65.
133. Elmetwali, T., et al., *CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 52.
134. Salti, S., *Mémoire de maîtrise: L'implication du CD154 résistant au clivage enzymatique dans l'activité anti-tumorale*. 2015.
135. El Fakhry, Y., et al., *Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 770-9.
136. Davies, C.C., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(2): p. 1010-9.

137. Mosialos, G., et al., *The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family*. *Cell*, 1995. **80**(3): p. 389-99.
138. Sandberg, M., W. Hammerschmidt, and B. Sugden, *Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3*. *J Virol*, 1997. **71**(6): p. 4649-56.
139. Schattner, E.J., et al., *CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway*. *J Exp Med*, 1995. **182**(5): p. 1557-65.
140. Reyes-Moreno, C., et al., *CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 7799-806.
141. Reyes-Moreno, C., et al., *Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(27): p. 19473-80.
142. Benhamou, L.E., P.A. Cazenave, and P. Sarthou, *Anti-immunoglobulins induce death by apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(6): p. 1405-7.
143. Hasbold, J. and G.G. Klaus, *Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(8): p. 1685-90.
144. Valentine, M.A. and K.A. Licciardi, *Rescue from anti-IgM-induced programmed cell death by the B cell surface proteins CD20 and CD40*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(12): p. 3141-8.
145. Challa, A., et al., *Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells*. *Blood*, 2002. **99**(9): p. 3411-8.
146. Pham, L.V., et al., *A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas*. *Immunity*, 2002. **16**(1): p. 37-50.
147. Baxendale, A.J., et al., *Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth*. *Oncogene*, 2005. **24**(53): p. 7913-23.
148. Bugajska, U., et al., *The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(18): p. 1381-95.
149. Elmetwali, T., L.S. Young, and D.H. Palmer, *CD40 ligand-induced carcinoma cell death: a balance between activation of TNFR-associated factor (TRAF) 3-dependent death signals and suppression of TRAF6-dependent survival signals*. *J Immunol*, 2010. **184**(2): p. 1111-20.