

Université de Montréal

# **Le rôle du CD40 homodimère dans la réponse immunitaire**

par

Malek Jundi

Département de microbiologie-immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D.)  
en microbiologie-immunologie

Juin, 2013

© Malek Jundi, 2013



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Le rôle du CD40 homodimère dans la réponse immunitaire

présenté par :

Malek Jundi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Idriss Djilali-Saiah, président-rapporteur

Dr. Walid Mourad, directeur de recherche

Dre. Nathalie Arbour, membre du jury

Dr. André Darveau, examinateur externe

## Résumé

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, appartenant à la famille des TNFRs, exprimée à la surface des cellules immunitaires, hématopoïétiques, vasculaires, épithéliales, et d'autres types de cellules, y compris les cellules tumorales. Le CD40 ne possédant pas de domaine kinase, pour induire un signal il interagit directement ou indirectement avec des protéines adaptatrices telles que les TRAFs et les JAKs. L'interaction du CD40 avec son principal ligand, le CD154, joue un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire et le maintien de l'homéostasie. L'activation du CD40 à la surface des cellules B augmente leur capacité de présentation d'antigène, en plus d'induire la prolifération, la commutation isotypique et l'apoptose. Les patients souffrant de mutations au niveau du gène codant pour le CD40 ou de son ligand sont immunosupprimés et sensibles à des infections opportunistes. Des études ont montré que le CD40 comme d'autres membres de la famille des TNFRs est capable de former des homodimères. Plus récemment, on a montré que la formation du CD40 homodimère est le résultat de son engagement sur les cellules B. En plus, cette homodimérisation du CD40 est importante pour la phosphorylation de l'Akt. L'interaction CD40/CD154 peut avoir un rôle direct dans l'immunothérapie par l'induction de l'apoptose de certaines cellules cancéreuses ou un rôle indirect en activant les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) afin d'augmenter l'efficacité de l'activation des cellules T cytotoxiques. Nos résultats montrent que l'induction de la mort cellulaire par le CD40 requiert la perméabilisation du lysosome, la libération de la cathepsine B, la présence de ROS et une interaction avec le TRAF6, cette mort cellulaire programmée est plus importante en présence de la forme monomérique du CD40, muté au niveau de la cystéine 238. Par ailleurs, l'homodimérisation du CD40 requerrait sa translocation vers les radeaux lipidiques et nécessiterait la présence des ROS. Cette homodimérisation du CD40 semble être importante pour l'activation des cellules B par le biais de l'induction de l'expression du CD23, CD69 et CD80. De plus, nos résultats montrent pour la première fois une implication du CD40 homodimère dans l'induction du CD23 par le biais du TLR4. Nos résultats soulignent l'importance du CD40 homodimère dans certaines voies de signalisation. Ainsi, ils mettent en évidence le rôle de la Cys-238 dans la coopération entre des récepteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. Toutes ces données permettraient une meilleure

compréhension de certaines voies de signalisation impliquées dans plusieurs maladies auto-immunes et faisant objet de plusieurs essais thérapeutiques.

**Mots-clés** : db-CD40 homodimère, cathepsine B, mort cellulaire, radeaux lipidiques, ROS, activation de cellules B, récepteur de type Toll (TLR), TRAF6

## **Abstract**

CD40 is a type I transmembrane glycoprotein belonging to the TNFRs family, which is expressed on the surface of immune, hematopoietic cells, vascular, epithelial, and other cell types, including a wide range of tumour cells. CD40 does not have a kinase domain. Thus, to induce a signal, CD40 interacts directly or indirectly with adapter proteins such as TRAFs and Jaks. The interaction of CD40 with its main ligand, CD154, plays an important role in regulating the immune response and homeostasis. The activation of CD40 on the surface of B cells increases its ability to promote antigen presentation, in addition to inducing proliferation, isotype switching, and apoptosis. Patients affected by mutations in the gene encoding the CD40 or its ligand are immunosuppressed and susceptible to opportunistic infections. Studies have shown that CD40, as other members of the family of TNFRs is capable of forming homodimers. More recently, it was shown that the formation of the CD40 homodimer is the result of the engagement of CD40 on B cells by CD154. In addition, the homodimerization of CD40 is important for the phosphorylation of Akt. The CD40/CD154 interaction can have a direct role in immunotherapy by inducing apoptosis of some cancer cells or an indirect role in activating antigen-presenting cells (APCs), thereby increasing the effectiveness of activation of cytotoxic T cells. Our results show that the induction of cell death by CD40 requires permeabilization of the lysosome, the release of cathepsin B, the presence of ROS and interaction with TRAF6, this programmed cell death is greater in the presence of the monomeric form of CD40, due to a mutation at the level of the cysteine 238. Moreover, the homodimerization of CD40 requires its translocation to lipid rafts and the presence of ROS. This homodimerization is necessary for the CD40 B-cell activation via the induction of expression of CD23, CD69 and CD80. In addition, our results show for the first time the involvement of the CD40 homodimer in the induction of CD23 expression via TLR4. Our results emphasize the importance of CD40 homodimer in signaling pathways and highlight the role of Cys-238 in the cooperation between receptors of the innate and adaptive immune response. All together our results will allow a better understanding of CD40 signaling pathways involved in several autoimmune diseases, which give a rise to a better therapeutic trial design.

**Keywords** : db-CD40 homodimer, cathepsin B, cell death, lipid rafts, ROS, B cell activation, toll-like receptors (TLR), TRAF6.

## Liste des abréviations

<b>aa</b>	Acide aminé
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>AcM</b>	Anticorps monoclonal
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>CIA</b>	<i>Collagen induced arthritis</i> (Arthrite induite par le collagène)
<b>CD40L</b>	CD40 ligand
<b>CG</b>	Centre germinatif
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellules présentatrices d'antigènes
<b>CRD</b>	<i>Cysteine rich domain</i> (domaine riche en cystéine)
<b>DAMP</b>	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
<b>DD</b>	<i>Death domain</i>
<b>DED</b>	<i>Death effector domain</i>
<b>EBV</b>	<i>Epstein Barr virus</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated mitogen activated protein kinase</i>
<b>HEK</b>	Human Embrionic Kidney
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>INF</b>	Interféron
<b>JAK</b>	janus tyrosine kinase
<b>JNK</b>	c-jun amino-terminal kinase
<b>LMP</b>	Lysosomal membrane permeabilization
<b>MCP</b>	Mort cellulaire programmée
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) polymérase
<b>PI</b>	Propidium iodide
<b>PMA</b>	Phorbol myristate acétate

<b>PMM</b>	Perméabilisation de la membrane mitochondriale
<b>PTK</b>	protéine tyrosine kinase
<b>RCB</b>	Récepteur des cellules B
<b>RCT</b>	Récepteur des cellules T
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>TM</b>	Transmembrane
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNFR</b>	TNF receptor
<b>TPA</b>	Tétradécanoylphorbol acétate
<b>TRAF</b>	TNFR associated factor

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des abréviations.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Chapitre 1. Introduction.....	16
1.1. Le CD40.....	17
1.2. L'expression du CD40 à la surface des cellules.....	18
1.2.1. Expression du CD40 sur les cellules B.....	18
1.2.2. L'expression du CD40 sur différents types cellulaires.....	19
1.2.3. Les cellules présentatrices d'antigènes.....	21
1.2.4. Les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes.....	21
1.2.5. Les lymphocytes T.....	21
1.3. L'appartenance du CD40 à la famille des Tumor necrosis factor receptors.....	21
1.4. La régulation du CD40.....	24
1.5. Les différents ligands du CD40.....	25
1.5.1. Le CD40L (CD154).....	25
1.5.2. Le C4b Binding Protein (C4BP).....	27
1.5.3. Le Heat shock protein 70 (HSP70).....	28
1.6. La signalisation intracellulaire.....	28
1.6.1. Les protéines adaptatrices.....	29
1.6.1.1. Les TNFR-associated factors (TRAFs).....	29
1.6.1.1.1. TRAF1 :.....	31
1.6.1.1.2. TRAF2 :.....	32
1.6.1.1.3. TRAF3 :.....	32
1.6.1.1.4. TRAF5 :.....	33
1.6.1.1.5. TRAF6 :.....	33
1.6.1.2. Janus tyrosine kinases (JAKs).....	33

1.6.2.	La signalisation dépendante des TRAFs.....	34
1.6.2.1.	L'activation des protein tyrosine kinases (PTK) .....	34
1.6.2.2.	L'activation des protéines sérine/thréonine kinases .....	34
1.6.2.3.	L'activation des facteurs de transcriptions .....	35
1.6.3.	La signalisation indépendante des TRAFs.....	36
1.7.	L'impact de l'oligomérisation du CD40.....	37
1.7.1.	L'agrégation homotypique du CD40 : .....	38
1.7.1.1.	Le preligand assembly domain (PLAD) .....	38
1.7.1.2.	Les radeaux lipidiques .....	39
1.7.1.3.	L'homodimérisation du CD40 .....	40
1.8.	Le CD40 : un pont entre l'immunité innée et adaptative.....	42
1.8.1.	La réponse immunitaire adaptative.....	42
1.8.1.1.	La régulation de la réponse humorale : .....	42
1.8.1.2.	La régulation de la réponse cellulaire.....	44
1.8.1.3.	Régulation de la différenciation des cellules B par le CD40.....	44
1.8.1.4.	L'activation des lymphocytes B.....	45
1.8.1.4.1.	La synapse immunologique.....	45
1.8.1.4.2.	L'axe CD80/CD86.....	48
1.8.1.4.3.	Le CD23.....	49
1.8.1.4.4.	Le CD69.....	50
1.8.2.	Régulation par le CD40 de la réponse immunitaire innée.....	52
1.8.2.1.	La famille des TLRs.....	52
1.8.2.1.1.	Les ligands des TLRs.....	52
1.8.2.1.2.	La signalisation via les TLRs.....	54
1.8.2.1.3.	Expression des TLRs .....	55
1.8.2.1.4.	Rôle des TLRs dans l'immunité innée.....	56
1.8.2.1.5.	Rôle des TLRs dans l'immunité adaptative.....	56
1.8.2.2.	La synergie entre le CD40 et les TLRs.....	57
1.9.	Le rôle du CD40/CD154 dans la pathogénèse.....	59
1.9.1.	Rôle du CD40 dans les maladies inflammatoires .....	59
1.9.2.	Le rôle du CD40 dans l'auto-immunité .....	61

1.9.2.1.	L'arthrite rhumatoïde .....	62
1.9.2.2.	Le lupus érythémateux disséminé .....	63
1.9.2.3.	L'allergie.....	64
1.10.	Le rôle du CD40 dans la mort cellulaire .....	65
1.10.1.	L'apoptose.....	66
1.10.2.	Les organelles impliquées dans la mort cellulaire. ....	69
1.10.2.1.	La mitochondrie .....	69
1.10.2.2.	Le lysosome. ....	70
1.10.3.	Les activateurs de l'apoptose .....	71
1.10.3.1.	Les caspases .....	71
1.10.3.2.	Les cathepsines .....	73
1.10.4.	La régulation de la mort cellulaire par le CD40. ....	74
1.11.	Le CD40 et les traitements thérapeutiques .....	76
1.12.	L'hypothèse et les objectifs de travail .....	77
Chapitre 2. Le recrutement du TRAF6 est requis pour l'induction de la mort cellulaire par le CD40		
	80	
2.1.	Mise en contexte .....	81
2.2.	Contribution des co-auteurs .....	82
2.3.	Résumé.....	83
Chapitre 3. L'importance de la translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques pour l'induction de certaines réponses biologiques.....		
	114	
3.1.	Mise en contexte .....	115
3.2.	Contribution des co-auteurs .....	116
3.3.	Résumé.....	117
Chapitre 4. La cystéine 238 du CD40 est nécessaire pour l'activation des cellules B.....		
	156	
4.1.	Mise en contexte .....	157
4.2.	Contribution des co-auteurs .....	158
4.3.	Résumé.....	159
Chapitre 5. La cystéine 238 du CD40 est nécessaire pour la régulation de la signalisation induite par le TLR4.....		
	192	
5.1.	Mise en contexte .....	193

5.2. L'homodimérisation du CD40 augmente l'induction du CD23 par le TLR4.....	194
5.3. La mutation de la proline au niveau 227 du CD40 affecte l'induction de l'expression du CD23.....	195
5.4. La voie PI-3 kinase est nécessaire pour la régulation de l'expression du CD23.....	195
Discussion.....	202
Conclusion .....	219
Bibliographie.....	222

## Liste des tableaux

<b>Tableau I: Le niveau d'expression du CD40 à la surface de différents types cellulaires.</b>	20
<b>Tableau II: Le rôle du CD40 dans les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques.</b>	20
<b>Tableau III L'expression des ligands et des récepteurs membres de la superfamille des <i>tumor-necrosis factor</i></b>	23
<b>Tableau IV: Le niveau d'expression du CD40L à la surface de différents types cellulaires.</b>	27

## Liste des figures

### Chapitre 1: Introduction:

Figure 1: L'homologie entre le CD40 humain et le CD40 murin. ....	18
Figure 2: L'interaction entre le CD40 et les protéines adaptatrices.....	29
Figure 3: La structure des membres de la famille des TRAFs.....	31
Figure 4: La signalisation induite par le CD40.....	37
Figure 5: La structure des radeaux lipidiques. ....	40
Figure 6: Le rôle de l'homodimérisation du CD40 dans l'induction de la signalisation. ....	42
Figure 7: Un aperçu d'un synapse immunologique mature à la surface d'une cellule T.....	46
Figure 8 Différents modèles de synapses immunologiques.....	47
Figure 9: Les différents membres des TLRs et leurs ligands.....	54
Figure 10: Mécanisme par lequel l'interaction CD40/CD40L pourrait induire l'auto-immunité. .....	62
Figure 11: Les récepteurs de la mort cellulaire appartenant à la famille des TNFR. ....	68
Figure 12: L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. ....	69
Figure 13: L'implication des organelles dans l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque ou intrinsèque.....	71
Figure 14: La structure des différentes caspases.....	72
Figure 15: Les sites de clivage des différentes caspases.....	72

### Chapitre 2 Le recrutement du TRAF6 est requis pour l'induction de la mort cellulaire par le CD40 (article # 1)

Figure 1: Apoptosis of Raji cells upon CD40 engagement requires ROS production and LMP. ....	108
Figure 2: CD40 cytoplasmic domain is required for cell death induction in HEK 293 cells. .....	109
Figure 3: CD40-mediated cell death is independent of NFκB activation.....	110
Figure 4: The formation of CD40 homodimer is not required for CD40-mediated apoptosis. ....	111
Figure 5: CD40-mediated cell death is dependent of TRAF- signaling. ....	112
Figure 6: CD40-induced cell death requires TRAF6-mediated signaling. ....	113

### Chapitre 3: L'importance de la translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques pour l'induction de certaines réponses biologiques. (article # 2)

Figure 1: CD40 translocation into lipid rafts occurs independently of signaling events. ....	147
Figure 2: CD40-mediated activation of Akt is dependent upon lipid raft integrity.....	148

Figure 3: Soluble human CD154 specifically binds to human CD40wt and CD40/CD45 ectopically expressed in mouse B cells, while it differentially activates these receptors.	149
Figure 4: CD80 expression was unbraided upon engagement of chimeric CD40/CD45 receptor. ....	150
Figure 5. CD40-mediated CD80 upregulation is dependent on PI-3K activation. ....	151
Figure S-1. Soluble human CD154 differentially activates hCD40wt or hCD40/CD45.	152
Figure S-2. Human CD154 differentially modulate CD80 expression via CD40wt or CD40/CD45. ....	153
Figure S-3. CD80 upregulation induced by CD154 stimulation of CD40 is dependent on PI-3K activation. ....	154
Figure S-4. Gating strategy in FACS analysis. ....	155
<b>Chapitre 4 La cystéine 238 du CD40 est nécessaire pour l'activation des cellules B.</b>	
Figure 1: Effect of Oxidative Stress on CD40 homodimer formation.....	183
Figure 2: Treatment with G28-5 induces the formation of CD40 homodimers. ....	184
Figure 3: CD40-mediated ROS production occurs independently of CD40. ....	185
Figure 4: Cys-238 mediated CD40 homodimers enhance B cell activation. ....	186
Figure 5: CD40-P227A failed to induce CD23 expression after CD40 engagement. ....	187
Figure 6: CD40-mediated CD23 expression is PI3-Kinase dependent. ....	188
Figure S-1: CD40-mediated ROS production occurs independently of CD40. ....	189
Figure S-2: Cys-238 mediated CD40 homodimers enhance B cell activation. ....	190
<b>Chapitre 5 La cystéine 238 du CD40 est nécessaire pour la régulation de la signalisation induite par le TLR4.</b>	
Figure 1: La cystéine C238 est nécessaire pour l'induction de l'expression du CD23 par le LPS. ....	198
Figure 2: La mutation au niveau de la proline 227 abolie l'induction de l'expression du CD23. ....	199
Figure 3: La mutation au niveau de la proline 227 n'empêche pas la formation du CD40 homodimère. ....	200
Figure 4: L'activation du PI3-Kinase est nécessaire pour l'expression du CD23 induite par le CD40 et le TLR4. ....	201
<b>Discussion.</b>	
Figure 1: L'induction de la mort cellulaire par le CD40 nécessite la présence du TRAF6. ....	204
Figure 2: L'importance de la translocation du CD40 et de son homodimérisation dans la réponse biologique. ....	205

*Je dédie cette thèse à ceux qui m'ont dédié toute  
leur vie : mon père, Zouheir Jundi, et ma mère,  
Sana Hammoud Jundi*

## Remerciements

Ma reconnaissance va à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce projet ainsi qu'à l'écriture de cette thèse.

Tout particulièrement, je voudrais remercier et témoigner toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Dr. Walid Mourad, Ph.D., pour m'avoir donné ma chance de percer, d'avoir cru en moi et contribué à mon éveil scientifique. J'aurais toujours le privilège de dire que j'ai été dirigé par le Dr. Mourad et de le considérer comme un mentor.

De plus, je voudrais exprimer toute ma gratitude envers Amal Nadiri, Ph.D., pour sa contribution majeure à la rédaction de cette thèse. Je sais qu'un remerciement digne de Molière ne t'impressionnera pas, alors je vais me contenter d'un gros merci. De plus, je voudrais dire merci, aux membres passés et présents durant ma présence au laboratoire du Dr. Mourad pour avoir créé un esprit de complicité.

Finalement, en plus de remercier ma famille directe, mes parents (Zouheir et Sana), mes frères, ma sœur (Mazen, Maher et Maya) et mes amis, je voudrais également remercier ma deuxième famille du CHUM, campus Hôpital St-Luc, pour leur professionnalisme et pour m'avoir donné un milieu de travail de rêve.

Merci à tous,  
Malek Jundi

## **Chapitre 1. Introduction**

La coordination entre la réponse immunitaire innée et adaptative est primordiale pour une défense efficace et robuste contre toute infection de l'organisme. L'immunité innée est la première ligne de défense qui repose généralement sur une réponse rapide et moins spécifique. L'immunité adaptative est notre deuxième ligne de défense puisqu'elle nécessite la génération de cellules effectrices qui agissent spécifiquement contre les pathogènes. Cette spécificité peut être acquise d'une manière directe, l'immunité cellulaire qui requiert un contact entre les différentes cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B et T. Cette action spécifique peut être aussi induite d'une manière indirecte, la réponse humorale par la sécrétion d'anticorps. De plus, la réponse immunitaire adaptative joue un rôle important dans la formation de cellules mémoires ce qui aboutit à une réponse plus efficace et plus rapide lors d'une deuxième infection par le même pathogène. La régulation de la réponse immunitaire est cruciale pour le maintien de l'homéostasie nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme. Le CD40 et son ligand, le CD154, jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie. Comme nous allons le découvrir, le tandem CD40/CD154 joue aussi un rôle important dans nos deux lignes de défense, la réponse immunitaire innée et adaptative et toute dérégulation dans cette interaction aboutit au développement et/ou la progression de plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes.

### ***1.1. Le CD40***

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la famille de *tumor necrosis factor receptor* (TNFR). Lors de sa découverte en 1985, le CD40 fut premièrement associé à la surface des lymphocytes B et les cellules cancérogènes de la vessie [1]. Depuis, l'importance du CD40 ne fait qu'augmenter puisqu'il a été recensé à la surface de plusieurs cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques [2].

Le gène du CD40 humain est localisé sur le chromosome 20, l'*ARNm* est transcrit en une protéine de 277 aa [2]. Par ailleurs, ces 277 aa sont regroupés en trois parties : la partie extracellulaire (EC) de 193 aa, la partie transmembranaire (TM) de 22 aa et la partie intracellulaire (IC) (c-terminal) de 62 aa [2]. Le CD40 humain (hCD40) détient une homologie

de 62% avec le CD40 murin (mCD40) (**Figure 1**). Ainsi, on remarque la conservation complète des 22 cystéines de la région EC entre les deux espèces [2, 3]. Cette conservation des cystéines, une caractéristique propre des membres de la famille des TNFRs, suggère un repliement protéique semblable du CD40 chez les deux espèces [2]. De plus, le hCD40 possède deux sites putatifs de N-glycosylation au niveau des asparagines 153 et 180 [2, 3]; dont un site serait conservé chez la souris [3]. Par ailleurs, cette homologie entre les deux espèces augmente à 78% lorsqu'on compare la région IC du CD40 [2].

```

hCD40 : MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECL : 60
mCD40 : MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCH : 60

hCD40 : PCGESEELDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCV : 120
mCD40 : PCDSGEEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVTCTKEGQHCTSKDCEACA : 120

hCD40 : LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTN : 180
mCD40 : QHTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHPCPVGFFSNQSSLFEKCYPWTSCEDKNLEVLQKGTS : 180

hCD40 : KTDVVCGPQDRLRRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIIKKVAKKPTNKAPHP-----KQEPQEI : 236
mCD40 : QTNVICGLKSRMRRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKVVKKPKDNEILPPAARRQDPQEM : 240

hCD40 : NFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQ----- : 277
mCD40 : ---EDYPGHNTAAPVQETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV- : 289

```

**Figure 1: L'homologie entre le CD40 humain et le CD40 murin.**

Les aa sous-lignés dans l'alignement des séquences du CD40 humain (hCD40) et du CD40 murin (mCD40) représentent la séquence « leader » des deux peptides concernés. De plus, les aa surlignés en jaune représentent les résidus conservés entre les deux espèces. Les résidus à l'intérieure de la boîte se situent dans la région transmembranaire.

## ***1.2. L'expression du CD40 à la surface des cellules***

### **1.2.1. Expression du CD40 sur les cellules B**

Comme le CD40 a été découvert à la surface des lymphocytes B, ceci fait en sorte que le récepteur est intimement lié à ces cellules. De ce fait, il a été établi que le CD40 est exprimé durant tous les stades de développement des lymphocytes B [2]. Le groupe de Uckun, F. M. et

al., ont démontré que le CD40 apparaît sur les lymphocytes B humains après l'apparition du CD19 et CD10 mais avant l'expression du CD20, CD21, CD22, CD24 et l'immunoglobuline M membranaire (IgMm) [4]. Le même phénomène est observé chez la souris, puisque le mCD40 est faiblement exprimé à la surface des cellules pro-B ( $CD19^+/IgM^-/IgD^-/B220^{low}$ ) [5]. Le niveau d'expression du CD40 augmente durant la différenciation des lymphocytes B en passant du niveau intermédiaire chez les cellules B immatures ( $CD19^+/IgM^+/IgD^{lo}/B220^{lo}$ ) à un niveau élevé chez les cellules B matures ( $CD19^+/IgM^+/IgD^{hi}/B220^{hi}$ ) [6]. Cependant, le CD40 cessera d'être exprimé lorsque les lymphocytes B atteignent le stade des plasmocytes [2].

### **1.2.2. L'expression du CD40 sur différents types cellulaires.**

Après sa découverte comme un acteur majeur dans la prolifération des cellules B, le CD40 a été rapidement associé aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et aux cellules épithéliales [2, 7-10]. Maintenant, le CD40 est reconnu comme un récepteur dont l'expression est largement répandue dans l'organisme, qui peut être facilement exprimé aussi bien sur les cellules hématopoïétiques que non hématopoïétiques [2, 8]. De plus, le niveau d'expression du CD40 et son rôle dans ces cellules sont variables. Tout cela fait du CD40 un important régulateur de la réponse immunitaire (**Tableau I; Tableau II**).

**Tableau I: Le niveau d'expression du CD40 à la surface de différents types cellulaires.**

Type cellulaire	Expression du CD40	
	Cellules au repos	Cellules activées
Cellules B	+++	+++
Macrophages	+	+++
Plaquettes	++	+++
Cellules dendritiques	-	+++
Neutrophiles	+	+++
Cellules endothéliales	+	+++
Cellules Musculaires Lisses	+++	

Ce tableau est un bref sommaire du niveau d'expression du CD40 à la surface de différents types cellulaires. Le (-) représentent une absence d'expression, (+) représente une faible expression, (++) représentent une expression moyenne et le (+++) représente une forte expression. (inspiré de *Lievens, D. et al., 2009*).

**Tableau II: Le rôle du CD40 dans les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques.**

Différents types de cellules	L'effet de la stimulation via le CD40
Les Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Sécrétion de cytokines</li> <li>✓ Production de NO</li> <li>✓ Production de métalloprotéinase</li> <li>✓ Stimulation de l'activité pro-coagulante des monocytes</li> </ul>
Les cellules dendritiques / Cellules de Langerhans	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Croissance et survie</li> <li>✓ Expression de molécules co-stimulatrices</li> <li>✓ Amplification de la production de cytokines</li> </ul>
Les cellules endothéliales (ex: HUVEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Amplification de CD54, CD62E et CD106</li> <li>✓ Stimulation de l'activité pro-coagulante</li> <li>✓ Costimulation des cellules T</li> <li>✓ Amplification de la production de IL-6, GM-CSF</li> </ul>
Les cellules épithéliales du rein	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Sécrétion de cytokines et chimiokines: IL-6, GM-CSF, IL-8, MCP-1, RANTES</li> </ul>
Les Fibroblastes des poumons	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Amplification d'IL-6, IL-8 et NFkB</li> </ul>
Les Hépatocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Induction de l'expression de FASL</li> </ul>

Ce tableau est un bref sommaire de l'effet de l'induction du CD40 exprimé à la surface de quelques cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. (inspiré de *van Kooten & Banchereau, 2000*).

### **1.2.3. Les cellules présentatrices d'antigènes.**

Le CD40 joue un rôle prédominant dans l'activation et le développement des cellules dendritiques (CD) et des cellules B. Suite à une liaison avec son ligand, le CD40 induit une augmentation du niveau du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), de molécules co-stimulatrices telles que le B7.1 (CD80) et le B7.2 (CD86), de cytokines [2, 8], etc. Comme pour les cellules dendritiques, le CD40 joue aussi un rôle important dans l'activation et le développement des macrophages et des monocytes [2, 8]. Ultimement, l'induction du CD40 sur ces cellules leur confère un important rôle dans l'activation des lymphocytes T [2, 8].

### **1.2.4. Les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes.**

Généralement, l'expression du CD40 sur les cellules non hématopoïétiques est faible; mais, ce niveau d'expression peut augmenter suite à une stimulation [2] (**Tableau I**). Par ailleurs, cette activation du CD40 sur ces cellules leur confère un rôle pro-inflammatoire (**Tableau II**) [2, 8].

### **1.2.5. Les lymphocytes T.**

Normalement, les lymphocytes T n'expriment pas le CD40. Cependant, on a recensé une sous-population de cellules T CD4<sup>+</sup> chez des patients atteints de maladies auto-immunes, comme le diabète de type I (T1D) et de l'arthrite rhumatoïde [8, 11]. Cette sous-population de cellules T, Th40 (CD4<sup>lo</sup>/CD40<sup>+</sup>), est pathogénique [11, 12]. Ainsi, on retrouve le Th40 surreprésenter dans les modèles de souris auto-immuns et les patients T1D [12]. De plus, il a été démontré que ce CD40 présent sur ces lymphocytes T est fonctionnel, car il peut induire l'activation de NFκB et jouer un rôle dans les maladies auto-immunes [13-15].

## ***1.3. L'appartenance du CD40 à la famille des Tumor necrosis factor receptors***

Les récepteurs appartenant à la famille des *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR) sont principalement des protéines transmembranaires glycophosphorylées de type I, impliqués dans la mort cellulaire (apoptose), la prolifération ou la survie cellulaire. Par ailleurs, les TNFRs sont impliqués dans l'induction de protéines co-stimulatrices, dans la sécrétion de cytokines et l'amplification de l'expression des molécules d'adhésion durant la réponse immunitaire [16].

La particularité de la famille des TNFRs est l'homologie dans la région extracellulaire (25-30%) entre les récepteurs qui en sont membres [16-19]. Cette homologie réside dans la répétition du domaine riche en cystéine, *Cysteine-rich domain* (CRD), dans ce cas-ci les cystéines sont réparties dans deux modules distincts, A et B, qui peuvent créer un pont disulfure (A1, B1) ou deux ponts disulfures (A2, B2) [19]. Les différentes configurations générées par ces deux modules et sous-modules sont impliquées dans la spécificité de l'interaction entre les différents récepteurs et leurs ligands respectifs [19]. La diversification de la fonction des TNFRs est due à la variabilité qui se retrouve au niveau de leur région cytoplasmique. Par exemple, les récepteurs comme FAS, TRAIL et TNFR-1 possèdent un *Death Effector Domain* (DED) qui leur permet d'induire la mort cellulaire. Or, les récepteurs tels que CD40, OX40 et TNFR-2 requièrent la présence des *TNFRs-associated factors* (TRAFs) pour induire des réponses inflammatoires [16, 18]. Généralement, les ligands qui interagissent avec les TNFRs appartiennent à la famille des *Tumor necrosis factors* (TNF) (**Tableau III**) [20]. Les TNFs sont principalement des protéines transmembranaires de type II ou solubles [20, 21]. De plus, des membres des TNFRs, comme TNFR-1 et TNFR-2, peuvent interagir avec plus qu'un ligand [20, 21].

**Tableau III L'expression des ligands et des récepteurs membres de la superfamille des *tumor-necrosis factor***

Ligand	Cellules	Récepteur	Cellules
LT $\alpha$	Cellules NK, T et B	TNFR1	Most normal and transformed cells
		TNFR2	Cellules endothéliales et immunitaires
TNF	Macrophages, cellules NK, T et B	TNFR1, TNFR2	Cité ci-haut
LT $\beta$	DCs, macrophages, cellules NK, T et B	LT $\beta$ R	cellules NK, cellules T CD4+ et CD8+
CD95L	Splenocytes activées, thymocytes et tissus non-lymphoïdes (yeux, testicules)	CD95	La plus part des cellules normaux et transférées
TRAIL	Cellules NK, T et DCs	DR4, DR5, DCR1, DCR2, OPG	La plus part des cellules normaux et transférées
TWEAK	Monocytes	FN14	Cellules endothéliales et fibroblastes
CD27L	cellules NK, T et B	CD27	Cellules T CD4+ et CD8+
CD30L	Monocytes et cellules T	CD30	Cellules de Reed-Sternberg
4-IBBL	DCs, macrophages et cellules B	4-IBB	Cellules T activées, monocytes et cellules NK
OX40L	Cellules T et B	OX40	Cellules T
APRIL	Macrophages, cellules lymphoïdes et tumorales	BCMA	Cellules B, lymphocyte circulant, rate, thymus, foie, glandes surrénales et ganglions lymphatiques
		TACI	Cellules B, lymphocyte circulant, rate, thymus, petit intestin et cellules T activées
BAFF	Cellules T, DCs, monocytes et macrophages	TACI	Cité ci-haut
		BCMA	Cité ci-haut
		BAFFR	Cellules B, lymphocyte circulant, rate, ganglions lymphatiques, cellules T au repos
LIGHT	Cellules T, granulocytes, monocytes et DCs	HVEM	Cellules T
		LT $\beta$ R	Cellules non-lymphoïde hématopoïétique et cellules stromales
VEGI	Cellules endothéliales	DR3, DCR3	Cellules T activées
GITRL	N.D.	GITR	Cellules T CD4+CD25+
RANKL	Cellules T activées et ostéoblastes	RANK	Ostéoclastes, Ostéoblastes et cellules T activées
		OPG	Précurseurs d'ostéoclastes, cellules endothéliales
EDA1	Peau	EDAR	Dérivé ectodermique
EDA2	Peau	XEDAR	Dérivé ectodermique

Ce tableau représente un bref aperçu des ligands et des récepteurs appartenant à la superfamille des *tumor-necrosis factors*: *APRIL* (*a proliferation-inducing ligand*), *BAFF* (*B-cell-activating factor*), *BCMA* (*B-cell maturation factor antigen*), *DC* (*dendritic cells*), *DCR* (*decoy receptor*), *DR* (*death receptor*), *EDA* (*ectodermal dysplasin*), *EDAR* (*ectodysplasin-A-receptor*), *GITR* (*glucocorticoid-induced TNFR family receptor*), *L* (*ligand*), *LT* (*lymphotoxin*), N.D. (*non-déterminé*), *NK* (*natural killer*), *OPG* (*osteoprotegerin*), *PBL* (*peripheral-blood lymphocytes*), *R* (*receptor*), *RANK* (*receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B*), *TACI* (*transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor*), *TNF* (*tumor-necrosis factor*), *TRAIL* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), *TWEAK* (*TNF-like weak inducer of apoptosis*) *VEGI* (*vascular endothelial cell-growth inhibitor*) et *XEDAR* (*X-linked ectodermal dysplasia receptor*). (inspiré de Aggarwal, B.B., 2003)

#### **1.4. La régulation du CD40.**

Généralement, le CD40 est constitutivement exprimé à la surface des cellules [8]. Cependant, son niveau d'expression peut être amplifié à l'aide de stimuli comme les cytokines telles que l'Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), les interleukines (IL-1, -2 et -4) et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) [8]. Une grande variété de stimuli peut influencer l'expression du CD40 comme le *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), les esters de phorbol, le tétradécanoylphorbol acétate (TPA) ou le phorbol myristate acétate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), les anticorps contre l'IgM ou le CD20 [8, 22]. Par ailleurs, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (suite à une infection des cellules par le VIH-1 [23]), l'*Epstein-Barr virus latent membrane protein* (LMP-1) et le *Mycobacterium tuberculosis bacilli* stimulent aussi l'expression du CD40 [8].

La régulation du CD40 se fait au niveau de l'épissage. En effet, il a été démontré par Tone, M. et al., que le gène du CD40, composé de 9 exons, peut générer cinq isoformes du CD40 murin et quatre isoformes du CD40 humain par le biais de l'épissage alternatif dans la région comprenant les exons 5 à 9 [22]. Les deux isoformes majeurs du CD40 sont l'isoforme I et l'isoforme II. Par ailleurs, Tone, M. et al., suggèrent que l'isoforme I est l'isoforme fonctionnel; tandis que l'isoforme II agirait comme un inhibiteur en accélérant la dégradation de l'isoforme I. En effet, selon leur séquençage de l'isoforme II, ce dernier ne possède pas de partie transmembranaire ni de partie intracellulaire. De plus, la partie extracellulaire de l'isoforme II possède 19 cytéines et diffère de 38 aa en comparaison avec l'isoforme I dans le quatrième CRD [22]. Par ailleurs, ce groupe a aussi démontré qu'il y a un délai entre l'expression de l'ARNm de l'isoforme I, qui est produit en premier, et de l'isoforme II [22].

En plus de la régulation post-transcriptionnelle, le CD40 subit une régulation post-traductionnelle. En effet, Haxhinasto S. et al., ont suggéré que la phosphorylation de la thréonine 234 dans la région intracellulaire du CD40 était nécessaire pour la synergie entre le CD40 et le récepteur de cellules B (BCR) [24]. Par ailleurs, le CD40 peut aussi être modifié par glycosylation [25]. Il a été suggéré que le CD40 possède deux sites de N-glycosylation qui sont les asparagines dans la partie EC (Asn 153 et 180) [2, 26]. Cependant, ces sites restent hypothétiques car un autre groupe a démontré que le CD40 comportait des sites de N-

glycosylation et de O-glycosylation [15]. Par conséquent, il pourrait y avoir d'autres sites de glycosylation impliquant une sérine ou une thréonine (O-glycosylation). Finalement, le CD40 peut aussi être sécrété puisqu'il a été retrouvé sous une forme soluble dans le surnageant de cellules B activées *in vitro* [27]. La présence du CD40 soluble peut être l'effet d'un clivage par une enzyme appartenant à la famille des métalloprotéinases (MP) ADAM, la *recombinant MP disintegrin tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* (TACE) [28]. De plus, ce CD40 soluble serait un antagoniste naturel de l'interaction du CD40 membranaire avec son ligand le CD154 [28]. En somme, le CD40 est hautement régulé aussi bien au niveau de la post-transcription et aussi au niveau de la post-traduction.

## ***1.5. Les différents ligands du CD40.***

### **1.5.1. Le CD40L (CD154)**

Le CD154 est une glycoprotéine de type II et le principal ligand du CD40 [29]. Cloné en 1992, le CD154 est une protéine de 261 aa formée de trois parties : l'EC (215 aa), le TM (22 aa) et l'IC (22 aa) [2]. Il y a une forte homologie (78%) entre le CD154 humain et murin [2], ce qui fait en sorte que le murin CD154 est capable d'interagir avec le CD40 provenant des deux espèces (humain et murin) [30]. On retrouve le CD154 sous forme membranaire, avec un poids moléculaire de 33 kDa, ou sous sa forme soluble, avec un poids moléculaire de 31 et/ou 18 kDa [2]. Les deux formes du CD154 sont représentées sous la forme d'un trimère. De plus, le CD154 soluble (CD154s) ou membranaire peuvent interagir avec le CD40 et induire une réponse biologique [2]. La régulation de la forme soluble et de la forme membranaire peut être indépendante puisqu'il a été suggéré que le CD154s est formé suite à un clivage protéolytique dans le cytoplasme des cellules [31-34]. Le CD154 appartient à la famille des TNFs avec lesquels il possède 20% d'homologie dans la région extracellulaire [17]. Hormis cette faible homologie, la structure tridimensionnelle du CD154 est semblable à d'autres membres de la famille des TNFs, comme le TNF- $\alpha$  et le lymphotoxine-alpha (LT- $\alpha$ ) [2]. L'interaction CD40/CD154 a été examinée suite à une étude par mutagenèse. Cette étude démontre que les résidus acides D84, E114 et E117 au niveau du CD40 sont requis pour son association avec les résidus basiques K143, R203, et R207 du CD154 [2, 8], cette interaction a été confirmée par

cristallographie [35]. Cependant, un meilleur modèle cristallographique est nécessaire pour mieux définir cette interaction, puisque le modèle de cette étude est basé sur l'association du CD154 avec la partie extracellulaire du CD40 uniquement. Fait intéressant, le CD40 n'est pas l'unique récepteur du CD154. En effet, il a été démontré que le CD154 peut aussi se lier aux intégrines, comme le  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 [36], le Mac-1 [37] et le  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 [38], pouvant ainsi induire des réponses biologiques telles que l'adhésion cellulaire et la production d'IL-8.

L'expression du CD154 est similaire au CD40 puisqu'elle est largement répandue dans l'organisme (**Tableau IV**). On retrouve le CD154 sur les cellules hématopoïétiques (basophiles, éosinophiles, cellules tueuses naturelles, macrophages, cellules dendritiques) et non hématopoïétiques (cellules épithéliales et endothéliales) [8]. Normalement, on retrouve le CD154 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> activées et sur une petite population de CD8<sup>+</sup> cependant, il n'est pas exprimé sur les cellules T au repos [2].

**Tableau IV: Le niveau d'expression du CD40L à la surface de différents types cellulaires.**

Type cellulaire	Expression du CD40L		Forme du CD40L
	Cellules au repos	Cellules activées	
Cellules T CD4+	-	+++	Membranaire, Soluble
Macrophages	+	+++	Membranaire
Plaquettes	-	+++	Membranaire, Soluble
Cellules dendritiques	+	+	Membranaire
Neutrophiles	+	+	Membranaire
Cellules endothéliales	+	+	Membranaire
Cellules Musculaires Lisses	+		Membranaire

Ce tableau est un bref sommaire du niveau d'expression du CD40L à la surface de différents types cellulaires. Le (-) représentent une absence d'expression, (+) représente une faible expression, (++) représentent une expression moyenne et le (+++) représente une forte expression. (inspiré de *Lievens, D. et al., 2009*).

### 1.5.2. Le C4b Binding Protein (C4BP)

Le *C4b binding protein* (C4BP) est produit principalement par les hépatocytes, il peut être aussi synthétisé par les monocytes activés [39]. Le C4BP existe sous forme soluble ou membranaire [39] et son rôle principal est de s'associer au récepteur du complément 4b (C4b) afin d'induire sa dégradation [40]. Par conséquent, le C4BP inhibe l'enzyme C3 convertase qui se retrouve dans les voies de signalisation nécessaire pour l'activation des compléments [39]. Par ailleurs, la structure du C4BP est définie comme un héptamère lié par des ponts bisulfures [41]. Outre le C4b, C4BP s'associe aussi avec les protéines S et les héparines bactériennes [39]. En 2003, Brodeur, S. et al. ont suggéré que la chaîne alpha du C4BP s'associerait au CD40 sur un site de liaison différent que celui du CD154 [42]. Par ailleurs, le C4BP aurait été localisé dans le centre germinatif (GC) des amygdales humaines et s'associerait aux lymphocytes B normaux, via le CD40 [42]. L'interaction C4BP/CD40 aurait pour effet l'amplification de l'expression du CD54, du CD86 et l'induction de la commutation

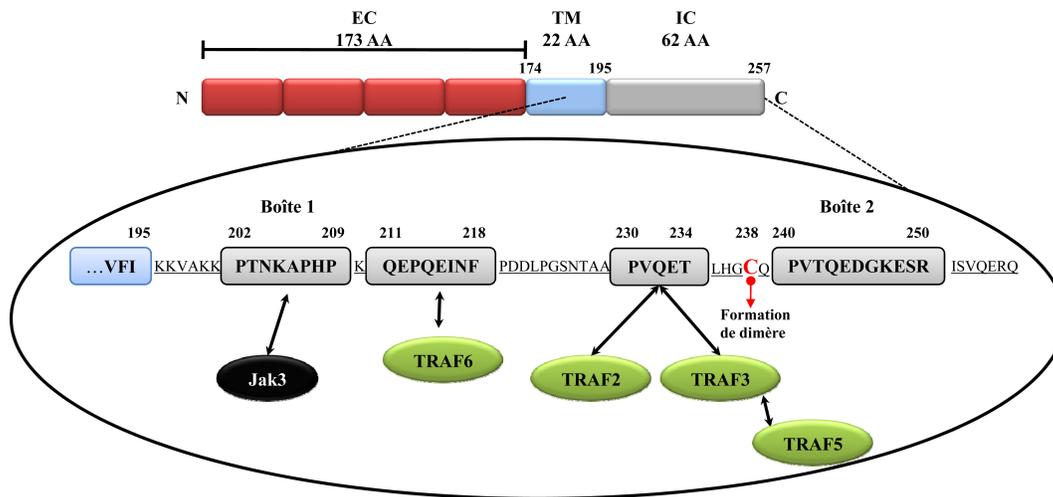
de classe des Ig [42]. Or, une étude parue en 2007 suggère que l'association C4BP/CD40 serait indirecte puisque le C4BP formerait un complexe avec le CD154s pour ensuite interagir avec le CD40 [39]. Ainsi, le complexe C4BP-CD154s/CD40 bloquerait l'induction de l'apoptose via le CD40 dans les cholangiocytes, cellules épithéliales de la voie biliaire [39]. D'autres études seront requises pour pouvoir déterminer le niveau d'association du CD40 avec le C4BP.

### **1.5.3. Le Heat shock protein 70 (HSP70)**

Les HSP70 sont des chaperons moléculaires qui ont été très bien conservés à travers l'évolution [43]. Les chaperons moléculaires jouent un rôle important dans la synthèse, la translocation et le repliement des protéines [43]. Les HSP ont aussi un rôle dans l'immunité innée et adaptative. En effet, ils promeuvent la migration, le développement des CPA ainsi que l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T [44]. De plus, les HSP70 ont la capacité de se lier au *Toll like receptor 4* et 2 (TLR-2, -4) [44]. Il y a aussi beaucoup d'études qui définissent le HSP70 microbien (mbHSP70) comme ligand du CD40. Wang, Y. et al., ont démontré que le mbHSP70 s'associe au CD40 pour induire la sécrétion de chimiokines [43]. On a aussi démontré que l'engagement du CD40 par le mbHSP70 augmente le niveau de l'ARNm du *Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like-3G* (APOBEC3G), un facteur antiviral qui change la cytidine rétrovirale en une uridine [45]. De plus, Nolan, A. et al., ont démontré, à l'aide de deux modèles de souris *knock out* (KO) pour le CD40 (CD40<sup>-/-</sup>) et pour le CD154 (CD154<sup>-/-</sup>), que le HSP70 de l'*E. Coli* induisait l'activation du CD40 lors d'une septicémie polymicrobienne [46].

### **1.6. La signalisation intracellulaire.**

La signalisation induite par le CD40 requiert la présence des protéines adaptatrices puisque le récepteur ne possède pas de domaine kinase [2]. Les membres de la famille des *TNFR-associated factors* (TRAFs) sont les principales protéines adaptatrices impliquées dans l'induction du signal via le CD40 (Figure 1-2). Cependant, le signal peut être transmis via le CD40 d'une manière TRAF indépendante (**Figure 2**) [2].



**Figure 2: L'interaction entre le CD40 et les protéines adaptatrices.**

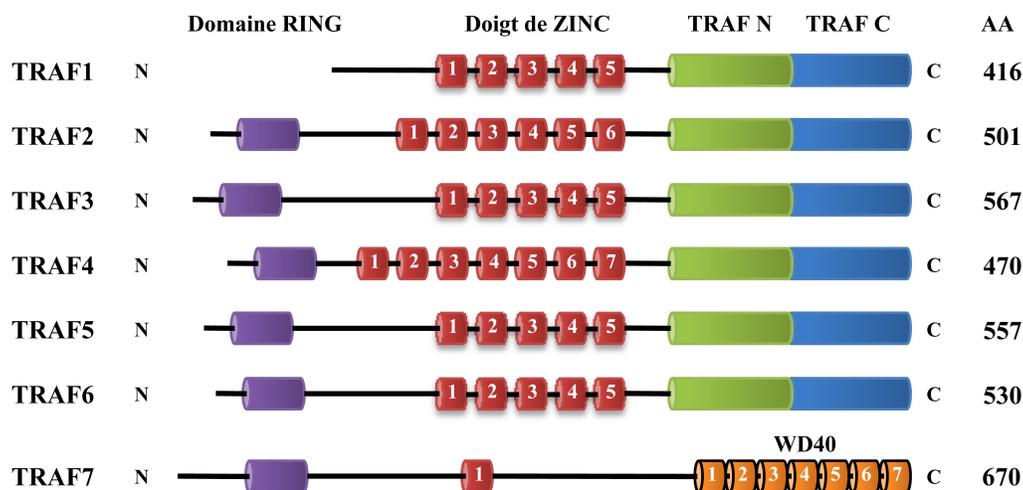
Les protéines adaptatrices qui interagissent avec le CD40 se lient dans des régions spécifiques situées dans la queue cytoplasmique du CD40. Nous pouvons observer que le TRAF5 se lie de manière indirecte au CD40. Par ailleurs, il y a aussi la présence d'une cystéine qui est nécessaire à la dimérisation du CD40. (inspiré de *van Kooten & Banchereau, 2000*).

## 1.6.1. Les protéines adaptatrices

### 1.6.1.1. Les TNFR-associated factors (TRAFs)

Les TRAFs sont des protéines adaptatrices qui s'associent avec les TNFRs pour induire l'activation de différentes cellules. On dénombre six membres de cette famille (TRAF1, 2, 3, 4, 5, 6) qui possèdent une structure similaire (**Figure 3**). Ainsi, les TRAFs sont constitués d'un domaine C-terminal qui s'associe aux récepteurs et un domaine N-terminal qui permet la formation d'homo- et d'hétéro-trimère [47]. Cependant, il a été recensé par Aggarwal B. B., que la région C-terminal des TRAFs était suffisante pour accomplir ces deux rôles [21]. Les TRAFs sont aussi caractérisés par un domaine *zing finger* qui est variable d'un membre à un autre. Ce domaine est responsable de l'association entre les TRAFs et les protéines kinases et

les divers facteurs de transcriptions [47]. Finalement, les TRAFs sont aussi constitués du domaine *Really Interesting New Gene Domain* (RING) riche en cystéines qui est important pour l'activation des voies de signalisation [48-50]. Récemment, une nouvelle protéine ayant une structure similaire aux TRAFs a été dénommée TRAF7 (**Figure 3**). Le TRAF7 est composé d'un domaine RING et un domaine *zing finger* [51-53]. Le TRAF7 se distingue des autres TRAFs par la présence de sept répétitions du motif hautement conservé, le WD40, qui est composé de tryptophane (W) et d'acide aspartique (D) [52, 54]. Le TRAF7 s'associerait avec MEKK3 (*MAP/ERK kinase kinase 3*) par le biais des répétitions WD40 [52]. L'étude sur le TRAF7 a démontré que ce dernier induirait spécifiquement MEKK3 pour mener à l'activation d'AP-1 et de CHOP (*C/EBP-homologous protein*) [51]. L'activité des TRAFs dépend du type cellulaire dans lequel ils sont exprimés. De plus, la redondance dans l'activité des différents TRAFs font en sorte qu'on ne peut pas associer spécifiquement une voie de signalisation à un seul TRAF [47]. L'affinité du CD40 envers les TRAFs est variable. Ainsi, le TRAF2 aurait la plus grande affinité pour le CD40, suivit par le TRAF3 [55, 56]. Les TRAF1 et 5 auraient une faible affinité pour le CD40 [55, 56]. Finalement, le TRAF6 aurait la plus faible affinité pour le CD40 [55, 56]. Cette présente section s'attardera sur les TRAF1, 2, 3, 5, 6 reconnus pour leur association directe et/ou indirecte avec le CD40 [2].



**Figure 3: La structure des membres de la famille des TRAFs.**

Les membres de la famille des TRAFs ont tous des structures similaires composées de quatre régions : un domaine TRAF N-terminal et C-terminal, un domaine « Zing finger » et un domaine RING. Les domaines TRAF N-terminal et C-terminal sont nécessaires pour l'interaction avec diverses protéines tandis que le domaine RING est important dans l'activation des voies de signalisations. Le TRAF7 possède uniquement deux régions caractérisant la famille des TRAFs puisque sa région C-terminale est composée de sept répétitions du domaine WD40.

#### 1.6.1.1.1. TRAF1 :

L'association du TRAF1 avec le CD40 est ambiguë. Il a été suggéré que le TRAF1 s'associait avec le CD40 via le TRAF2 [2]. Or, le groupe de Bishop a démontré que, dans l'absence de TRAF2, une petite quantité de TRAF1 pouvait s'associer directement au CD40 [57]. De plus, le site de liaison du TRAF1 sur le CD40 est le même que le TRAF2 [57]. Ceci permet de déduire qu'il y aurait une certaine coopération ou une certaine compétition entre les deux TRAFs. Il a été démontré que le TRAF1 prolongerait la localisation du TRAF2 au niveau de la membrane; ce qui a pour effet de renforcer la signalisation induite par le TRAF2 dans les cellules dendritiques [58]. Par ailleurs, Xie, P. et al., ont démontré que cet effet positif du TRAF1 est aussi observé dans les cellules B puisqu'il permet de bloquer la dégradation du TRAF2 [57].

#### **1.6.1.1.2. TRAF2 :**

Le TRAF2 est la protéine qui a le plus d'affinité avec le CD40 [55]. Cette association se fait au niveau du motif PXQXT situé sur le CD40 [58]. La signalisation induite via le TRAF2 est extrêmement complexe puisqu'il joue un rôle central dans plusieurs voies de signalisation. Cette complexité vient du fait que le TRAF2 n'a pas de domaine kinase et doit s'associer lui aussi avec des protéines adaptatrices (le *germinal centre kinases* (GCK), le *NF- $\kappa$ B inducing kinase* (NIK), PNK1, le *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), *sphingosine kinase* et le *receptor interacting protein* (RIP)) [58]. Le TRAF2 peut aussi induire la dégradation de protéine, par ubiquitination, puisqu'il est aussi une *E3 ubiquitin ligase* [58]. Normalement, le TRAF2 est associé à la prolifération des cellules B, la synergie entre les récepteurs de cellules B (BCR) et le CD40 ainsi que la dégradation du TRAF3, qui agit principalement comme un inhibiteur du TRAF2 [58]. Puisque le premier signal provient du TRAF2, il a été noté que la dégradation rapide du TRAF2 permet l'association du CD40 au TRAF6 [58].

#### **1.6.1.1.3. TRAF3 :**

Le TRAF3 est généralement défini comme le TRAF inhibiteur. Le TRAF3 s'associe aussi au niveau du motif PXQXT du CD40. La mutation de la thréonine de ce motif a longtemps été utilisé pour bloquer la formation de complexe CD40, TRAF2 et TRAF3 [58, 59]. Cependant, il a été démontré que le TRAF3 avait un autre site de liaison distinct du motif PXQXT. En effet, Hauer, J. et al. ont observé deux sites ayant un motif QE situé dans la région distale de la partie cytoplasmique du CD40 qui seraient impliqués dans l'association du TRAF3 au récepteur [60]. Il a été démontré que le complexe TRAF2-TRAF3 est requis pour l'internalisation du CD40 [61]. Il a été documenté que le TRAF3 bloque la synergie entre le BCR et le CD40 qui est induite par le TRAF2. Cependant, on a observé que le TRAF3 pouvait avoir un rôle positif dans la signalisation puisqu'il est nécessaire dans la signalisation induite par le *latent membrane protein 1* (LMP1), exprimé suite à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) [58]. Par ailleurs, le TRAF3 est requis pour la synergie entre le LMP1 et le CD40 [58]. Par ailleurs, il a aussi été démontré que le TRAF3 serait requis pour la production de ROS [62]. Comme les autres membres des TRAFs, le TRAF3 procure des réponses variables suite à son activation.

#### **1.6.1.1.4. TRAF5 :**

Le TRAF5 est le moins étudié. Il a été démontré que l'association du TRAF5 avec le CD40 serait indirecte et passerait par le TRAF3 [58]. En plus, l'activation de TRAF2 et de TRAF5 suite à une association au CD40 pourrait activer le NFκB [60]. Une seule étude a aussi observé que le TRAF5 jouerait un rôle dans l'activation des cellules B induite par le CD40 [63].

#### **1.6.1.1.5. TRAF6 :**

Le niveau d'expression du TRAF6 est généralement bas dans les cellules B puis il augmente suite à une stimulation par le CD40 [58]. Le motif QXPXEX dans la région proximale du CD40 est nécessaire pour la liaison avec le TRAF6 [58]. Cependant, il a été démontré que la signalisation induite via le TRAF6 a été rétablie suite à la transfection d'un mutant du TRAF6 dépourvu de son site de liaison avec le CD40 dans des cellules déficientes en TRAF6<sup>-/-</sup> [64]. Cette étude suggérerait que le TRAF6 serait capable de se lier indirectement au CD40. En effet, Davies, C. et al., ont démontré que le TRAF6, outre son association directe, pourrait se lier au CD40 via le TRAF2 dans les cellules non hématopoïétiques [65]. Outre similitude avec le TRAF2, il a aussi été répertorié que le TRAF6 serait une *E3 ubiquitin ligase* [58]. Par contre, il a été démontré que le TRAF6 n'était pas dégradé suivant une activation via le CD40 [66]. Au niveau du recrutement, le TRAF6 est un des TRAFs qui a le moins d'affinité avec le CD40 [55, 58]. Un des rôles majeurs du TRAF6 dans les cellules B suite à une activation via le CD40 serait la production d'IL-6 [64]. Il aussi été démontré que le TRAF6 serait requis pour la génération de plasmocytes [66]. Finalement, le rôle majeur que le TRAF6 joue dans la signalisation induite via le CD40 ainsi que celle induite via le TLR-4 montre son rôle dans la régulation de l'immunité innée et adaptative [58, 67].

#### **1.6.1.2. Janus tyrosine kinases (JAKs)**

À l'instar des TRAFs, le CD40 est aussi capable de se lier au *janus tyrosine kinase* (JAK) [2]. La famille des JAKs est composée de quatre membres JAK1, 2, 3 et TYK2. La structure des JAKs est composée de sept *JAK homology region* (JH1 à JH7) [68]. Le JH1 est composé du

domaine kinase actif, JH2 régule l'activité kinase du JAK et les JH3-4 sont composé de *SH-2-like domaine*. Finalement, les domaines JH 6-7 englobent le domain *4.1, ezrin, radixin, moesin* (FERM) qui est nécessaire pour la liaison du JAK avec un récepteur. La régulation négative ou positive des JAKs se fait par leur phosphorylation [68]. Par ailleurs, l'expression des JAK1, 2 et TYK2 est ubiquitaire dans l'organisme, tandis que JAK3 est principalement exprimé dans les cellules hématopoïétiques [68]. De plus, les JAKs jouent un rôle important dans l'immunité innée et adaptative. Ainsi, les JAKs sont nécessaires pour la survie, la prolifération, le développement et la différenciation des cellules [68]. Pour ce faire, les JAKs, suite à une activation par le CD40, induisent la phosphorylation des *signal transducer and activator of transcription* (STATs) que nous allons discuté ci-dessous [68]. L'association des JAKs au CD40 représente un débat, car une seule étude a démontré la liaison du JAK3 à la proline (P227) qui serait dans la boîte 1 du CD40 [2, 69].

## **1.6.2. La signalisation dépendante des TRAFs**

### **1.6.2.1. L'activation des protein tyrosine kinases (PTK)**

Une étude de Faris, M. et al., sur l'engagement du CD40 dans les cellules B provenant de lymphome de Burkitt ou ayant été transformées avec l'EBV ont démontré une phosphorylation des PTKs comme le Syk, le Btk et le Fyn [70]. Il a été démontré qu'une synergie entre les src kinases et les phospholipases est requise pour l'activation du Ras [71]. De plus, l'activation du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) suite à l'engagement du CD40 mène à l'activation de l'AKT qui induit généralement un signal de survie [29]. Finalement, il a été démontré que l'activation de l'AKT requiert la présence du TRAF2 ou du TRAF6 [58, 72]. La relation entre le CD40, le TRAF2 et le TRAF6 qui régit l'activation de l'AKT dépend du type cellulaire [58].

### **1.6.2.2. L'activation des protéines sérine/thréonine kinases**

L'engagement du CD40 induit la phosphorylation des différentes MAPKs telles que le *stress-activated protein kinase/c-jun amino-terminal kinase* (SAPK/JNK), le p38 MAPK et l'*extracellular signal regulated mitogen activated protein kinase* (ERK). L'activation du ERK

par le CD40 requiert la présence de TRAF2 et/ou TRAF6 [58]. Gulbins, E. et al., ont noté que le CD40 est capable de phosphoryler ERK1 et ERK2 dans les WEHI-231 (cellules B de souris) [71]. Par ailleurs, il a été rapporté que l'activation d'ERK2 est généralement plus élevée qu'ERK1 [29]. L'activation de JNK requiert la présence de TRAF2 et elle est généralement bloquée par le TRAF3 [58]. Or, il a été récemment démontré qu'une hausse du recrutement du TRAF3 par le CD40 pouvait induire une signalisation positive. Ainsi, un polymorphisme du CD40 (CD40-P227A), découvert dans la population sud-américaine et mexicaine, serait capable d'augmenter le recrutement du TRAF3 à la région cytoplasmique du CD40 [73]. Ainsi, dans ce cas de figure, le TRAF3 serait capable d'induire la phosphorylation de JNK [74]. De plus, dans les cellules épithéliales, l'association du TRAF3 au CD40 pourrait induire l'activation du NFκB [75]. En somme, le rôle du TRAF2, 3 et 6 peut varier selon le type cellulaire. Ultiment, ces voies de signalisation sont requises pour l'induction des facteurs de transcription (**Figure 4**).

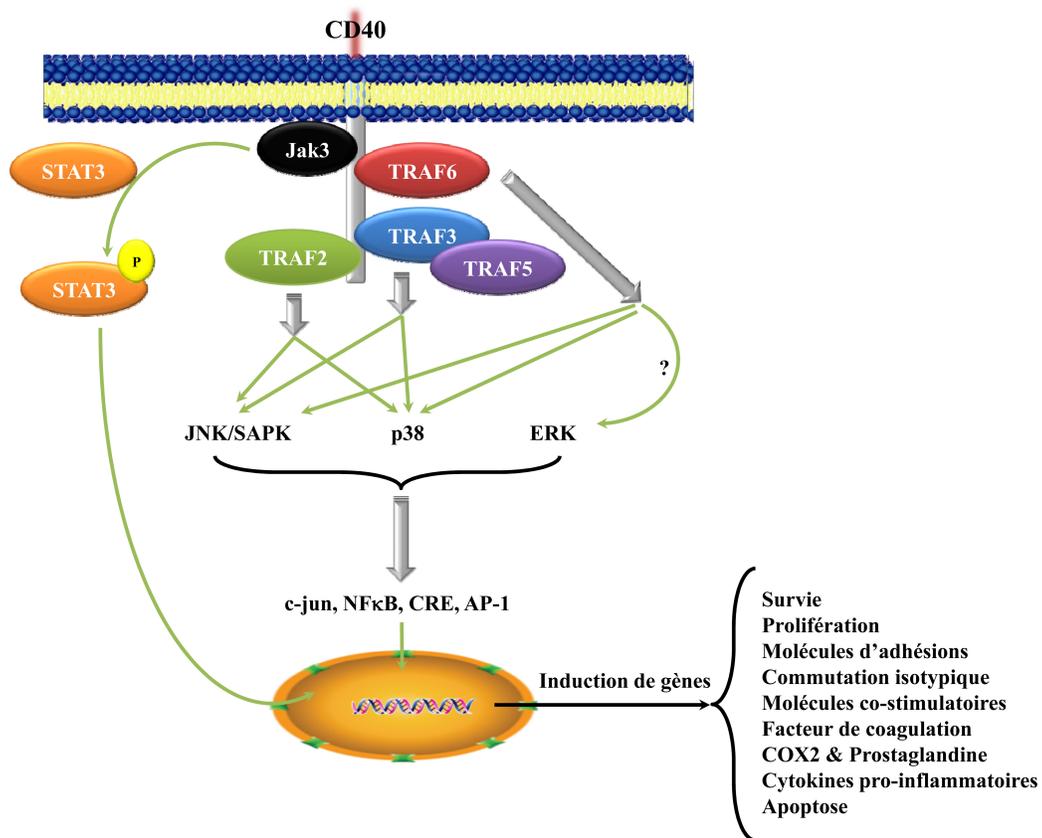
### **1.6.2.3. L'activation des facteurs de transcriptions**

Comme pour l'activation des TRAFs, la régulation de l'induction des trois principaux facteurs de transcriptions (NFκB, *cAMP response element* (CRE) et AP-1) par le CD40 varie en fonction du type cellulaire [75]. Il a été démontré que le CD40 pouvait réguler l'induction des deux types de NFκB soit le NFκB1 (la voie classique, *canonical*) ou le NFκB2 (la voie alternative, *non-canonical*). Ainsi, Il a été démontré que le TRAF1 pouvait coopérer avec le TRAF2 pour activer le NFκB (1 et 2) [57]. Or, une autre étude a aussi démontré que la balance entre le TRAF1 et le TRAF2 peut jouer un rôle, si on retrouve plus de TRAF1 que de TRAF2, ceci a pour effet d'inhiber l'activation du NFκB [76]. Par ailleurs, le TRAF6 est suffisant pour induire la dégradation du *inhibitor of κBα* (IκBα) ce qui a pour effet de libérer l'hétérodimer p50/p65(RelA) (NFκB1) [58]. Il a aussi été démontré que l'association du TRAF2 au CD40 pouvait induire l'activation du NFκB2 (p52/RelB) [75]. En effet, lors de l'engagement du CD40, le TRAF2 induit la dégradation de TRAF3 par les membres de la famille du *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP 1/2)[75]. Cette dégradation permet la libération de la protéine *NFκB-inducing kinase* (NIK) qui induit la transformation, par phosphorylation et protéolyse,

du précurseur du NFκB2 (p100/RelB) en NFκB2 actif (p52/RelB) [75]. Outre le TRAF2, on a aussi observé que le TRAF5 pouvait être impliqué dans l'activation du NFκB1 et 2 [58, 60].

### **1.6.3. La signalisation indépendante des TRAFs.**

Malgré le fait que les TRAFs jouent un rôle prédominant dans l'induction de la signalisation, il a été démontré que le CD40 pouvait induire une signalisation qui serait indépendante des TRAFs. Par exemple, l'engagement du CD40 sur les cellules B induirait aussi la phosphorylation de la phospholipase C $\gamma$ 2 [58, 71, 77]. Ceci mène à la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). Ainsi, cette production d'IP3 augmente le niveau du calcium intracellulaire qui en retour active les isoformes des PKCs dépendantes du calcium. La voie de signalisation impliquant les JAKs et les membres de la famille du *signal transducer and activator of transcription* (STATs) représente la signalisation induite par le CD40 qui ne requiert pas la présence des TRAFs (**Figure 4**) [58]. On énumère six membres de la famille des STATs (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6) qui peuvent se lier directement à l'ADN sur des sites spécifiques ou activer des facteurs de transcription [78]. Schönbeck et al., montrent l'activation de STAT6 par le CD40 [8]. De plus, Choudhury, J. et al., suggèrent que le CD40 interagit avec le JAK2 pour induire l'activation de STAT3 dans les cholangiocytes [79]. Par ailleurs, la liaison du CD40 au JAK3 semble jouer un rôle dans la maturation des cellules dendritiques via le STAT5 [75]. Finalement, l'association du CD40 au JAK3 semble induire l'expression du CD23, ICAM-1 et la lymphotoxine-alpha (LT- $\alpha$ ) dans les cellules B par le biais du STAT3 [69].



**Figure 4: La signalisation induite par le CD40.**

En se liant avec son ligand, le CD40 induit, suite au recrutement des TRAFs et Jak3, l'activation de plusieurs protéines kinases qui activent divers facteurs de transcriptions afin de mener à terme l'activité cellulaire.

### ***1.7.L'impact de l'oligomérisation du CD40***

L'agrégation des récepteurs est importante pour la régulation de la signalisation induite dans les cellules. Ainsi, cette agrégation peut servir pour l'amplification du signal par un récepteur. Plusieurs récepteurs utilisent ce stratagème comme les membres de la famille des TNFRs (FAS), les récepteurs des cellules B (BCR), les récepteurs des cellules T (TCR), les récepteurs EGF et les récepteurs de l'insuline, etc.

## 1.7.1. L'agrégation homotypique du CD40 :

### 1.7.1.1. Le preligand assembly domain (PLAD)

Puisque les membres de la famille du TNFRs s'associent avec des ligands qui sont sous forme trimérique, il a été longtemps sous-entendu que les TNFRs sont monomériques à la surface et devenaient trimériques suite à l'engagement de leurs ligands [80]. Normalement, le CRD2 et le CRD3 dans la région extracellulaire des TNFRs sont nécessaires pour leur liaison avec le ligand. Or, cette théorie a été remise en question avec la découverte de récepteur de FAS muté chez des patients souffrants du syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS). Les récepteurs FAS provenant de ces patients avaient une forme mutée dont une mutation dans la région CRD2 et CRD3, empêchant la liaison du FAS ligand (FASL) [81]. Malgré cette mutation dans les régions CRD2 et CRD3, le domaine CRD1 de ces FAS était intact [81]. Ainsi, il a été observé que ce FAS muté pouvait s'associer avec d'autres FAS non mutés par le biais d'une région du CRD1 dénommée *preligand assembly domain* (PLAD) ce qui bloque l'induction de la mort via le FASL [81]. Le préassemblage des récepteurs peut être bénéfique puisqu'il y aurait plus d'affinité entre le ligand et les récepteurs préassemblés via le PLAD [82]. Plusieurs membres des TNFRs, comme le FAS, peuvent être préassemblés via le PLAD sous une forme dimérique ou trimérique. La liaison du ligand sous forme trimérique stabilise le récepteur sous sa forme trimérique aussi [82]. Une étude cristallographique du TNFR1 a suggéré que le TNFR1 serait préassemblé sous forme dimérique [82]. Ainsi, un modèle d'agrégat ligand-récepteur (dimérique), où un ligand trimère se lie à deux récepteurs dimériques, a été proposé pour préserver la symétrie trimérique nécessaire pour induire le signal intracellulaire [80]. Par ailleurs, Chan, F. et al., ont observé que le CD40 pouvait être préassemblé via le PLAD. Cependant, aucune étude concluante n'a permis de déterminer si ce préassemblage est sous forme dimérique ou trimérique [16].

Le PLAD pourrait agir comme régulateur. Par exemple, les cellules T naïves CD4<sup>+</sup> sont normalement résistantes au FASL puisque le FAS est sous forme monomérique à l'extérieur des radeaux lipidiques. Cependant, lors d'une restimulation via le TCR, les cellules T CD4<sup>+</sup> activées deviennent plus sensibles à la mort cellulaire via le FAS puisque le FAS a été

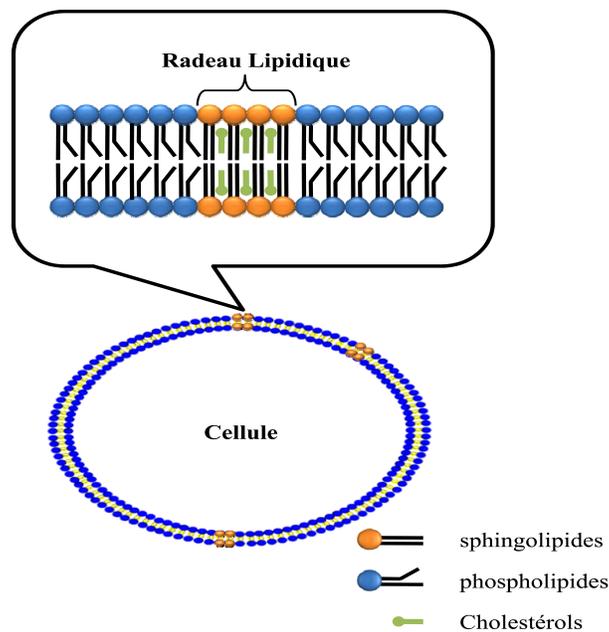
transféré dans les radeaux lipidiques où il est préassemblé sous forme trimérique et prêt à induire l'apoptose via le FASL [82].

#### **1.7.1.2. Les radeaux lipidiques**

Les radeaux lipidiques jouent un important rôle dans l'induction de signal. Les radeaux lipidiques (RLs) ou microdomaines riches en lipides ont été initialement observés en 1977. Ces microdomaines dynamiques sont caractérisés par la présence de cholestérols et de sphingolipides et leur taille varie de 50 nm à 200 nm (**Figure 5**) [83]. Il a été noté que les RLs constituent 45% des fibroblastes et 30% des lymphocytes [83]. Il existe deux modèles d'organisation de ces RLs. Le premier modèle consiste en une petite structure enrichie de cholestérols associés au céramide des sphingolipides dans lequel on y retrouve des protéines associées [83]. Le deuxième modèle se base sur l'interaction protéine-lipide et protéine-protéine. Ce qui suggère que les RLs sont formés à la suite d'une interaction entre des protéines « enrobées » de lipides [83]. Ainsi, l'oligomérisation des récepteurs crée des RLs larges et stables. Les RLs peuvent se retrouver à la membrane cytoplasmique comme ils peuvent se retrouver à l'intérieur de la cellule [83]. Par ailleurs, on a recensé plusieurs types de plateformes signalétiques dans les RLs [83]. Ainsi ces plateformes ont pour rôle d'amorcer la cascade signalétique, de faciliter l'activation et/ou d'amplifier la transduction du signal. De plus, les RLs peuvent aussi protéger le signal induit par certains récepteurs en les isolant des protéines inhibitrices comme les phosphatases qui ne peuvent pas migrer dans les RLs [84]. Il y a un large spectre de récepteurs reconnus pour leur association avec les RLs comme le BCR, le TCR/CD3, le FAS, le CD2, les intégrines, etc [83].

Comme tout autre récepteur, l'oligomérisation du CD40 est nécessaire pour l'induction de la signalisation intracellulaire [85, 86]. Or, l'agrégation du CD40 et l'amplification du signal peuvent se faire à la suite d'une translocation dans les RLs. Plusieurs études ont démontré l'importance de la translocation du CD40 dans les RLs, ce qui entraîne le mouvement des TRAF2 et 3 dans les radeaux ainsi que l'activation du NFκB [86, 87]. Par ailleurs, Vidalain P.O. et *al.* ont démontré que les radeaux lipidiques sont nécessaires pour la production de l'ARN messager d'IL-1  $\alpha/\beta$  et IL-1Ra dans les cellules dendritiques [88]. Outre le CD40, les sous-unités des enzymes NAD(P)H oxydases (NOX), plus spécifiquement NOX 2, requièrent

la présence des radeaux lipidiques pour leur assemblage et la production de ‘Reactive Oxygen Spieces’ (ROS) [89]. Ceci est intéressant puisque plusieurs études démontrent que le CD40 utilise les NOX pour la production des ROS [90, 91]. Les NOX représentent un bon exemple d’enzymes produisant du ROS de manière délibérée [92]. La famille des NOX est composée de cinq membres (Nox1, Nox2, Nox4, Duox1, Duox2) [92]. Ces enzymes jouent un rôle important dans l’immunité innée en éliminant les bactéries par l’ « oxidative burst » dans les cellules phagocytiques [92]. De plus, les ROS que ces enzymes génèrent peuvent devenir un second messenger de la signalisation intracellulaire dans les cellules non-phagocytiques et l’activation des lymphocytes [93, 94].



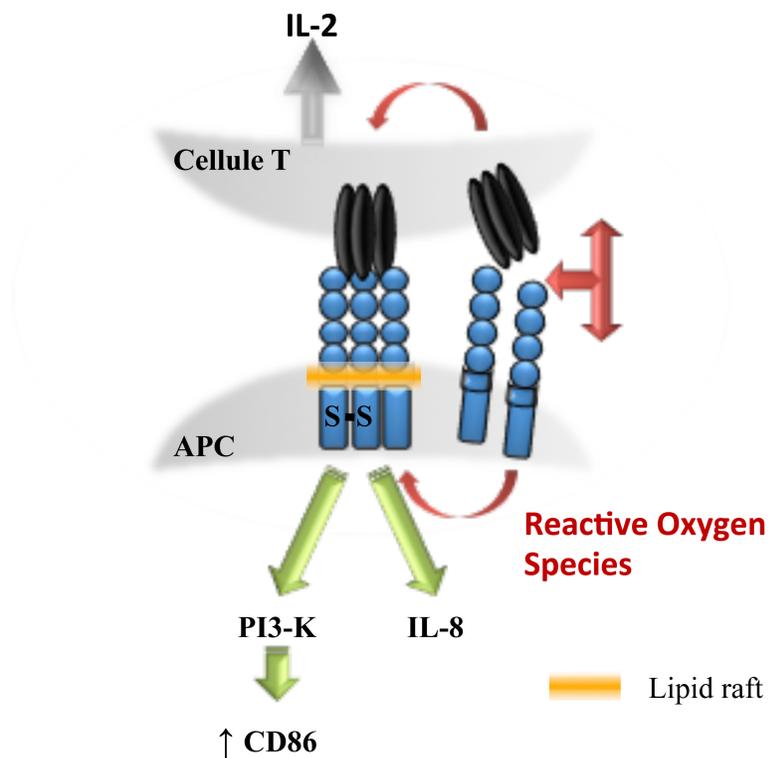
**Figure 5: La structure des radeaux lipidiques.**

Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines riches en cholestérol et en glycosphingolipides et se retrouvent dispersés à travers la membrane cellulaire.

### 1.7.1.3. L’homodimérisation du CD40

Malgré la démonstration de l’importance de l’agrégation du CD40 pour l’activation de diverses voies de signalisation, peu d’études ont exploré l’impact de l’homodimérisation du CD40. À la suite de la découverte du CD40 sous forme homodimérique constitutif dans des cellules malignes [95], une première étude par Baker, M.P. et *al.* a démontré que

l'homodimérisation du CD40 dans les lymphocytes B pouvait être impliquée dans l'induction de la survie des cellules à la suite de l'induction du Bcl-2 [96]. Par la suite, notre laboratoire a tout d'abord démontré que l'homodimérisation du CD40 était due à la formation d'un pont disulfure (db-CD40 homodimères) [97]. De plus, nous avons démontré que cet homodimère était nécessaire pour la phosphorylation du PI-3K et l'activation de l'Akt puisque cette induction était bloquée lorsque l'homodimérisation du CD40 était inhibée par un prétraitement des lymphocytes B (Bjab) avec de l'iodoacétamide [97]. De plus, à la suite du même prétraitement, nous avons démontré que le db-CD40 homodimère était nécessaire pour l'induction du B7.2 (CD86), une molécule costimulatrice [97]. Comme la formation d'un pont disulfure requiert la présence de cystéine, nous avons démontré que la mutation de la cystéine extracellulaire (C6A) du CD40 empêche la formation du db-CD40 homodimères [98]. Par conséquent, l'abolition des db-CD40 homodimères inhibait la production d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire [98]. Nous avons aussi démontré que l'homodimérisation du CD40 requiert un signal puisqu'il a été impossible d'homodimériser du CD40 monomère soluble suite à une oligomérisation [98]. Nous avons tout d'abord démontré que l'homodimérisation du CD40 se fait dans les radeaux lipidiques [99]. Afin d'étudier, la voie de signalisation et les résidus du CD40 impliqués dans l'homodimérisation du CD40, nous avons tronqué la partie cytoplasmique du CD40 (CD40- $\Delta$ ). Comme le CD40- $\Delta$  ne formait pas d'homodimère, nous avons muté l'unique cystéine présente dans la partie cytoplasmique du CD40 (C238). De ce fait, la cystéine 238 s'avère importante pour la formation du CD40-homodimère [99]. Par ailleurs, nous avons aussi montré que l'engagement du CD40 sur les cellules B par le CD154 est capable de former du CD40 homodimères (db-CD40) en présence des ROS (**Figure 6**) [99]. De plus, il s'est avéré que l'homodimérisation du CD40 était importante pour la production d'IL-2 dans les cellules T activées par le biais du CD154 (**Figure 6**) [99].



**Figure 6: Le rôle de l'homodimérisation du CD40 dans l'induction de la signalisation.**

L'interaction entre le CD40 et le CD40L mène à leur translocation dans les radeaux lipidiques. La localisation du CD40 dans les radeaux lipidiques mène à l'activation de voies de signalisation qui sont dépendantes de l'homodimérisation du CD40

## ***1.8. Le CD40 : un pont entre l'immunité innée et adaptative***

### **1.8.1. La réponse immunitaire adaptative.**

La réponse immunitaire adaptative est la réponse spécifique induite par notre organisme. Cette réponse est régie par deux types de réponses, l'immunité humorale et cellulaire. L'interaction CD40/CD154 est importante pour la régulation de cette réponse immunitaire.

#### **1.8.1.1. La régulation de la réponse humorale :**

La réponse immunitaire humorale se caractérise par l'action d'anticorps sécrétés par les cellules B qui protègent notre organisme de trois façons. Premièrement, les anticorps peuvent neutraliser les pathogènes en les empêchant d'infecter les cellules. Deuxièmement, les

anticorps peuvent enrober les pathogènes pour ensuite se lier aux récepteurs de Fc, qui s'associent à la région constante (C) des anticorps. Ainsi, les macrophages peuvent éliminer les pathogènes par phagocytose ou par un phénomène appelé opsonisation. Troisièmement, les anticorps peuvent induire l'activation de compléments qui peuvent faciliter la phagocytose et la lyse des pathogènes. Or la production et la diversification des anticorps sont régulées par le complexe CD40/CD154 [8].

La commutation isotypique (CI) au niveau de la région constante des anticorps représente une des manières de diversifier les anticorps. La commutation peut être induite d'une manière dépendante ou indépendante des cellules T. L'induction de la CI requiert la présence de deux signaux (un signal principal et un signal secondaire) [100]. Le premier signal est nécessaire pour l'activation de l'*activation-induced cytidine deaminase* (AID), une enzyme qui initie la commutation. Tandis que le deuxième signal est induit par les cytokines, comme l'IL-4 et le *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) [100]. L'activation d'AID peut se faire indépendamment de l'association des cellules B avec les cellules T auxiliaires [*T helper cells* (Th)] et indépendamment du CD40. Il requiert cependant une certaine synergie entre le BCR et les TLRs. Ceci mène à la génération d'IgG et d'IgA spécifiques aux pathogènes microbiens, comme les polysaccharides bactériens, durant la phase initiale de l'infection [100]. Même si cette induction de la réponse humorale ne requiert pas la présence du CD40, il a été démontré que la stimulation via le CD40 pouvait augmenter le niveau d'IgG et élargir la diversification des Igs d'une manière similaire à une réponse humorale induite avec l'aide des cellule T auxiliaire (Th) [101].

En contrepartie, le complexe CD40/CD154 est essentiel pour la commutation isotypique dépendante de la présence de lymphocytes T [100]. L'importance de l'interaction CD40/CD154 a été démontrée par le blocage de celle-ci. En effet, les patients souffrant du syndrome Hyper-IgM lié au chromosome X (HIGM) avaient un niveau normal ou élevé d'IgM et une faible concentration d'IgG, IgA et IgE [102]. Par ailleurs, comme il a été décrit ci-haut, en plus de la stimulation via le CD40, l'apport des cytokines tel que l'IL-4 est nécessaire pour aboutir à ce changement de classe. Ainsi, une combinaison du signal induit par le CD40 et l'IL-4 induit la production d'IgG1 et d'IgE. L'IgA est le fruit d'une combinaison du signal

induit par le CD40 et le TGF- $\beta$  [100]. Par ailleurs, il a été démontré que le signal induit par le CD40 nécessaire pour la commutation isotypique serait transmis par le TRAF2 et le TRAF3 et serait indépendant du TRAF6 [103, 104]. Par conséquent, le CD40 nécessiterait la présence du TRAF6 lors de la différenciation des CPAs [75].

#### **1.8.1.2. La régulation de la réponse cellulaire.**

L'induction d'une forte réponse immunitaire humorale requiert l'interaction des cellules T CD4<sup>+</sup> activées avec les cellules B [2]. Le CD40 joue un rôle primordial durant cette interaction. En effet, l'association du CD40 est requise pour l'activation des cellules B naïves et pour leur différenciation en cellules B mémoires et en plasmocytes sécrétant des Igs [75]. La formation du complexe CD40/CD154 est importante pour l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> [2] et pour la production IL-12 qui induit une réponse de type Th1 des lymphocytes T [2]. De plus, le CD154 exprimé à la surface des cellules T CD4 auxiliaires folliculaires (T<sub>FH</sub>) est nécessaire pour leur rôle dans la réponse immunitaire [75]. En effet, l'interaction cellules B/T<sub>FH</sub> est nécessaire pour le maintien du GC, la prolifération des cellules B, la commutation isotypique et la différenciation en plasmocytes [75]. Ainsi, les cellules Th vont interagir avec les cellules B folliculaires à la limite du manchon lymphoïde périartériel [75]. L'interaction Th/B folliculaires permettra aux cellules Th de se différencier en cellules T<sub>FH</sub> exprimant le CXCL13, CD154 et ICOS en plus de pouvoir sécréter la cytokine IL-21 [75]. L'activation induite par le CD40 se fait via la formation d'une synapse immunologique (IS) qui a un effet bidirectionnel sur l'activation des cellules T et des cellules présentatrices d'antigènes. Cette section portera sur la nécessité du CD40 sur la différenciation et l'activation des cellules B.

#### **1.8.1.3. Régulation de la différenciation des cellules B par le CD40.**

Le CD40 est essentiel à la prolifération et à la différenciation des cellules B puisqu'il a été relaté que les cytokines co-stimulatrices (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et l'IFN- $\gamma$ ) seules ou en combinaison ne pouvaient pas pallier à l'absence du CD40 [75]. À la suite d'une activation des cellules Th, les cellules B sont transférées dans les follicules lymphoïdes secondaires où la formation du GC est initiée [75]. L'importance du CD40 vient du fait que les cellules Th, exprimant le CD154 et essentielles pour l'activation des cellules B, apparaissant 2 à 5 jours

suivant l'immunisation [75]. L'engagement du CD4 dans le GC est nécessaire pour la commutation isotypique et le réarrangement somatiques du BCR. Ultiment, les cellules B du GC se transforment en cellules B mémoires et en plasmocytes de longue durée [2, 75]. De plus, l'intensité de l'engagement du CD40 peut affecter la différenciation des cellules B. La formation et la maturation du GC requièrent l'activation du CD40. Cependant, l'amplification de l'interaction CD40/CD154 induit une différenciation des cellules B du GC en plasmocytes [75]. De plus, la signalisation induite par l'engagement du CD40 a été étudiée à l'aide de souris transgéniques exprimant différents mutants du CD40 [105]. Ainsi, l'utilisation de mutations ponctuelles abolissant spécifiquement l'interaction du CD40 avec les différents TRAFs a permis de démontrer que la présence du TRAF2/3 ou du TRAF6 est nécessaire pour la formation du GC. De plus, cette même étude suggère que le TRAF6 est spécifiquement responsable de la génération des plasmocytes et de la maturation de l'affinité [105].

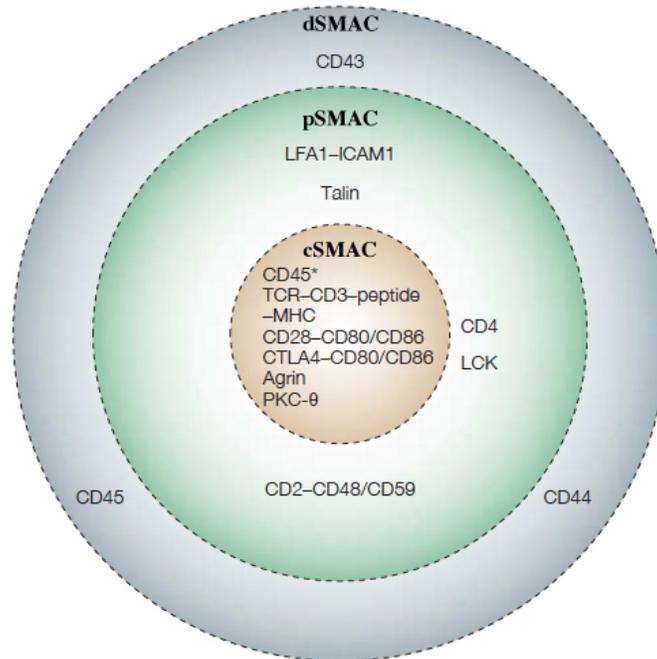
#### **1.8.1.4. L'activation des lymphocytes B**

L'activation des lymphocytes B dépendante des lymphocytes T requiert deux signaux. Le premier signal provient de la liaison du BCR avec un antigène. Le deuxième signal provient de la présentation de cet antigène aux lymphocytes Th qui induisent l'activation et la prolifération des cellules B. Le contact entre les deux cellules se fait par le biais de la synapse immunologique (IS). La IS est formée du complexe CMH/antigène associé au complexe TCR/CD3 ainsi que de récepteurs co-stimulateurs associés à leur ligand. L'absence d'engagement des molécules co-stimulatrices durant la IS mène à l'anergie des lymphocytes B et T. L'activation des cellules B via le CD40 induit l'expression des molécules co-stimulatrices telles que le CD23, CD69 et le CD80/CD86.

##### ***1.8.1.4.1. La synapse immunologique.***

La synapse immunologique, qui peut durer 30 minutes et plus, est caractérisée par la polarisation et la ségrégation du TCR/CD3-peptide/CMH et les molécules co-stimulatrices en trois régions distinctes du *supra-molecular activation complexes* (SMAC) (**Figure 7**) [106]. La région centrale du SMAC est composée du TCR/CD3-peptide/CMH ainsi que des récepteurs CD80/CD86 qui s'associent à leur ligand le CD28. La région périphérique

(pSMAC) est caractérisée par la présence d'intégrines (LFA-1/ICAM) requis pour l'adhésion cellulaire (**Figure 7**). La troisième région dSMAC qui est distale par rapport du pSMAC contient les larges molécules associées à la IS comme le CD45 et le CD43 (**Figure 7**) [106].

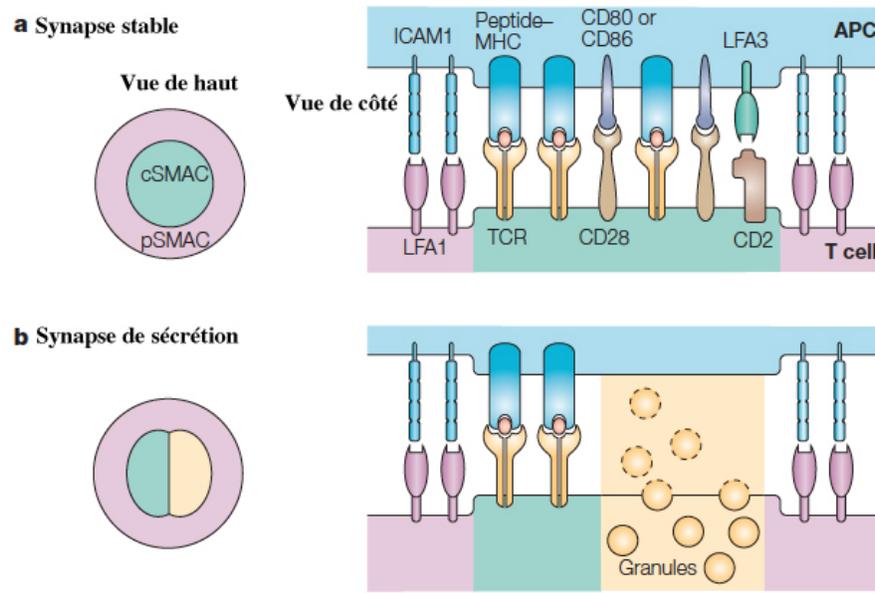


**Figure 7: Un aperçu d'un synapse immunologique mature à la surface d'une cellule T.**

Cette vue de face de la synapse immunologique formée entre une APC et une cellule T nous permet d'observer la distribution des molécules nécessaires pour l'induction de la réponse immunologique. Ainsi, au centre de la synapse, il y a la région du cSMAC dominée par l'interaction TCR-CMH, CD28-CD80/CD86 et CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*)-CD80/CD86. Cette région est suivie par le pSMAC composé de molécules d'adhésion (LFA1-ICAM-1). Finalement, on retrouve le dSMAC où on retrouve les molécules plus imposantes comme le CD45. Par ailleurs, le CD45 peut aussi migrer vers le cSMAC durant les étapes ultérieures du synapse immunologique. Figure inspirée de *Huppa, J. et al. 2003*.

Le développement de la IS se fait en cinq étapes [107]. Premièrement, il y a un balayage cellulaire caractérisé par un contact cellulaire et une adhésion. Deuxièmement, il y a l'initiation de la IS. Troisièmement, il y a la maturation de la IS où le recrutement des récepteurs co-stimulateurs et leur ségrégation. Quatrièmement, l'internalisation du TCR est initiée. Cinquièmement, on observe la dissolution de la synapse par les molécules inhibitrices. Il y a deux types de IS, la première est stable et connue sous le nom de *stable immunological*

*synapse*. La deuxième, une variante de la IS stable, est connue sous le nom de *secretory immunological synapse* qui est une synapse effectrice. Cette dernière est assemblée de la même manière que la synapse stable à l'exception d'un écart qui est adjacent au cSMAC pour permettre la sécrétion de substances solubles (**Figure 8**).



**Figure 8 Différents modèles de synapses immunologiques**

a) La synapse stable est constituée d'un SMAC central et un SMAC périphérique pour permettre l'activation des cellules T et le maintien de l'induction de la signalisation. b) La synapse de sécrétion est aussi composée d'un cSMAC et d'un pSMAC. Cependant, il y a un écart entre le cSMAC et le pSMAC pour permettre la sécrétion de cytokines, de perforine et/ou de granzymes. *Figure inspirée de Friedl, P. et al., 2005.*

Le CD40 est important dans la régulation de la IS puisqu'il est recruté à la région cSMAC [108]. Chez les primates, le CD40 a été localisé dans le cSMAC et le pSMAC [109]. De plus, le CD40 associé à la synapse immunologique pourrait induire l'activation de l'AKT nécessaire pour la réponse anti-apoptotique dans les cellules dendritiques [110]. Par ailleurs, l'engagement du CD40 sur les cellules B pourrait induire dans un premier temps l'agrégation du CMH-II et du CD80 dans les radeaux lipidiques [111]. Dans un deuxième temps, l'induction du CD40 augmente l'expression du CD80 [111]. Ceci a pour effet d'amplifier le rôle de présentation antigénique des cellules B par le biais de la synapse immunologique.

#### **1.8.1.4.2. L'axe CD80/CD86.**

Le CD80 et le CD86 sont des molécules co-stimulatrices essentielles pour le développement de la IS. De plus, comme il a été décrit ci-dessus, l'engagement du CD40 est important pour leur expression. Le CD80 et le CD86 appartiennent à la famille B7 et sont aussi connus sous le nom de B7.1 et B7.2 respectivement. Les membres de la famille B7 ainsi que leurs récepteurs le CD28, le *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA4), *B and T lymphocyte attenuator* (BTLA), *programmed cell death 1* (PD1) et *inducible costimulator* (ICOS) sont des glycoprotéines transmembranaires de type I appartenant à la grande famille des Igs. Ainsi, les B7 ont tous les deux des domaines extracellulaires similaires *immunoglobuline variable* (IgV) et *immunoglobuline constante* (IgC). Les récepteurs, membres de la famille de CD28, ont seulement un domaine extracellulaire, similaire au IgV [112]. Le CD28 se lie au CD80/CD86 et le ICOS se lie au B7h (B7RP-1/ICOSL/B7H2) pour induire un signal de co-stimulation [112]. Tandis que l'interaction CTLA4/CD80 ou CD86, PD-1/PD-L1 (B7-H1) ou PD-L2 (B7-DC), BTLA, B7-H4 et B7-H3 induisent un signal d'inhibition [113].

Le CD28 est constitutivement exprimé sur la surface des cellules T naïves et requière une association avec le CD80 et le CD86 pour induire un signal co-stimulateur afin de maintenir la IS et éviter le phénomène d'anergie dans les lymphocytes. Il s'avère que le CD28 aurait une plus grande affinité pour le CD86 [114]. De plus, il a été démontré que le CD86 est exprimé plus rapidement et atteint son niveau d'expression maximal après 48h; tandis que le CD80 est exprimé plus lentement et atteint son niveau d'expression maximal après 4 à 5 jours [112]. L'engagement du CD28 par le CD80/CD86 mène à l'induction du CTLA4 à la surface des lymphocytes T, cette présence du CTLA4 mène à la dissolution de la IS puisque ce dernier remplace le CD28 comme récepteur pour le CD80/CD86 [107]. En effet, le CTLA4 a une plus forte affinité et une plus forte avidité pour le CD80 et CD86 que le CD28 [112]. Par ailleurs, il a été démontré que le CTLA4 avait une plus grande affinité pour le CD80 [114]. Ceci nous permet de suggérer que l'interaction entre les quatre molécules est méticuleusement régulée pour induire une meilleure réponse immunitaire via la IS.

#### 1.8.1.4.3. Le CD23

Le CD23, un récepteur de faible affinité d'IgE (FcεRII), est une glycoprotéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des lectines de type C. Le CD23 membranaire (mCD23) possède un poids moléculaire de 45 kDa avec un domaine extracellulaire C-terminal globulaire similaire aux lectines de type C et un petit domaine intracellulaire N-terminal [115]. La partie extracellulaire possède aussi une région avec plusieurs répétitions qui peut agir comme *leucine zipper* et ainsi aider à l'oligomérisation du CD23 [115]. En effet, le mCD23 est sous forme trimérique à la surface des cellules [115]. Le CD23 est exprimé à la surface des lymphocytes B et T, les monocytes, les cellules dendritiques, épithéliales, etc [115]. Le CD23 est représenté sous deux isoformes le CD23a et le CD23b qui diffèrent de 6 à 7 aa au niveau de la région cytoplasmique N terminale [112]. La régulation de l'expression des deux isoformes est différente. Ainsi, le CD23a est induit par une stimulation par IL-4 via le facteur de transcription *pax-5/B-cell lineage specific activator protein* (BSAP), il est constitutivement exprimé sur les lymphocytes B activés [116, 117]. Le CD23b est exprimé dans diverses cellules hématopoïétiques incluant les lymphocytes B. Divers stimuli peuvent induire le CD23b, comme le CD40 et l'IL-4, et il requiert l'activation des facteurs de transcriptions tels que le NFκB et l'AP-1 [116]. En plus de la formation d'isoformes, le CD23 peut être sous trois formes solubles, sCD23. Il a été démontré que le CD23 peut être clivé par l'ADAM10 pour produire du CD23s ayant un poids moléculaire de 37 ou de 33 kDa [115, 118]. Il a été relaté que le CD23 pouvait être aussi clivé par la protéase *derp1*, retrouvée dans les fèces d'acariens de poussière (*Dermatophagoides pteronissinus*), en un sCD23 de 16 kDa (derCD23) [115]. Le ligand principal du CD23 est l'IgE [115]. D'autres ligands ont été attribués au CD23 soit le CD21 et les intégrines, αMβ2, αXβ2, αvβ3 et αvβ5 [115].

Le rôle du mCD23 consiste dans l'induction de l'adhésion homotypique, l'autostimulation et l'activation des cellules B [119]. De plus, le mCD23 peut diminuer la production d'IgE et peut aussi jouer un rôle dans la présentation d'antigènes qui sont en complexe avec l'IgE [115]. Il a été rapporté que les souris déficientes en mCD23 n'arrivaient pas à présenter le complexe IgE/antigène. De plus, ces souris étaient caractérisées par une hyper-expression de l'IgE [115].

Tandis qu'une surexpression du mCD23 dans les souris mène à une diminution d'IgE [115]. Or, ceci pourrait s'avérer risqué, car une accumulation de mCD23 induit la création de plus de sCD23. Le sCD23 induit la production et la sécrétion d'IgE [115]. De plus, il a été démontré que le sCD23 peut induire la survie lymphocytaire et la sécrétion de cytokines par les monocytes [115]. Par ailleurs, une accumulation de sCD23 a été retrouvée chez des patients souffrants de maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, etc) ou de leucémie lymphoïde chronique (B-CLL) [115]. Une étude a démontré que l'oligomérisation du sCD23 peut influencer la régulation du IgE. En s'inspirant du derCD23 qui est sous forme monomérique, McCloskey, N. et al., ont démontré, à l'aide de sCD23 recombinant,[120] que le sCD23 monomérique inhibait la production d'IgE; tandis que le sCD23 trimérique augmentait la production d'IgE [120].

La régulation de l'expression du CD23 par le CD40 a été extensivement étudiée. Il a été démontré que la mutation à la position P227 dans la partie cytoplasmique du CD40 bloquait la production du CD23 [69]. Cette étude suggère que l'association du JAK3 au CD40 et l'activation de STAT3 seraient impliquées dans la production du CD23. De plus, une autre étude a démontré que l'ablation des 22 derniers aa de la région cytoplasmique du CD40 ainsi que la mutation ponctuelle au niveau de la T234 inhibait la production du CD23 [121]. Ce qui suggère l'implication du TRAF2 dans la production du CD23. Finalement, une étude a aussi démontré que l'induction du TRAF5 par le CD40 pourrait être impliquée dans la production de CD23 [122]. D'autres études seront nécessaires pour voir s'il y a une synergie ou simplement une redondance entre les différentes protéines adaptatrices suite à l'engagement du CD40 pour mieux comprendre le rôle du CD40 dans la production du CD23.

#### **1.8.1.4.4. Le CD69**

Le CD69 est rapidement exprimé à la surface des lymphocytes T soit une heure après l'engagement du TCR/CD3 [123]. De plus, il est aussi exprimé constitutivement sur les thymocytes matures [123]. Longtemps associé à l'activation des cellules T, il a été observé

que le CD69 pouvait être aussi exprimé sur les plaquettes, les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les cellules NK (*natural killer*) et les cellules B [123]. Comme le CD23, CD69 est une glycoprotéine transmembranaire de type II membre de la famille des lectines de type C [123]. Le CD69 est exprimé à la surface des cellules sous une forme homodimérique liée par un pont disulfure [123]. Outre l'engagement du TCR/CD3, il a été démontré que le CD69 pouvait être induit *in vitro* par le TNF $\alpha$ , l'INF $\alpha/\beta$ , le poly :IC ou les esters de phorbol [124]. Par ailleurs, le CD40 est aussi impliqué dans la régulation du CD69. Il a été démontré que la présence du CD40 lors de la stimulation par les cellules T amplifiait l'expression du CD69 sur les lymphocytes B [125]. De plus, le CD40 est requis pour l'augmentation de l'expression du CD69 sur la surface des lymphocytes B spléniques et thymiques [126]. Il a aussi été démontré que la sensibilisation des cellules B naïves par l'engagement du CD40 amplifiait la production du CD69 induite par le BCR [127].

Il a été postulé que le CD69 agissait normalement comme un agent co-stimulateur pour l'activation et la prolifération des cellules T [123]. Or, plusieurs études *in vivo*, ont démontré que le rôle du CD69 était fort plus complexe [128]. Ainsi, le CD69 serait impliqué dans la migration des lymphocytes T et la sécrétion de cytokines [124, 129]. Il a été récemment démontré que le CD69 pouvait faciliter le transfert et la persistance des cellules T CD4<sup>+</sup> dans la moelle osseuse [130]. Ainsi, ces cellules T CD4<sup>+</sup> étaient incapables de se différencier en cellules T mémoires [130]. Dans un autre ordre d'idée, les souris n'exprimant pas le CD69 étaient plus susceptibles à l'arthrite induite par le collagène (CIA) [124]. En effet, dans un modèle de CIA, les souris CD69<sup>-/-</sup> ont un faible niveau de TGF $\beta$  dans les articulations. De plus, il a été démontré que la déficience en CD69 chez les souris affectait le développement des lymphocytes B. Par ailleurs, le CD69 peut être impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire puisqu'il pourrait, par sa participation dans la production du TGF $\beta$ , induire le développement des cellules T régulatrices (Treg) [128]. De plus, Sancho, D. et Gomez, M. ont discuté d'une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>, présente dans un modèle de lupus chez la souris, qui était anergique et incapable de produire de cytokines pro-inflammatoires. De plus, cette population empêchait la production de cytokines par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

CD69<sup>-</sup> [128]. Le fait que le ligand du CD69 n'a pas encore été découvert rend l'étude du rôle du CD69 dans la régulation de la réponse immunitaire difficile à cerner.

## **1.8.2. Régulation par le CD40 de la réponse immunitaire innée.**

### **1.8.2.1. La famille des TLRs**

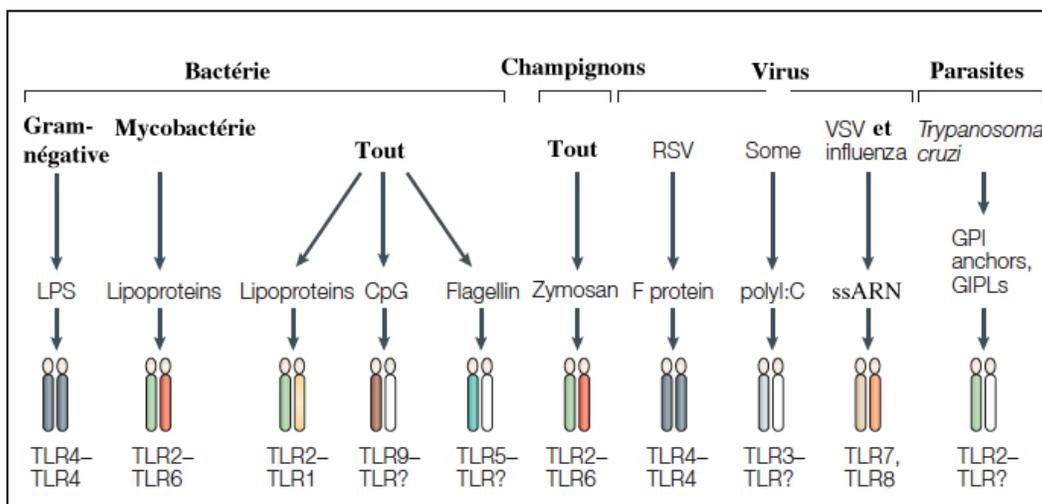
La coordination entre la réponse immunitaire innée et adaptative est primordiale pour une défense efficace et robuste contre toute infection de l'organisme. Ainsi, notre première ligne de défense contre toute attaque microbienne est une ancienne branche évolutive de la réponse immunitaire, l'immunité innée. Une des caractéristiques de l'immunité innée est la reconnaissance des « PAMPs » (pathogen-associated molecular patterns). Comme les PAMPs sont hautement conservés et essentiels pour la survie des microbes, ils représentent des cibles de choix pour les « PRRs » (pattern-recognition receptors) [131]. Les PRRs sont versatiles, nous pouvons les retrouver exprimés à la surface des cellules, à l'intérieur des cellules ainsi que sous forme soluble dans le sang. Par ailleurs, les PRRs jouent un rôle important dans la réponse innée en induisant l'opsonisation, la coagulation, la phagocytose, l'activation des compléments, l'activation de la réponse pro-inflammatoire et l'induction de l'apoptose [131].

Les récepteurs de type Toll (TLRs) sont les PRRs les plus étudiés et caractérisés. Les TLRs sont regroupés en deux grandes catégories selon qu'ils sont exprimés à la surface des cellules ou selon qu'ils sont localisés dans l'endosome [132]. Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant une partie extracellulaire riche en *leucine-repeats* (LRR), importante pour l'interaction avec les PAMPs, et une partie intracellulaire contenant un domaine TIR (*Toll/IL-1 receptor*), important pour l'interaction entre les protéines [131, 133]. Jusqu'à présent on a découvert onze membres de la famille des TLRs, TLR 1 à 11 [133]. Les TLRs humains (1 à 10) ont été regroupés dans cinq sous-familles suite à une comparaison de leur séquence d'acide aminé, soit la sous-famille de TLR2 (composée de TLR2, TLR1, TLR6 et TLR10), TLR3, TLR4, TLR5 et TLR9 (composé de TLR7, TLR8 et TLR9) [134]. Chaque sous-famille de TLRs se lie avec différents PAMPs (**Figure 9**) [131, 133, 134].

#### **1.8.2.1.1. Les ligands des TLRs**

Ainsi, la sous-famille de TLR2, plus spécifiquement TLR2, TLR1 et TLR6, qui est exprimée à la surface des cellules, se lie avec un large éventail de pathogènes comme les peptidoglycanes des bactéries Gram-positives, les lipoprotéines bactériennes, etc [131]. Cette grande diversité d'interaction avec les différents PAMPs provient du fait que le TLR2 peut créer un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 [131]. Le TLR4 est reconnu pour son association avec les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatives et la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial [131, 133]. Cependant, la liaison entre le TLR4 et LPS semble sophistiquée puisqu'un modèle démontre que la liaison avec le LPS requiert la formation d'un complexe entre TLR4 et des protéines accessoires, le CD14 (récepteur du LPS) et le MD2 (une molécule sans région transmembranaire qui s'associe avec le TLR4) [131, 133]. Tandis qu'un second modèle démontre que le LPS peut se lier directement au TLR4 [135, 136]. Le TLR5 se lie à la flagelline provenant des bactéries [131]. La sous-famille du TLR9 (TLR9, TLR7) et la sous-famille du TLR3 ne sont pas exprimées à la surface et s'associent avec les structures contenant des acides nucléiques provenant de bactéries et de virus phagocytés. Ainsi, Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin, le TLR9 s'associe avec l'ADN contenant du CpG et le TLR7 se lie avec l'ARN simple brin ainsi que des produits synthétiques (Imidazoquinoline, Loxoribine, Bropirimine) [133]. Outre les PAMPs, les TLRs peuvent aussi se lier au DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), des molécules du soi générées en réponse à une lésion tissulaire [137]. Les DAMPs peuvent être présents sous forme de protéines (HSP60, HMGB1,  $\beta$ -defensin, etc), sous forme de lipoprotéines (Lipoprotéine de basse densité (LDL) oxydée), sous forme de protéoglycanes (acide hyaluronique (HA), biglycane) ou sous forme d'acides nucléiques (ARN simple brin, ARNm) [137]. Comme pour les PAMPs, l'association des TLRs avec les DAMPs est hautement régulée. Ainsi, l'association des DAMPs avec les différents TLRs peut être divisée en quatre groupes selon la nécessité des corécepteurs et des molécules co-stimulatrices (CD14 et MD-2) [137]. Le premier groupe de DAMPs requiert la présence du CD14 et MD-2 par exemple, HSP60, HSP70 et biglycane (des ligands pour TLR2 et TLR4) [137]. Le deuxième groupe de DAMPs nécessite la présence de CD14 uniquement comme pour les protéines tensioactives A et D (*surfactan protein A and D*) [137]. Le troisième groupe de DAMPs nécessite la présence de MD-2 uniquement comme Gp96 et HGMB1 pour l'activation des TLR2 et TLR4 [137]. Finalement, le quatrième groupe

de DAMPs qui utilise d'autres corécepteurs en combinaison avec MD-2 ou CD14 [137]. Par exemple, l'activation du TLR4 par le HA dépend de la présence de CD44 et MD-2 [137, 138].



**Figure 9: Les différents membres des TLRs et leurs ligands.**

Voici un aperçu des différents membres de la famille des TLRs et leurs interactions avec les différents types de pathogènes. Ainsi, le TLR4 est principalement reconnu pour son interaction avec le LPS, le TLR7 se lie à l'ARN simple brin. De plus, on peut observer que les TLRs peuvent former des hétérodimères entre eux pour améliorer la chance de mieux reconnaître les divers PAMPs. *Figure inspirée de Liew, F., et al. 2005.*

### 1.8.2.1.2. La signalisation via les TLRs

La liaison des pathogènes entraîne la dimérisation ou l'hétérodimérisation des différents TLRs. Ceci entraîne le recrutement de protéine adaptatrices, MyD88 (*myeloid différenciation primary-response protein 88*), TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β*) et TRAM (*TRIF-related adaptor protein*), qui possèdent le domaine TIR et qui sont essentiels pour l'initiation des cascades signalétiques des TLRs dans le but ultime d'activer le NFκB et d'autres facteurs de transcription [133]. Or, les différentes combinaisons entre les TLRs et les différentes protéines adaptatrices, contenant le domaine TIR, varient la réponse induite par les différents TLRs. Ainsi, le TLR4 et le TLR2 utilisent la voie de signalisation dépendante du MyD88/TIRAP

pour induire la production de cytokines pro-inflammatoire (IL-6, TNF $\alpha$ ) tandis que la voie de signalisation dépendante du TRAM/TRIF induit la maturation des cellules dendritiques, en stimulant l'expression de molécules co-stimulatrice comme le CD40, le CD80 et le CD86, induit la prolifération des lymphocytes T et induit la production d'interférons- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) [133]. De plus, l'association de ces molécules adaptatrices aux TLRs recrute d'autres molécules impliquées dans la voie de signalisation des TLRs. Ainsi, il a été montré que MyD88/TIRAP recrute les kinases associées au récepteur de l'IL-1 (IRAKs). Or, des patients avec une déficience au niveau d'IRAK4 ne répondent pas à une stimulation via le TLR2, 3, 4, 5 et 9 [133]. Par ailleurs, il a aussi été démontré qu'IRAK1 était activé en amont d'IRAK4 puisque les souris déficientes en IRAK1 réduisaient, la production de cytokines, suite à une stimulation via LPS [133, 139]. Outre les molécules adaptatrices qui activent les voies de signalisation des TLRs, il y a des inhibiteurs reconnus de la signalisation via les TLRs. Ainsi, il existe des inhibiteurs intracellulaires tel que l'IRAKM, SOCS-1, MyD88s (MyD88 short) et TOLLIP [133, 140]. Il y a aussi les molécules membranaires inhibitrices, SIGIRR (*Single immunoglobulin IL-1R-related molecule*) et ST2, qui contiennent un domaine TIR et qui empêchent la liaison des TLRs avec leurs molécules adaptatrices [133, 140]. Finalement, des formes solubles du TLR2 et du TLR4 (sTLR2 et sTLR4) qui ont pour effet d'empêcher l'association de TLR2 et TLR4 (transmembranaires) avec leur ligand respectif [140].

#### **1.8.2.1.3. Expression des TLRs**

Il a été démontré que l'ARNm de tous les TLRs, sauf TLR3, est exprimé dans tous les monocytes et macrophages [134]. En plus des macrophages et des monocytes, les cellules B peuvent exprimer les TLRs [141, 142]. Le niveau d'expression des TLRs sur les cellules B est variable et dépendante de l'espèce [132]. Ainsi, les cellules B humaines expriment les TLR1 à 10, tandis que les cellules B murines n'exprimeront pas le TLR10 uniquement [132]. De plus, les cellules dendritiques myéloïdes (mCD) expriment le TLR1, 2, 4, 5 et 8, tandis que les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pCD) expriment TLR7 et TLR9 [134]. Le rôle des TLRs dans la réponse immunitaire semble être guidé par leur répartition sur des cellules immunitaires et non-immunitaires. Ainsi, Medzhitov, R., relate comment le TLR1 et le TLR6

sont constitutivement exprimés dans la plupart des cellules tandis que le TLR2 est plus régulé puisqu'il se retrouve sur les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules endothéliales, régulant ainsi la réponse cellulaire face aux produits microbiens [131]. Par ailleurs, il a été démontré que le TLR2 et le TLR4 sont faiblement exprimés par les cellules de l'épithélium intestinal (IECs) [143]. Or, chez les patients souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin, on remarque une hausse de l'expression du TLR4 spécifiquement, ainsi que les TLR 2, 3, 5 et 9 (exprimant un niveau semblable ou légèrement inférieur au TLR4) [143]. Finalement, les TLRs peuvent être limités spatialement puisqu'on les retrouve majoritairement dans la région basolatérale des IECs (vers le lamina propria) [143]. Ce qui a pour effet de limiter leur interaction avec les bactéries commensales puisqu'on retrouve un niveau élevé de TLR4 polarisé vers la région apicale des IECs chez les patients souffrant de la maladie de Crohn [143].

#### ***1.8.2.1.4. Rôle des TLRs dans l'immunité innée***

Les TLRs représentent notre première ligne de défense. Suite à la reconnaissance du pathogène microbiens (PAMPs), les TLRs induisent la production d'une réponse inflammatoire (TNF, IL-1 $\beta$  et IL-6) et une réponse antimicrobienne. La production de cytokine pro-inflammatoire comme le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  induisent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins afin de permettre le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation [144]. Par ailleurs, la combinaison de l'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 peut induire via les TLR une réponse antimicrobienne directement ou indirectement dans les macrophages [144]. Une des réponses antimicrobiennes serait la sécrétion de peptides antimicrobiens appelés défensines, qui forment deux sous-familles les  $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines [145]. Les défensines sont exprimés dans la plupart des cellules épithéliales et les phagocytes [145]. Par ailleurs, les cellules de Paneth, dans l'épithélium intestinal, expriment plus spécifiquement les  $\alpha$ -défensines, tandis qu'on retrouve les deux sortes de défensines dans les cellules épithéliales [145].

#### ***1.8.2.1.5. Rôle des TLRs dans l'immunité adaptative***

Les TLRs sont aussi impliqués dans la réponse adaptative lors d'une invasion par des pathogènes (PAMPs). Donc, les TLRs sont capables d'induire la commutation isotypique dans

les cellules B pour avoir la production d'immunoglobuline M (IgM), IgG et IgA, ainsi que la génération de plasmocytes [142, 143]. De plus, les TLRs induisent la maturation des cellules dendritiques en augmentant le niveau d'expression des molécules co-stimulatrices et du CMH de classe II pour faire la présentation d'antigènes afin d'induire la différenciation des cellules T naïves en des cellules T auxiliaires CD4+ (Th1 et Th17) ou en des cellules T cytotoxiques CD8+ [131]. Les TLRs sont capables de contrôler la réponse adaptative selon quatre points.

Le premier point de contrôle est l'activation de la réponse, les ligands du TLRs peuvent aider à déterminer l'origine de l'antigène présenté au CD, ce qui est primordial pour induire une réponse immunitaire appropriée [141]. Ainsi, il a été proposé que l'association d'un ligand d'origine microbienne à son TLR respectif induirait l'inflammation, la réparation du tissu et l'immunité adaptative. Alors que, l'association d'un ligand provenant du soi (DAMP) à son TLR respectif induirait uniquement une réparation du tissu et une inflammation. Un exemple de DAMP serait l'acide hyaluronique (HA) ou le biglycane qui peuvent s'accumuler suite à un endommagement de tissu et qui induisent une réponse pro-inflammatoire en s'associant avec le TLR2 ou le TLR4 [142]. Le deuxième point de contrôle est le type d'immunité adaptative induite. Ainsi, selon Palm, N. et al., la reconnaissance de différents types de ligands par les TLRs induirait la production des cytokines spécifiques [141]. Par exemple, une infection par des produits intracellulaires bactériennes induirait une réponse Th1, une infection par des produits extracellulaires bactériennes ou des champignons favoriserait une réponse Th17 et les helminthes (parasites intestinaux) provoqueraient la production IL-4 et IL-13 (Th2) [141]. Finalement, les deux derniers points de contrôles sont le niveau et la persistance de l'infection qui sont eux aussi déterminés à la suite de l'interaction entre les TLRs et leurs ligands [141].

### **1.8.2.2. La synergie entre le CD40 et les TLRs.**

La démarcation entre les molécules impliquées dans l'immunité innée et adaptative est de plus en plus ambiguë. Comme on a pu voir, les TLRs peuvent être impliqués dans les deux types de réponses. Ceci est également le cas pour le CD40. Le CD40, pouvant être exprimé sur plusieurs types cellulaires, est en effet un bon candidat pour avoir un rôle majeur dans les deux types de réponses. Ainsi, une revue entière a été dédiée au CD40 et son rôle dans l'éradication de différents parasites durant notre première ligne de défense contre les agents microbiens

[146]. Par exemple, un des parasites examinés, le *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), peut être éradiqué par le biais du CD40. Ainsi, l'interaction CD40/CD154 entre les cellules T et les CPAs infectées, par le parasite, induit la production de cytokines pro-inflammatoires de type 1 (IL-12, IFN $\gamma$ ) [146]. Outre la production de cytokines, le CD40 peut participer directement à la dégradation du parasite. En effet, il a été démontré que le CD40 régule la fusion entre les vacuoles, qui sont utilisées par le parasite comme système d'évasion, et les lysosomes via un processus appelé autophagie [147]. Le rôle du CD40 est si important que certaines souches de parasites peuvent affecter la signalisation du CD40 afin de diminuer la réponse immunitaire induite par celui-ci. Ainsi, le *Leishmania major* réduit le niveau du cholestérol membranaire ce qui a pour effet d'empêcher la signalisation du CD40 dans les radeaux lipidiques dans les macrophages. Par conséquent, le CD40, incapable de se lier avec les TRAF2, TRAF3 et TRAF5 dans les radeaux lipidiques, ne peut plus produire de l'IL-12. Ceci favorise la liaison du CD40 au TRAF6 qui mène à la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 [148].

Donc la présence du CD40 et des TLRs sur les CPAs (lymphocytes B, CD, macrophages) suggère une certaine synergie qui pourrait influencer la magnitude des deux formes de réponses immunitaires. Il a été récemment démontré que la présence du CD40 était importante pour la régulation positive de la réponse innée induite par les TLRs sur les macrophages [149]. Dans cette étude, la production de TNF, d'IL-6 et d'IFN $\beta$  par le TLR4 a été diminuée dans les macrophages déficients en CD40. Les auteurs suggèrent que la présence du CD40 était nécessaire comme agent intermédiaire entre le TLR4, le CMH de classe II et le *burton's tyrosine kinase* (BTK). Outre les macrophages, la synergie entre le CD40 et les TLRs peut être aussi observée dans les CD [150]. Ma, D. et al., ont formulé que la stimulation du CD40 et TLR9 par le CD154 et le CpG-B induisait la production IFN de type I [150]. Dans le même ordre d'idée, selon ce que ces auteurs ont rapporté, le TRAF6 serait un commun dénominateur qui relierait la signalisation des TLRs et du CD40. Car, les cellules dendritiques provenant de souris TRAF6 KO, stimulées par le CD154 ou le LPS, seraient incapables de devenir mature. Par ailleurs, la synergie entre les TLRs et le CD40 serait bénéfique pour la présentation immunitaire croisée. Il est documenté que l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL)

par la présentation croisée des antigènes exogènes requiert la présentation des peptides sur le CMH de classe I, l'action des molécules co-stimulatrices (CD80/CD86, CD40, etc.) et les cytokines (IL-12, IL-2, IFN) qui stimulent la différenciation et l'expansion des CD8<sup>+</sup> [151]. Or, les TLRs peuvent ainsi contribuer à la présentation croisée par le biais de la maturation des CD4 et la synergie avec le CD40. Par ailleurs, Ma, D. et al., rapportent qu'un modèle de souris ayant une mutation ponctuelle au niveau du NIK empêchant l'activation du NFκB2 était incapable de présenter l'ovalbumine (OVA) aux cellules T CD8<sup>+</sup> par présentation croisée suite à l'engagement du CD40 ou du TLR4 [150]. La synergie CD40/TLRs peut avoir aussi un impact sur la réponse humorale. Il a été démontré que le CD40 pouvait interagir avec les TLRs pour réguler le développement des cellules B. Ainsi, la stimulation du CD40 et le TLR3, le TLR4 ou le TLR9 augmente la prolifération et l'activation des cellules B ; tandis que la différenciation des cellules B en des cellules sécrétant des anticorps était amplifiée suite à la stimulation du CD40 et les TLR1/2, TLR 2/6, TLR4 ou le TLR7 [152]. Par ailleurs, il a été démontré que le CD40 et le TLR4 ont une certaine redondance puisqu'ils activent le NFκB1 pour induire la survie, la prolifération, l'agrégation homotypique et la commutation isotypique au niveau des cellules B [153].

L'implication du CD40 dans les deux types de réponses immunitaires en fait un régulateur immunitaire de choix. Cependant, comme nous avons vu avec les parasites, le CD40 peut être appelé à contribuer, à contrecœur, à l'immunopathologie de ces dernières. La dérégulation de la réponse induite par le CD40 peut mener à des effets dévastateurs comme l'apparition de maladies auto-immunes. De plus, la présence du CD40 dans les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques fait en sorte qu'il est associé avec différentes maladies auto-immunes.

## ***1.9. Le rôle du CD40/CD154 dans la pathogénèse***

### **1.9.1. Rôle du CD40 dans les maladies inflammatoires**

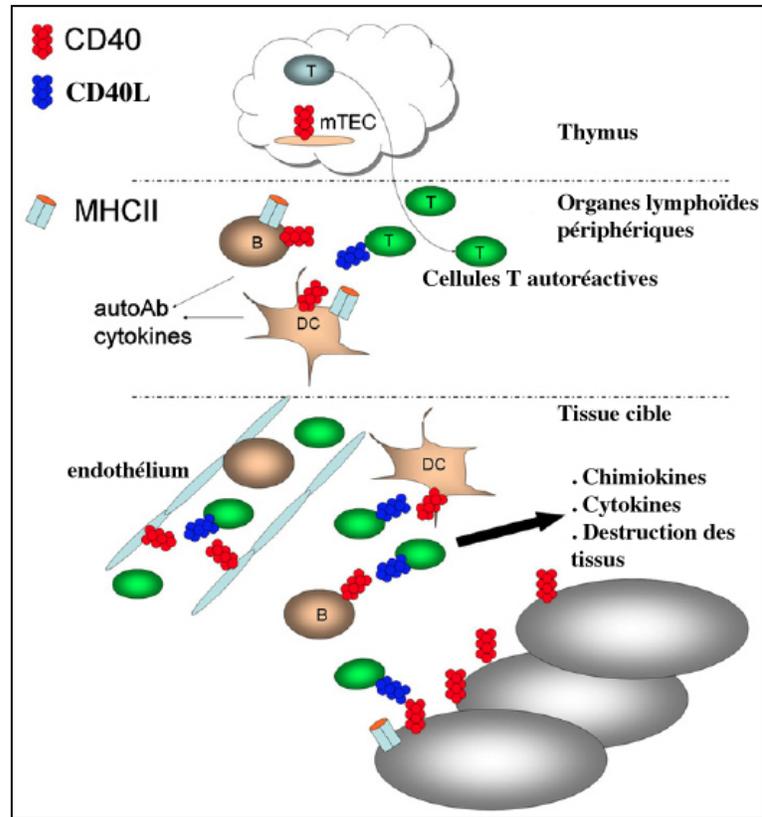
L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique au niveau des artères de gros calibre. Les facteurs de risques cardio-vasculaires peuvent induire des lésions (plaques) [154]. Durant la progression de l'athérosclérose, il y aura une accumulation de cellules et de cytokines pro-inflammatoires dans la lésion et ce qui mènera à la détérioration de la matrice

extracellulaire. Ceci rendra l'artère affectée susceptible à des infarctus [154]. La dyade CD40/CD154 joue un rôle important dans l'athérosclérose puisque le CD40 et le CD154 sont surexprimés sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages au moment de l'initiation et durant la maturation des lésions athéroscléreuses [155-157]. Le CD40 mènera à l'induction de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1, IL-6, IL-8 et le MCP-1 ainsi que l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM) [155]. Ceci permettra la formation et le développement de la lésion à cause du recrutement des monocytes et des lymphocytes T [156]. De plus, il a été démontré que le CD154 exprimé à la surface des cellules T ou sous la forme de recombinant soluble était capable d'induire l'expression des MMPs (MMP-1, MMP-3 et MMP-9). La présence des MMPs permettra ainsi l'expansion et l'éventuelle rupture de la lésion. Lors de la rupture de la lésion mature, il y a une libération des agents thrombotiques accumulés pendant le développement de la lésion dans le sang [156]. S'ensuivent, l'activation et l'agrégation des plaquettes qui sont principalement dues à la présence du CD154 qui s'associe avec l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 [36, 158]. En effet, le groupe d'Andre, P. et al., a démontré que le thrombus artériel était instable et qu'il y a un délai dans l'occlusion artérielle chez les souris CD154 KO [36]. Par le fait même, la thrombose a été restaurée suite à l'injection du CD154 recombinant soluble (CD154rs). De plus, ce même groupe a suggéré que le CD154 se liait avec un autre récepteur ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3), car les souris CD40 KO n'affectaient pas l'induction de la thrombose. Or, une autre étude a démontré que l'activation des plaquettes était due à l'engagement du CD154 avec le CD40 à la surface de celles-ci, et ce, d'une manière indépendante du  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 [159]. Une autre étude a démontré que l'introduction du CD40 transgénique muté au niveau de l'association avec le TRAF6 (CD40-T6<sup>-/-</sup>) dans des souris CD40 KO était plus efficace dans l'abolition de l'athérosclérose que les souris CD40 KO [154]. De plus, cette même étude a démontré que la mutation du CD40 au niveau de l'association du TRAF2/TRAF3/TRAF5 n'empêchait pas l'abolition de l'athérosclérose. En somme, selon ce groupe, le tandem CD40-TRAF6 limite le nombre, l'adhésion et l'infiltration dans la paroi artérielle des monocytes inflammatoires. De plus, les monocytes qui réussissent à s'infiltrer sont dans un état anti-inflammatoire. Ceci est dû au fait que suite à une stimulation des macrophages dérivés de la moelle osseuse des souris CD40-T6<sup>-/-</sup> avec l'anti-CD40 agoniste (FGK45), il y avait une augmentation de l'IL-10 qui coïncide

avec une diminution de l'IL-12 et iNOS. Or, ces études nous démontrent que le rôle de la dyade CD40/CD154 dans l'athérosclérose est fort complexe. En effet, les plaquettes expriment trois récepteurs capables de reconnaître le CD154 ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et le CD40). Des études seront nécessaires pour décortiquer le rôle des récepteurs et leurs interactions ainsi que le rôle du CD40 et l'effet des différentes sous-catégories des macrophages durant les différentes étapes de l'athérosclérose. Finalement, l'infiltration des lymphocytes B et T et les monocytes est un phénomène qu'on retrouve aussi au cours de la fibrose pulmonaire. De plus, le traitement par l'anti-CD154 empêche l'inflammation pulmonaire ainsi que l'établissement de la fibrose [2].

### **1.9.2. Le rôle du CD40 dans l'auto-immunité**

L'auto-immunité représente une défaillance au niveau des mécanismes régissant la tolérance du soi. Elle affecte le mécanisme de la tolérance centrale soit la sélection négative au niveau du thymus et de la moelle osseuse ainsi que le mécanisme de la tolérance périphérique. Par conséquent, les facteurs déclencheurs initiant l'auto-immunité peuvent dépendre de la prédisposition génétique, de la défaillance dans les mécanismes naturels de tolérances ou de facteurs environnementaux comme une infection par exemple [160]. Le fait que le CD40 joue un important rôle dans l'efficacité de la réponse adaptative, lui permet de contribuer de manière significative aux maladies auto-immunes reliées aux cellules T (**Figure 10**). Ainsi, le CD40 est surexprimé sur les cellules présentatrices, lors d'une maladie auto-immune, ce qui contribue à renforcer l'interaction CD40/CD154 (**Figure 10**). Par ailleurs, le CD40 peut contribuer au développement de maladies auto-immunes suite à l'expression anormale de ce dernier sur des cellules n'exprimant pas le CD40. Par exemple, une population de cellules T CD4+ exprimant du CD40 a été découverte dans des modèles de diabètes de type I [11, 14].



**Figure 10: Mécanisme par lequel l'interaction CD40/CD40L pourrait induire l'auto-immunité.**

L'interaction CD40/CD40L pourrait contribuer à l'induction de l'auto-immunité au niveau du thymus, durant la sélection des cellules T, en permettant aux clones de cellules T autoréactives de s'échapper du thymus. De plus, l'induction de l'auto-immunité pourrait se produire au niveau des organes lymphoïdes périphériques lors de l'interaction entre les cellules T et cellules B ou les CPAs. Finalement, au niveau des tissus cibles où la signalisation induite par le CD40 pourrait induire la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Ainsi, ceci aurait pour effet de détruire les tissus ciblés et le recrutement de cellules inflammatoires. *(Figure inspirée de Peters, A.L. et al., 2009)*

### 1.9.2.1. L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie inflammatoire chronique qui induit la destruction des articulations [160]. Ainsi, les cellules du système immunitaire infiltrent la cavité articulaire et provoquent la production de cytokines et chimiokines de type Th-1 et Th-17 [160]. Le CD40 et le CD154 sont impliqués dans l'initiation de l'AR puisque le CD40 est connu pour être amplifié dans les fibroblastes des muscles lisses et les cellules synoviales par les cytokines pro-inflammatoires ( $IFN\gamma$  et  $TNF\alpha$ ) [160]. Le CD40 amplifié peut induire

l'augmentation de la sécrétion d'IL-6, TNF, IL-15, IL-17, IL-8 et MCP-1, ce qui exacerbe les symptômes liés à l'AR [160]. Par ailleurs, il a été relaté que le CD154 est fortement amplifié dans les cellules T du sang périphérique et de la synovie des patients souffrant de l'AR [160]. Ceci augmenterait la production des Igs par les cellules B [160]. L'interaction CD40/CD154 serait impliquée dans l'initiation de l'AR puisque l'utilisation d'un anticorps monoclonal antagoniste, anti-CD154, avant l'induction du modèle de l'arthrite chez la souris (*collagen induced arthritis* (CIA)), aurait bloqué le développement de la maladie [160]. Cependant, l'utilisation de l'anti-CD154 antagoniste ne pouvait pas guérir les souris ayant déjà développé le CIA [160]. Il a été suggéré que l'utilisation d'un anti-CD40 agoniste lors de l'initiation du modèle CIA pouvait aggraver les symptômes de l'arthrite [160]. Il a été récemment démontré qu'un knock-down du gène du CD40 ou du CD80/CD86 à l'aide de petit ARN interférent (petit ARNi) dans cellules dendritiques pulsées avec l'antigène spécifique du collagène introduit chez la souris ne pouvait pas induire le modèle de l'arthrite [161]. Ainsi, il a été démontré que le knock-down du CD40 préviendrait l'initiation du CIA chez la souris grâce à la diminution du TNF $\alpha$  dans le sang, à l'inhibition de la formation de Th1 et Th17 ainsi qu'à l'inhibition de la production d'anticorps spécifique au collagène [161, 162]. Par ailleurs, le knock-down du CD40 pourrait induire la tolérance dans ce modèle puisqu'il provoque l'augmentation des Tregs ainsi que IL-4 [162]. De plus, chez des patients atteints d'AR on a trouvé un polymorphisme associé au CD40 (rs4810485) [163]. Par ailleurs, d'autres locus génomiques ont été associés à l'incidence de l'AR [160].

### **1.9.2.2. Le lupus érythémateux disséminé.**

Le lupus érythémateux disséminé (SLE) est une maladie auto-immune qui est caractérisée par le dépôt d'auto-anticorps contre l'ADN double-brin et autres composantes nucléaires de la cellule dans les petits vaisseaux sanguins [160]. Cette maladie systémique affecte la peau, les articulations, les poumons, le cœur, le cerveau et les reins [160].

Comme pour les autres maladies auto-immunes, le tandem CD40/CD154 semble jouer un rôle important dans la pathogenèse du SLE. En effet, il a été relaté que le CD154 est surexprimé sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que sur les cellules B et les monocytes des patients souffrant de SLE [160]. Par ailleurs, il a été démontré que le CD154 sur les cellules B chez les

patients atteints de SLE est actif, car les cellules B CD154<sup>+</sup> peuvent générer des anticorps spontanément *in vitro* [164]. De plus, une étude portant sur 60 patients atteints de SLE a montré la présence d'une forte concentration du sCD154 biologiquement actif dans le sérum [165]. Le traitement des patients souffrant de SLE par le Rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 provoquant l'élimination des cellules B, a permis une rémission à long terme de quatre patients sur neuf [166]. En plus de cet effet sur les cellules B, les patients traités avaient une baisse de la fréquence des cellules B résiduelles exprimant le CD40, le CD19 et le CD21 ainsi qu'une baisse du TNF $\alpha$  au niveau du sérum et un transfert phénotypique des cellules T vers le Th1 [166]. Les premières études génomiques suggèrent que le polymorphisme du CD40, rs11086998, est surreprésenté dans des populations mexicaines et sud-américaines atteintes du lupus. Les patients de SLE de ces populations ont tendance à souffrir sévèrement des symptômes de la SLE. Par ailleurs, ce polymorphisme du CD40 se traduit en une mutation de la proline 227 du CD40 en une alanine. Il a été démontré *in vitro* que le CD40-P227A résultait en un gain de fonction par rapport au CD40 sauvage. Ainsi, le CD40-P227A est caractérisé par une augmentation de la sécrétion d'anticorps et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ ) [167]. De plus, il a été démontré que le CD40-P227A se liait avec plus d'affinité au TRAF3 conférant à ce dernier un rôle de régulateur positif à l'instar de son rôle traditionnel de régulateur négatif [168]. Malgré la possibilité de lien entre l'incidence de SLE et ce polymorphisme du CD40, ceci n'a pas encore été démontré [160]. Cependant, tout récemment, un lien, entre l'incidence du SLE et la présence du polymorphisme du CD40 qu'on retrouve aussi dans le RA (rs4810485), a été démontré dans les populations turques et grecques [169].

### **1.9.2.3. L'allergie**

L'allergie qui résulte en l'asthme allergique est caractérisée par l'hyperactivité bronchique, une inflammation chronique et l'activation des cellules pro-inflammatoire [170]. Il a été démontré que le CD154 était surexprimé sur les cellules T. Ainsi, le CD154 pouvait interagir avec les fibroblastes bronchiques via le  $\alpha 5\beta 1$  est produire une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6 [170]. Par ailleurs, une autre caractéristique de l'asthme induite par un allergène est l'inflammation pulmonaire qui est due suite à une réponse immunitaire aberrante des cellules T de type Th2 [171]. Le fluide d'un lavage broncho-alvéolaire (BALF) de souris infectées par

les acariens est caractérisé par une concentration élevée d'éosinophiles et de neutrophiles ainsi que la présence de cytokine de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13). De plus, ces souris souffrent d'hyperactivité bronchique. Par ailleurs, les macrophages alvéolaires dans le BALF des souris traitées avec les acariens sont matures puisqu'ils expriment un fort niveau de molécules co-stimulatrices, comme le CD40 et le CD86 [171].

Ainsi, le niveau du CD40 et du CD154 est augmenté lors d'une réaction allergique et de ce fait, le récepteur et le ligand semblent contribuer à l'aggravation des symptômes. En effet, la présence du CD40 dans un modèle d'asthme serait importante pour la survie des éosinophiles [172]. De plus, il a été démontré que le knockdown du gène du CD40 par l'ARNi bloquerait l'allergie [173]. En effet, il a été démontré qu'à l'aide d'un modèle allergique en utilisant l'ovalbumine chez la souris, le knockdown du CD40 diminue son expression sur les DC et les cellules B [173]. Ceci a pour effet de bloquer les fonctions de présentatrice d'antigène des cellules dendritiques [173]. De plus, la diminution du CD40 sur les cellules B affecte négativement la production d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a [173]. La fonction des cellules T est aussi affectée car, il y a une baisse de production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN $\gamma$  [173]. Finalement, comme dans le knockdown du CD40 dans le modèle de l'AR, le knockdown du CD40 dans un modèle allergique coïncide avec la génération de Treg [173]. Par conséquent, il semble que le blocage du CD40 pourrait contribuer aux effets antiallergiques pour de futurs modèles thérapeutiques.

### ***1.10. Le rôle du CD40 dans la mort cellulaire***

Le rôle du CD40 dans la régulation de la réponse immunitaire est évident. Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, l'impact du CD40 se situe au niveau du maintien de la réponse immunitaire, de la prolifération ainsi que de la survie des cellules B. Le CD40 accomplit cette tâche en agissant comme un régulateur de l'induction de la survie ou de l'induction de la mort cellulaire [2]. La mort cellulaire peut être induite à n'importe quel stade du développement cellulaire. De plus, la mort cellulaire est subdivisée en deux catégories soit la nécrose et l'apoptose.

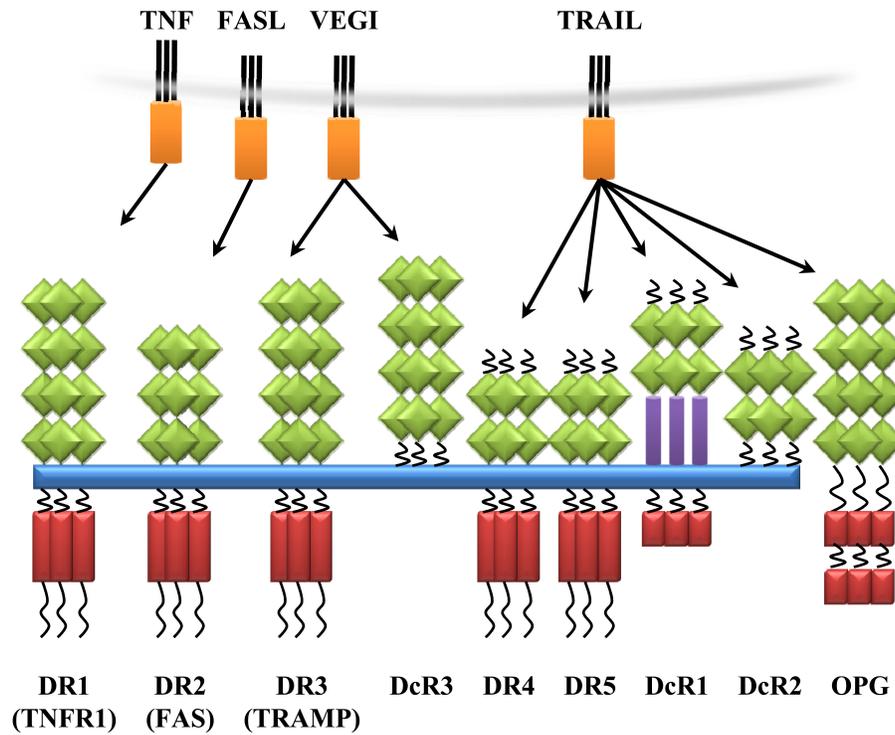
La nécrose est un événement passif et accidentel. La nécrose consiste en une inhibition de la production de l'ATP (adénosine triphosphate) [174]. La nécrose est initiée à la suite d'un gonflement de la cellule et se termine par l'éclatement de la cellule et la libération de débris cellulaires. Comme les débris cellulaires sont phagocytés après l'éclatement de la cellule, ces débris peuvent provoquer une réponse immunitaire [175]. À l'instar de la nécrose, l'apoptose est une mort régulée. Elle est un événement actif puisqu'elle dépend de la présence d'ATP [174]. L'apoptose est formée de plusieurs étapes [176]. Tout d'abord, il y a une fragmentation nucléaire, une dégradation de l'ADN et une condensation de la chromatine. On peut aussi remarquer une contraction cellulaire et un bourgeonnement cellulaire. Au niveau membranaire, il y a l'induction de l'asymétrie de la membrane cellulaire qui représente un marqueur apoptotique. La dernière étape de l'apoptose est la formation de corps apoptotiques qui seront ultimement phagocytés, avant leur éclatement, par les cellules voisines. L'apoptose est un processus qui requiert une induction spécifique soit par un signal intrinsèque soit par un signal extrinsèque [177].

### 1.10.1. L'apoptose

Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, l'apoptose peut être induite d'une manière intrinsèque ou extrinsèque. La manière intrinsèque est initiée suite à divers facteurs provenant de l'environnement de la cellule comme un stress cellulaire (radiation UV, irradiation aux rayons gamma, agent cytotoxique...) ou un manque de facteurs de croissance [177]. Par contre, la voie extrinsèque nécessite une implication directe des récepteurs de la mort cellulaire qui appartiennent à la famille des TNFR, plus précisément à une sous-catégorie possédant un domaine de mort (*death domain*, DD) de 80 aa dans leur région intracellulaire [178].

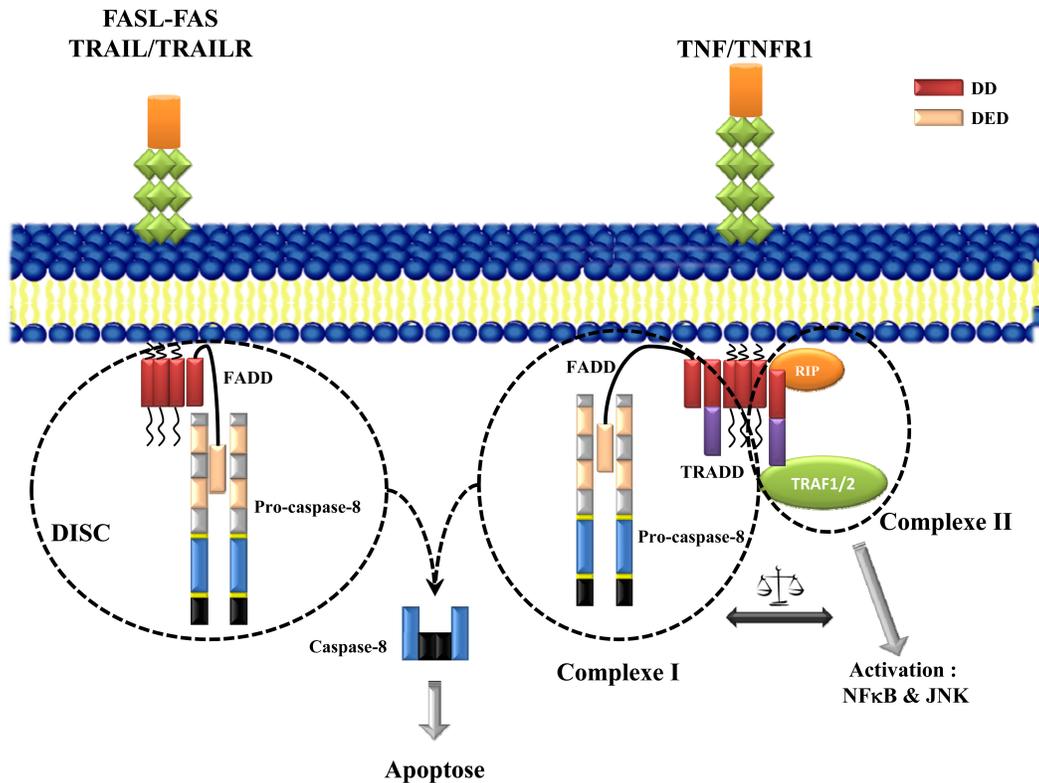
On dénombre huit membres de cette sous-catégorie soit : le TNFR1 (p55TNFR), FAS (CD95), DR3 (*TNF receptor-associated apoptosis-mediated protein* (TRAMP)), DR4 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1* (TRAIL-R1)), DR5 (TRAIL-2), DR6, EDAR (*ectodermal dysplasia receptor*) et NGFR (*nerve growth factor receptor*) (**Figure 11**) [175, 178]. L'association des récepteurs de la mort avec leur ligand respectif induit un réaménagement du récepteur en un homo-trimère [175, 178]. L'initiation de la mort via le FAS, DR4 et DR5 se fait suite à la formation du complexe DISC (*death-inducible signaling*

*complexe*) suite à l'association de ces récepteurs au FAS-associated-death domain (FADD) et le pro-caspase 8 (**Figure 12**). Par contre, les récepteurs restant (TNFR1, DR3, DR6 et EDAR) recrutent le TRADD (TNF receptor-associated death domain) qui forme un complexe avec FADD et pro-caspase 8, le TRADDosome (**Figure 12**) [179]. La signalisation induite par les récepteurs de la mort est fort complexe. Ainsi, le TNFR1 est reconnu pour former deux types de complexe avec le TRADD, le complexe de type I ou le complexe de type II [180]. Le complexe II est le TRADDosome qui induit la mort qui peut être bloquer par l'inhibition de l'activation du pro-caspase 8, car cela favorisera la formation du complexe I [175, 179, 180]. Par conséquent, le complexe I est formé du TRADD, TRAF1/2 et RIP et induit la survie par l'activation du NFκB, de JNK et d'autres facteurs de survie [178, 180]. Le rôle de RIP est divers. Outre son rôle dans la survie, il peut induire la nécrose ou l'apoptose suite à son association avec FAS ou TNFR1 [178, 181]. Une autre manière de réguler l'apoptose est l'utilisation de leurre (*decoy receptor*, DcR). Les DcRs (DcR1, DcR2, DcR3) n'ont pas de région intracellulaire ou ont une forme de DD tronqué [178]. Les DcRs agissent comme un leurre car ils partagent les mêmes ligands que les récepteurs DR3, DR4 et DR5 pour ainsi inhiber l'induction de la mort cellulaire [178]. En somme, l'induction de l'apoptose est extrêmement régulée.



**Figure 11: Les récepteurs de la mort cellulaire appartenant à la famille des TNFR.**

Les différents récepteurs de la mort cellulaire et leurs ligands respectifs. On peut voir la présence de « decoy receptors » (DcR1, 2, 3) qui inhibent la mort cellulaire et qui entrent en compétition avec les récepteurs de la mort (inspirée de *Aggarwal, B.B. 2003*).



**Figure 12: L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose.**

La voie extrinsèque est activée différemment par des récepteurs de la mort cellulaire. Les récepteurs FAS, DR4 et DR5 induisent l'activation des pro-caspase-8 en formant un complexe DISC. D'autre part, les récepteurs TNFR1, DR3, DR6 et EDAR forment un complexe TRADDosome. Or, TNFR1 peut aussi induire l'activation du NFκB et du JNK en formant un autre complexe avec les TRAFs (inspirée Aggarwal 2003).

## 1.10.2. Les organelles impliquées dans la mort cellulaire.

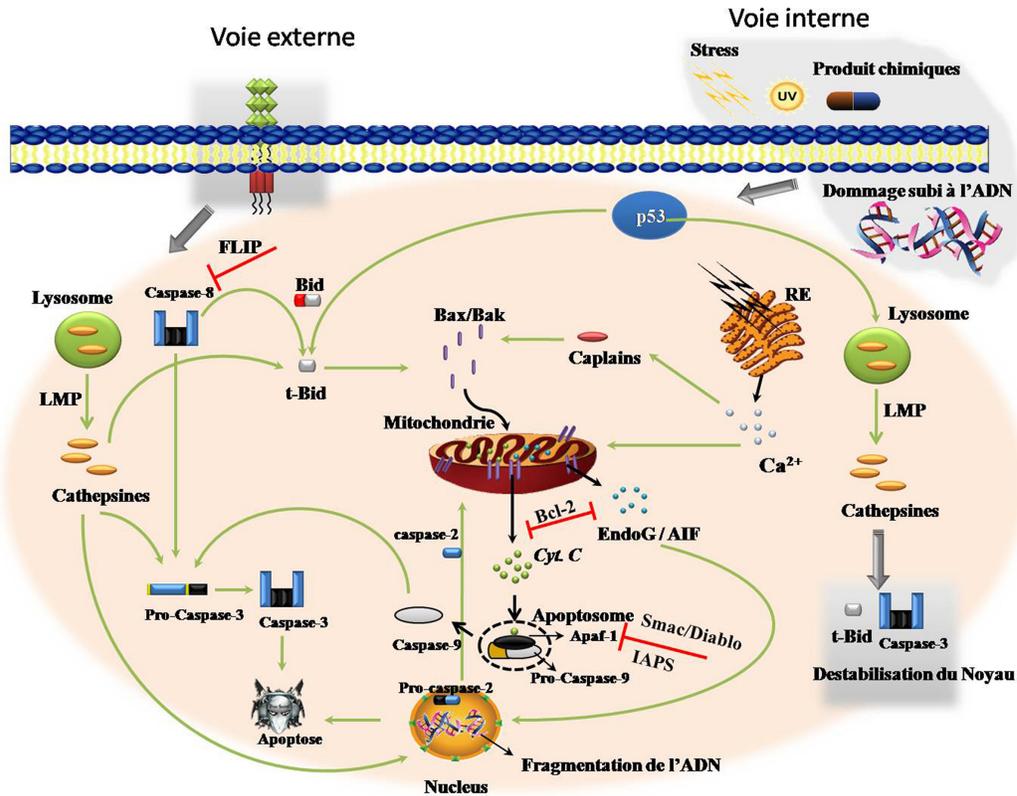
### 1.10.2.1. La mitochondrie

La mitochondrie est une organelle centrale dans l'apoptose puisqu'une des étapes cruciales de la mort cellulaire programmée est la déstabilisation de cette dernière. La perméabilisation de la membrane mitochondriale (PMM) permet la sécrétion de facteurs pro-apoptotiques, caspase dépendante ou indépendante, nécessaire pour la signalisation apoptotique [12, 175]. Suite à un stimulus externe ou interne de la mort cellulaire, il y a une activation des membres de la famille Bcl-2 qui joue un rôle important dans la PMM. La PMM est induite suite à

l'agglomération des membres de la famille des Bax sur la surface de la mitochondrie [12]. L'endonuclease G (EndoG) et l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) libérés, suite à la déstabilisation de la mitochondrie, peuvent induire la mort en s'attaquant au noyau d'une manière indépendante des caspases tandis que la libération du cytochrome C induira la mort d'une manière dépendante des caspases [12, 175]. La mitochondrie n'est pas spécifique à l'apoptose puisqu'elle peut aussi induire la nécrose. En effet, il a été démontré que le recrutement, par les récepteurs de la mort, du *Receptor-interacting protein 1* (RIP1) induit la nécrose dans les cellules T par l'induction du dysfonctionnement de la mitochondrie qui libère les *reactive oxygen species* (ROS) [175]. Or, les ROS produits à l'extérieur de la mitochondrie peuvent induire la déstabilisation de la mitochondrie et mener à induire l'apoptose [182]. Ainsi, une étude a démontré que l'activation d'un marqueur des GCs, le *Centrocyte/Centroblast Marker 1* (CM1), sur les cellules B transformées à l'EBV provoque le réarrangement du cytosquelette qui induit la production de ROS qui seraient responsable du MMP (**Figure 13**) [182].

#### **1.10.2.2. Le lysosome.**

Le lysosome a été longtemps associé à la nécrose. Or, une étude sur le niveau perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) a démontré que l'intensité de cette perméabilisation permet de déterminer le type de mort cellulaire induite. Ainsi, une LMP généralisée provoquerait la nécrose, tandis qu'une LMP partielle induirait l'apoptose [183]. La LMP partielle peut être induite par le BCR ou des récepteurs de la famille du TNFR ou, d'une manière interne, par le p53, la camptothecin ou des oxydants [81, 183]. L'initiation de la mort via le lysosome survient suite à la libération, durant le LMP, des cathepsines, des enzymes protéolytiques (**Figure 13**).



**Figure 13: L'implication des organelles dans l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque ou intrinsèque.**

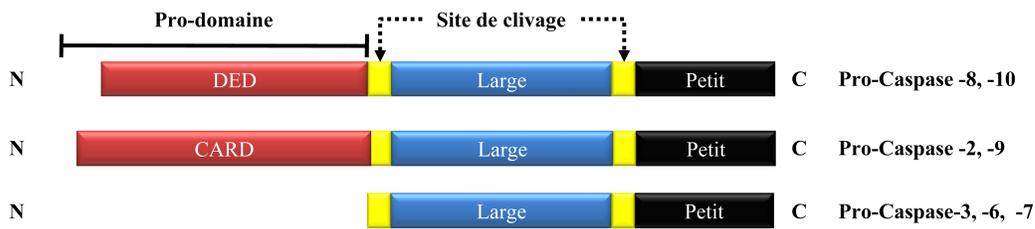
La voie extrinsèque induit l'apoptose en activant directement les pro-caspase-3 ou par le biais de la destabilisation du lysosome et de la mitochondrie. D'autre par, la voie intrinsèque mène à l'apoptose par la destabilisation des organelles telles que le RE, la mitochondrie et le lysosome.

### 1.10.3. Les activateurs de l'apoptose.

#### 1.10.3.1. Les caspases

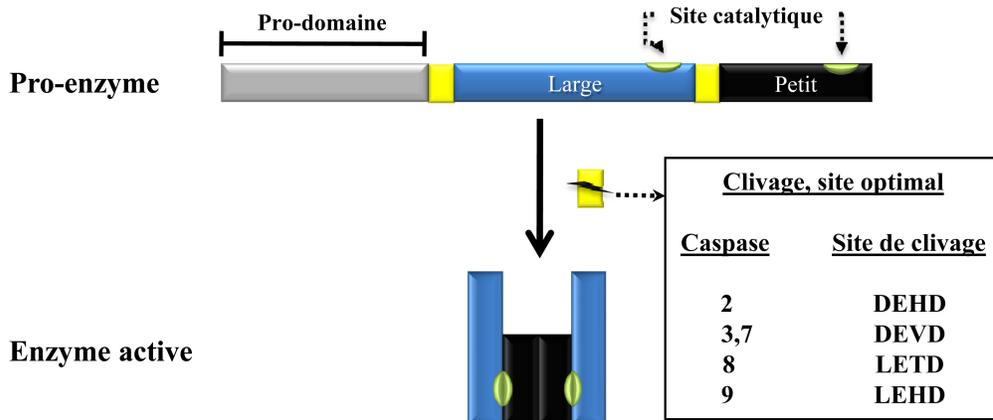
Les caspases sont des protéinases cystéinyl aspartates qui jouent un rôle central durant diverses étapes de l'apoptose. La famille des caspases compte 14 membres subdivisé en deux sous-catégories, les caspases initiateuses et les caspases effectrices [12]. Les caspases sont générées sous une forme inactive, pro-caspase, composée d'un pro-domaine N-terminal, un large domaine et un petit domaine. Les pro-caspases initiateuses (caspases-1,-2,-4,-5,-8,-9,-10 et -12) ont un long pro-domaine qui contient un site d'interaction entre protéines le *death effector domain* (DED) pour les pro-caspase-8 et -10 (**Figure 14**). Par contre, les pro-caspases-2 et -9 contiennent le site *caspase recruitment domain* (CARD) dans leur pro-domaine

(Figure 14). Par conséquent, les domaines DED et CARD sont nécessaires pour l'interaction avec les protéines adaptatrices nécessaires pour l'initiation de la mort cellulaire programmée [81]. Les caspases (caspases-3, -6, -7, -11, et -13) effectrices possèdent un court pro-domaine N-terminal durant la forme pro-caspase, car leur activation ne nécessite pas une association protéique, mais un clivage par les protéines protéolytiques, comme les caspases initiateuses et les cathepsines, au niveau de la cystéine et de l'acide aspartique [12, 175].



**Figure 14: La structure des différentes caspases.**

À l'état inactif, les caspases se retrouvent sous formes non-clivées appelées pro-caspases. Les caspases initiateuses (caspases-2, -8, -9, -10), ont un pro-domaine auquel les protéines adaptatrices vont se lier pour initier la mort. Les caspases effectrices, caspases-3, -6, -7, ont un pro-domaine court (inspirée Kumar 2007).



**Figure 15: Les sites de clivage des différentes caspases.**

Les caspases sous forme inactives (pro-caspase) doivent être clivées pour être actives. Les sites de clivages sont composés de quatre aa.

L'activation de la pro-caspase-8 (FLICE) se fait suite à une activation par la voie extrinsèque. Ainsi, lors de l'association des récepteurs de la mort cellulaire avec leur ligand respectif, il y a un recrutement de la pro-caspase-8, via le site DED dans le pro-domaine, dans complexe DISC ou TRADDosome. La présence du FLICE dans ces complexes induit l'activation de la fonction auto-protéolytique de la caspase-8. La caspase-8 ainsi clivée se réorganise en un tétramère (deux domaines larges et deux domaines petits) et peut induire directement l'activation de la pro-caspase-3 en la clivant directement ou indirectement par l'induction de la MMP. En effet, l'activation de la caspase-8 induit une voie apoptotique qui passe par la mitochondrie [12, 175]. En premier lieu, la caspase-8 induit le clivage du Bid en une forme active, le Bid tronqué (t-Bid) qui provoque l'agrégation de Bak et Bax sur la membrane mitochondriale afin de libérer le cytochrome C suite à la MMP. Une fois sécrété dans le cytosol, le cytochrome C forme, en présence d'ATP, un complexe, l'apoptosome, contenant l'Apaf-1, une protéine adaptative possédant un domaine CARD, et la pro-caspase-9 (**Figure 13**) [12].

L'auto-protéolyse de la pro-caspase-9 en caspase-9 se fait à l'intérieur de l'apoptosome. La caspase-9 induit par la suite le clivage de la pro-caspase-3 en une caspase-3 effectrice qui provoque la mort cellulaire programmée par le biais du clivage de la majorité des substrats cellulaires [81]. Outre son rôle dans la voie extrinsèque, l'activation de caspase-9 joue un rôle angulaire dans l'induction de l'apoptose via la voie intrinsèque dépendante des caspases [12, 175].

### **1.10.3.2. Les cathepsines**

Les cathepsines sont des enzymes protéolytiques principalement localisées dans le lysosome, on dénombre 11 membres de cette famille [184]. Leur rôle principale est le renouvellement des protéines (protein turnover) [184]. Or, les cathepsines B et D, des protéases qui clivent la cystéine et l'acide aspartique respectivement, sont régulièrement impliquées dans la nécrose et l'apoptose. Ainsi, les cathepsines peuvent devenir cytotoxiques et induire une mort nécrotique par le biais de leur fonction exopeptidase non-spécifique [175]. Par contre, dans un environnement à pH neutre, les cathepsines perdent rapidement leur fonction exopeptidase

mais maintiennent partiellement leur fonction endopeptidase, qui est plus spécifique [175]. Par ailleurs, les cathepsines et la caspases en beaucoup de substrats de la mort cellulaire programmée en commun comme les caspases, la poly (ADP) ribose polymérase (PARP), la phospholipase cytosolique A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) [175]. Fait intéressant, l'inhibition des cathepsines peut protéger les cellules de la mort cellulaire programmée dépendante des lysosomes [175, 183, 185].

#### **1.10.4. La régulation de la mort cellulaire par le CD40.**

Tous les membres des TNFRs ne possédant pas de DD, comme le CD40, jouent un rôle majeur ou spécifique pour la promotion de la survie ou la prolifération cellulaire. Or, il est de plus en plus prouvé que certains récepteurs ne se limitent pas à une seule fonction puisque certains peuvent être aussi impliqués dans la mort cellulaire. Ceci est important en raison de leur rôle de régulateur de l'homéostasie [2]. Ainsi, il a été démontré que le TNFR2 peut induire la mort cellulaire quand il est surexprimé à la surface [186]. Cependant, il a été suggéré, selon Grell, M. et al., qu'une implication du TNFR2 dans l'induction de la mort était indirecte [187]. Selon ce groupe, le TNFR2 induisait l'expression du TNF qui en retour s'associait avec le TNFR1 pour induire la mort cellulaire [187]. Ils ont aussi démontré que le CD30 et le CD40 agissaient de façon similaire puisque la combinaison du TNFR2 et du CD40 augmentait de manière synergique la mort cellulaire par le TNFR1. Mais, plusieurs études ont démontré que la mort induite via le CD40 peut être directe.

Ainsi, une des premières études a comparé la mort induite par le CD40, le FAS et le TNFR1 puisque leur homologie structurale et le chevauchement de leurs voies de signalisation suggéraient que le CD40 pouvait agir directement sur la mort cellulaire comme les deux autres récepteurs [188]. Cette étude menée par Hess, S. et al., a démontré que le CD40, le TNFR1 et le CD95 induiraient la mort cellulaire directement et de manière distincte [188]. Par ailleurs, notre laboratoire a démontré que la mort cellulaire induite via le CD40 dans les cellules B transformées à l'EBV était indépendante des caspases et que cette mort était similaire à celle induite par le CMH de classe II [189]. Par ailleurs, la synthèse de protéines *de novo* n'était pas requise pour l'induction de la mort cellulaire par le CD40 [188, 189]. La signalisation qui

régule l'induction de la mort par le CD40 dépend de plusieurs facteurs tels que le type cellulaire et le niveau d'expression par exemple. En effet, il a été démontré que dans les cellules B, le CD40 activait le p38 pour promouvoir la survie cellulaire tandis que l'activation d'ERK pouvait être liée à une réponse apoptotique ou anti-apoptotique [190]. Par ailleurs, il a été démontré qu'un faible niveau d'expression du CD40 favorisait la prolifération cellulaire tandis qu'une forte expression du CD40 serait capable d'induire la mort ou l'arrêt de croissance cellulaire [191]. La mort cellulaire induite par le CD40 pourrait être utilisée aux fins de traitements antitumoraux.

Le CD40 est retrouvé à la surface de plusieurs cellules malignes, comme les lymphomes non hodgkiniens, des leucémies lymphoblastiques et plusieurs carcinomes (du nasopharynx, de la vessie urinaire, du col de l'utérus, des ovaires...) [192]. Par exemple, il a été démontré que le sCD154 recombinant pouvait induire un arrêt de croissance du carcinome du sein et induire l'apoptose dans les tumeurs colorectales exprimant le CD40 [192]. De plus, une étude a démontré une induction de la mort cellulaire par le CD40 passant par l'augmentation de l'expression de Bax lorsque le CD40 s'associait avec une anti-CD40 ou sCD154 recombinant [193]. Par ailleurs, l'utilisation des tumeurs urothéliales comme modèle a démontré que la mort cellulaire induite par le CD40 nécessitait l'activation du JNK et des caspases-3 et -9 [194]. Ceci a été aussi observé dans une lignée cellulaire provenant d'un carcinome de la vessie. En utilisant une forme mutée du CD154 qui serait résistante au clivage, Elmetwali, T. et al., ont démontré que la mort cellulaire induite par le CD154 membranaire passait par l'activation du JNK et la voie mitochondriale de l'apoptose [191]. De plus, cette étude démontre que le TRAF6 par l'activation de l'AKT pourrait bloquer l'apoptose induite par le TRAF3 [191]. Par conséquent, on peut voir une certaine balance entre les deux TRAF pour le contrôle du signal pro-apoptotique vs le signal anti-apoptotique. Cependant, il a été démontré que dans les lymphomes diffus à larges cellules B, l'activation du JNK ne serait pas impliquée dans l'induction de la mort [195]. En effet, Hollmann, C.A. et al., ont démontré que c'est plutôt une activation constitutive d'ERK qui était nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire par le CD40 [195].

L'induction de la mort via le CD40 peut avoir des effets néfastes. Il y a été suggéré que l'induction de la mort par le CD40 pouvait contribuer aux maladies du foie en accentuant l'apoptose des hépatocytes [196]. Ainsi, il a été démontré que le sCD154 provenant de plaquettes pouvait augmenter le niveau de ROS via le NADPH oxydase suite à une stimulation du CD40 sur les hépatocytes, ce qui a pour effet d'induire une apoptose dépendante du ROS [196]. En somme, d'autres études seraient nécessaires pour mieux cerner le rôle du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire programmée. Sachant que l'induction de la mort cellulaire par le CD40 varie selon le type et le niveau d'activation cellulaire, la dissection de la voie de signalisation induisant la mort via le CD40 pourrait mener à l'élaboration de meilleures thérapies qui seront plus efficaces du point de vue spatio-temporel.

### ***1.11. Le CD40 et les traitements thérapeutiques***

L'effet bénéfique du blocage du tandem CD40/CD154, par de petit ARNi du CD40 par exemple, sur la diminution des symptômes des maladies auto-immunes ainsi que le potentiel antitumoral du CD40 via la mort cellulaire font du CD40/CD154 une bonne cible thérapeutique.

Ainsi, il y a eu trois molécules antagonistes anti-CD154 qui ont été générées : le Ruplizumab (anticorps humanisé IgG1, hu5c8), le Toralizumab (anticorps humanisé IgG1, hu24-31) et le ABI793 (anticorps totalement humanisé IgG1) [197]. Les trois molécules étaient capables de bloquer l'association du CD40 avec le CD154, mais le Ruplizumab était aussi capable de réduire le nombre de cellules T [197]. De plus, en phase préclinique, ces trois molécules étaient capables de prolonger la survie des greffes. Cependant en phase clinique, elles représentaient un risque de thrombose ou de thrombo-embolie suite à leur interaction avec les plaquettes [197]. Or comme nous l'avons décrit ci-dessus, le CD40 représente une bonne solution de rechange pour des traitements thérapeutiques. Par ailleurs, les différents anticorps générés contre le CD40 divergent par rapport aux sites de liaison avec le CD40 et peuvent avoir une divergence du point de vue de la fonction (agoniste ou antagoniste) [197]. Les molécules antagonistes, le HCD122 (anticorps totalement humanisé, IgG1) et le ch5D12 (anticorps chimérique IgG4) qui sont en phase clinique I. Ainsi, le HCD122 bloquerait la

survie de la leucémie lymphoïde chronique via le CD154. Le ch5D12 est utilisé contre la maladie de Crohn [197]. Le SGN-40 (Dacetuzumab) est un anticorps IgG1 humanisé provenant du S2C6 mais qui est partiellement agoniste qui est capable d'induire la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps ainsi que l'apoptose. Le Dacetuzumab serait dans la phase clinique I contre la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome non hodgkinien (NHL). Fait intéressant, il a été démontré que le Dacetuzumab peut améliorer l'effet antitumoral du Rituximab (anti-CD20) sur les cellules NHL [198]. Finalement, le CP-870,893 est un anticorps IgG2 humanisé agoniste qui peut activer la présentation antigénique puisqu'il augmente le niveau d'expression du CMH de classe II, du CD54, du CD86 et du CD23 [197]. De plus, il induit l'amplification de la sécrétion de cytokine (IL-12, IL-23, IL-8) [199]. Par ailleurs, il a un énorme potentiel anti-tumoral car il peut induire la mort de cellules tumorales de lymphome de cellule B, du sein, du côlon et de la prostate [199]. De plus, le CP-870,893 est aussi efficace sur les tumeurs expriment faiblement le CD40 [199]. Par ailleurs, le CP-870,893 est en phase clinique I contre les tumeurs solides avancées [197]. Cependant, puisque le CP-870,893 est un agoniste, il peut induire des effets secondaires comme l'élévation du niveau de transaminases dans le sérum du foie [197]. Ceci fait en sorte que son usage est limité et ne peut être utilisé en grande dose. En somme, il y a l'utilisation du CD40 dans les traitements thérapeutiques peut être bénéfique. Car, le ciblage du CD40 nous apporte beaucoup d'options en créant des anticorps agonistes, antagonistes ou partiellement agonistes. De plus, un traitement du CD40 peut être utilisé en bi- ou trithérapie pour augmenter l'efficacité du traitement et diminuer les effets secondaires.

### ***1.12. L'hypothèse et les objectifs de travail***

L'importance de l'interaction CD40/CD154 dans la réponse immunitaire, le traitement des maladies auto-immunes ainsi que son rôle direct dans l'immunothérapie via l'apoptose dans certain cas de cellules cancéreuses ou un rôle indirect en activant les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui augmentent l'efficacité de l'activité des cellules T cytotoxiques [200], fait en sorte que l'anti-CD40 est considérée comme un des quatre agents sur les vingt existants [(1) IL-15, (2) anti-PD1 et/ou anti-B7- H1 (PD-1L), (3) IL-12, (4) anti-CD40 et/ou CD40L, (5) IL-7, (6) CpG, (7) 1MT, (8) anti-CD137 (anti-41BB), (9) anti-TGF- $\beta$ , (10) *anti-IL-10 receptor*

ou anti-IL-10, (11) Flt3L, (12) *anti-glucocorticoid-induced TNF receptor* (GITR), (13) CCL21 adenovirus, (14) MPL, (15) PolyI:C et/ou PolyICLC, (16) anti-OX40, (17) anti-B7-H4, (18) resiquimod et/ou852A, (19) *LIGHT* et/ou *LIGHT vector* et (20) *anti-lymphocyte activation gene-3* (LAG-3)] ayant un potentiel de devenir une réelle thérapie antitumorale [200, 201]. Jusqu'à présent, l'ensemble des études s'est focalisé sur le couple CD40/CD154, pour le développement d'anticorps monoclonaux, sans tenir compte de la spécificité fonctionnelle du CD40 homodimérique versus la forme monomérique pour ainsi augmenter l'efficacité de ces anticorps. Suite à la découverte du CD40 sous forme homodimérique dans des cellules malignes, nous avons récemment montré, en concordance avec d'autres observations antérieures, que l'engagement du CD40 sur les cellules B par le CD154 est capable de former du db-CD40, qui est important pour la phosphorylation de l'Akt, par le biais d'une cystéine à la position 238 de la queue cytoplasmique [97, 99]. Cependant, le rôle du db-CD40 dans la phosphorylation de l'Akt a été observé suite à l'abolition du db-CD40 par un procédé chimique. De plus, nous avons démontré que l'homodimérisation du CD40 était importante pour la signalisation bidirectionnelle au cours de l'interaction des APC avec les cellules T [99]. Ce qui a pour effet de produire IL-8 dans les APC et l'IL-2 dans les cellules T. Par ailleurs, durant cette étude, il nous a été possible de suggérer que le db-CD40 nécessitait la présence de ROS ainsi que les LR seraient la plateforme nécessaire pour la formation du db-CD40. À la lumière de ces observations, nous avons émis comme hypothèse que la formation du db-CD40 se fait dans les radeaux lipidiques et nécessite la présence de ROS. De plus, cette homodimérisation du CD40 est essentielle pour l'induction de certaines réponses biologiques. Ainsi le db-CD40 affecterait l'induction de la mort cellulaire et l'activation des APCs.

Pour répondre à ces hypothèses, nos objectifs sont :

- I. Étudier le rôle du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire.
  - a. Démontrer l'effet de l'abolition de l'homodimérisation du CD40 sur l'induction de la mort cellulaire.
  - b. Identifier les membres de la famille des TRAFs impliqués dans la mort cellulaire induite par le CD40 dans notre système cellulaire.
  - c. Identifier le rôle joué par des protéines protéolytiques, telles que les cathepsines, et les organelles impliquées dans l'induction de la mort via le CD40.

- II. Étudier l'implication de la localisation du CD40 dans les radeaux lipidiques sur la réponse biologique.
  - a. Déterminer la signalisation requise pour la translocation du CD40 dans les radeaux lipidiques.
  - b. Identifier les voies de signalisation induite suite à la translocation du CD40 dans les radeaux lipidiques.
  - c. Démontrer l'impact de la translocation du CD40 dans les radeaux lipidiques sur la réponse biologique.
  
- III. Étudier la formation du db-CD40 homodimère.
  - a. Déterminer le rôle du ROS dans la formation du db-CD40 homodimère.
  - b. Évaluer l'impact du db-CD40 homodimère sur la production de ROS.
  
- IV. Étudier le rôle du db-CD40 homodimère dans l'induction de réponses biologiques.
  - a. Identifier les voies de signalisation induite suite à l'homodimérisation du CD40.
  - b. Déterminer l'impact de l'homodimérisation du CD40 sur l'activation des APC.
  - c. Déterminer l'impact de l'homodimérisation du CD40 sur la réponse immunitaire innée.

**Chapitre 2. Le recrutement du TRAF6 est requis pour  
l'induction de la mort cellulaire par le CD40**

## ***2.1. Mise en contexte***

Le CD40 joue un important rôle dans la régulation de la survie cellulaire et de l'induction de la mort cellulaire. Comme nos récentes études ont démontré l'importance du CD40 homodimère dans l'activation de l'AKT, un signal de survie, il fallait déterminer le rôle de l'homodimérisation du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire. Par ailleurs, la détermination du mécanisme de la régulation de la mort cellulaire induite par le CD40 sera bénéfique pour l'amélioration des traitements antitumoraux. En effet, plusieurs études sont en train de démontrer la synergie qui existerait entre l'induction de la mort cellulaire par le CD40 et le Rituximab (anti-CD20 chimérique) pour mieux éliminer les cellules B pour éradiquer les symptômes de l'arthrite rhumatoïde.

## ***2.2. Contribution des co-auteurs***

**Malek Jundi:** La planification et la réalisation des expériences reliées à la mort cellulaires (figure 1 à 6) et la signalisation intracellulaire. Ainsi que la rédaction et la correction de l'article.

**Amal Nadiri:** La planification et la réalisation des expériences reliées à la génération des mutants utilisés dans ce papier. Ainsi que la rédaction et la correction de l'article.

### ***2.3. Résumé***

L'interaction CD40/CD40L est importante pour l'induction de la survie des cellules B. Or, plusieurs études ont démontré que le CD40 pouvait induire spécifiquement la mort cellulaire par apoptose dans les cellules tumorales. Selon nos études antérieures, la mort cellulaire induite par le CD40 serait indépendante de l'activation des caspases et ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines. Sachant que la signalisation induite par le CD40 requiert une association avec différentes protéines adaptatrices, comme les membres de la famille des TRAFs, notre objectif était de démontrer le mécanisme par lequel le CD40 pouvait induire la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent que la mort induite par le CD40 nécessite la perméabilisation du lysosome afin de permettre la diffusion de la cathepsine B dans le cytoplasme. De plus, la formation de CD40 homodimère, un phénomène nécessaire pour l'induction de certains signaux nécessitant le CD40, réduirait significativement l'induction de la mort cellulaire par le CD40. Par ailleurs, en utilisant des cellules HEK293 exprimant des formes mutées du CD40 incapable de se lier aux TRAFs, nous avons observé que l'induction de la mort par le CD40 était indépendante de son association avec les TRAF2 et TRAF3. Cependant, cette induction de la mort par le CD40 nécessiterait une association avec le TRAF6. En somme, nos résultats permettront l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour les traitements antitumoraux.

## **CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment**

Malek Jundi<sup>1\*</sup>, Amal Nadiri<sup>1\*</sup>, Loubna Al-Zoobi<sup>1</sup>, Ghada S Hassan<sup>1</sup>, Walid Mourad<sup>1§</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, CHUM, Département de Médecine, Université de Montréal, Qc. H2L 4M1, Canada.

\* Authors have equal contribution in this work.

§ **Correspondence:** Walid Mourad, Ph.D.; Mailing Address: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, St-Luc Hospital, Pavillon Edward Asselin, 264 Blvd René Lévesque East, Montreal, QC, H2X 1P1, Canada. Tel.: 514-890-8000 Ext : 35287; Fax : 514-412-7314;

Immunobiology. 2012 Mar;217(3):375-83. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.007.

**Short title: TRAF6 in CD40-mediated cell death.**

**Key words:** CD40, cell death, lysosomes, signaling, TRAFs.

Abbreviations: AO, acridine orange; AP-1, activator protein-1; APCs, antigen presenting cells; AV, annexin V; db, disulfide bond; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Jak3, Janus kinase 3; JNK, c-Jun NH2-terminal kinase; LMP, lysosomal membrane permeabilization; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NAC, N-acetyl-L-cysteine; NFκB, nuclear factor kappa B; PI, propidium iodide; PI-3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ROS, reactive oxygen species; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TNFR, tumour necrosis factor receptor; TRAF, TNFR-associated factor.

## **Abstract**

CD40 has an important role in T cell-B cell interaction which rescues B lymphocytes from undergoing apoptosis. However, various studies have demonstrated that CD40 can also play a direct role in the induction of specific cell death and thus in the inhibition of tumour cell proliferation. Our previous studies showed that CD40-mediated cell death was independent of caspases and required no *de novo* protein synthesis. Knowing that CD40 signaling is mediated by its association with several intracellular effectors, including members of TNFR-associated factors (TRAF) family, the goal of the present study is to investigate the mechanisms involved in the induction of cell death by CD40. Our data reveals that CD40-mediated cell death required lysosomal membrane permeabilization and the subsequent cathepsin B release. In addition, CD40 homodimer formation, a phenomenon known to be necessary for some CD40-mediated signals, was shown to negatively regulate cell death induced by CD40. Moreover, using HEK293 cells ectopically expressing CD40 deficient in TRAF binding, we showed that CD40-mediated apoptosis occurred in the absence of TRAF2 and TRAF3 association, but was significantly reduced when CD40 was deficient in its TRAF6 binding. Therefore, by outlining the role of lysosomal pathways and intracellular effectors, namely TRAF6 in CD40-mediated cell death, our study identifies new targets for anti-cancer therapy.

## **Introduction**

CD40, a member of the tumour necrosis factor receptor (TNFR) family, plays an important role in the regulation of the immune response. It was initially thought that CD40 is only expressed on B cells. Engagement of CD40 by its ligand CD154 initiates signals in B cells that contribute to cell proliferation, differentiation, isotype switching, enhanced antigen presentation, and other events necessary for an efficient humoral immune response (Bishop and Hostager, 2003). It is now well established that CD40 is also expressed on all antigen presenting cells (APCs) as well as on a variety of non-lymphoid cells (Dugger et al., 2009), and is implicated in many autoimmune and inflammatory diseases (Hassan et al., 2009). In non-lymphoid cells, CD40 ligation was shown to promote growth of fibroblasts, angiogenesis and intrahepatic endothelial proliferation (Ahmed-Choudhury et al., 2003; Yellin et al., 1995). In addition, CD40 was shown to be expressed on many malignant cells such as non-Hodgkin's lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, and carcinoma (Eliopoulos and Young, 2004). Given these findings, a role for CD40 in tumour formation has been suggested. In parallel to its role in cell proliferation, a role for CD40 in inhibiting tumour growth has been also demonstrated. Indeed, CD40 stimulation was efficient as an anti-tumour therapy in murine models of B-cell lymphoma and breast cancer (Gomes et al., 2009; Honeychurch et al., 2003; Law and Grewal, 2009).

Like other TNFR family members, CD40 lacks intrinsic enzymatic activity and must therefore recruit cytoplasmic molecules to mediate signal transduction (Bishop and Hostager, 2003). Several studies have shown that engagement of CD40 leads to rapid recruitment of TNFR-associated factors (TRAF) molecules from the cytoplasm to the receptor's cytoplasmic domain. Association of TRAF1, TRAF2, TRAF5, and TRAF6 are positive regulators of CD40

signaling, while TRAF3 may be a negative regulator (Hauer et al., 2005). The role of Janus kinase 3 (Jak3) in CD40-mediated signaling has been investigated showing that Jak3 is constitutively associated with CD40, and that stimulation via CD40 induces tyrosine phosphorylation and activation of Jak3 which acts on the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Hanissian and Geha, 1997).

Once associated with CD40, at least some members of the TRAF family mediate the activation of important transcriptional regulators including nuclear factor kappa B (NFkB) and the mitogen-activated protein kinases (MAPK). NFkB activation by CD40 stimulation has been extensively studied and is generally associated with cell survival (Gerondakis and Strasser, 2003). In contrast, MAPK activation may have proliferative or apoptotic effects depending on the stimulus and the cell type. In general, activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) is associated with survival, whereas activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 tends to promote apoptosis (Franklin and McCubrey, 2000). In B lymphocytes, p38 activation were shown to promote CD40-induced cell proliferation, whereas ERK activation could be associated with both apoptotic and anti-apoptotic effects (Craxton et al., 1998; Gauld et al., 2002). In addition, the effects of CD40 ligation depend on the level of CD40 expression at the surface and the intensity of CD40 engagement. Indeed, low levels of CD40 were reported to promote cell proliferation and differentiation, whereas at high levels, CD40 was shown to induce cell cycle arrest and cell death (Elmetwali et al., 2010). Moreover, in murine fibroblasts, CD40-mediated cell death was found to be FAS-independent (Funakoshi et al., 1994; Hess and Engelmann, 1996), caspases-independent and not to require new protein synthesis (Leveille et al., 1999b). One of the caspase-independent cell death pathways relies on lysosomal membrane permeabilization (LMP) and mitochondrial injury (Boya and

Kroemer, 2008). The degree of LMP may dictate the type of cell death that will be initiated. Hence, a limited rupture of lysosomes releases a low amount of lysosomal enzymes into the cytoplasm, which is followed by apoptotic death. Elucidation of the mechanisms involved in CD40-mediated cell death may help to identify proteins that specifically control the apoptotic arm of CD40 signaling. Data presented in the current investigation demonstrates that CD40-triggered cell death seems to be mediated by a reactive oxygen specie (ROS)-dependent LMP phenomenon, leading to the release of cathepsin B in the cytosol. In addition, we report herein that CD40 homodimer formation, a phenomenon shown to be required for some CD40-mediated signals, downregulates the apoptotic function of the receptor. More importantly, our study demonstrates that CD40-mediated cell death is dependent on TRAF6 association with the receptor.

## **Materials and methods**

### **Cell lines, culture and antibodies**

Burkitt lymphoma Raji and HEK 293 cell lines were obtained from the ATCC (Manassas, VA). Cells were cultured in RPMI 1640 or DMEM supplemented with 5% heat-inactivated FBS and penicillin/streptomycin/glutamine (Life Technologies, Gibco/BRL, Burlington, ON). Anti-CD40 monoclonal antibody (mAb) G28-5 and anti-MHC class I mAb W6/32 were purified from hybridoma culture supernatants by using a Protein G Sepharose column (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Acridine Orange (AO) (Invitrogen Life Technology, Burlington, ON) was used for lysosomal membrane permeabilization analysis. *N-acetyl-L-cysteine* (NAC), a ROS scavenger (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), Cathepsin B inhibitor (CA-074ME), general Cathepsin inhibitor (Z-FA-FMK), Propidium Iodide (PI) (Invitrogen Life Technology, Burlington, ON) and Annexin V (Trevigen, Gaithersburg, MD) were used for cell death acquisition following the manufacturer's instructions. Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (ser-32), total I $\kappa$ B $\alpha$  antibodies (Cell Signaling, Beverly, MA), and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) were used for immunoblotting.

### **CD40 stimulation and assessment of cell death**

Raji cells were resuspended at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI supplemented with 5% FBS. Aliquots (100  $\mu$ l/well) of cell suspensions were transferred to U-bottom shaped 96-well plates and treated with G28-5, a monoclonal antibody for CD40 or with anti-MHC-I mAb W6/32 as an isotype control in a total volume of 200  $\mu$ l/well for the indicated time points.

HEK 293 cells were plated in flat-bottom 96 well plates at a final concentration of  $1 \times 10^5$  cells/ml with anti-CD40 G28-5 mAb, in a total volume of 200  $\mu$ l of complete DMEM medium, at 37°C overnight. Cells were washed with PBS and stained for cell death. Briefly, cells were extracted and incubated with PI (1  $\mu$ g/ml) for 10 minutes on ice or treated with Annexin-V (2  $\mu$ l/sample) and PI (1  $\mu$ l/sample) following the manufacturer's instructions before acquisition by FACScan.

### **cDNA Cloning of CD40, CD40 mutants**

For human CD40WT, CD40-C238A and CD40-T234A, cDNA were cloned as described previously (Girouard et al., 2005; Reyes-Moreno et al., 2007). The other mutations affecting TRAF binding in the cytoplasmic domain of hCD40 were generated using the Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). PCR-directed mutagenesis was used for the construction of CD40 mutants. Thus, P207A (JAK3) (Hanissian and Geha, 1997), EEAA (TRAF6) (Jalukar et al., 2000), and Q243A (TRAF3) (Hauer et al., 2005) CD40-mutants were PCR amplified using oligonucleotides primers containing appropriately positioned point mutations and pCDNA3.1hCD40.Hyg as a template. The PCR product was inserted into pCDNA3.1. DNA sequencing confirmed that all PCR products were free of any undesired mutations. The plasmids I $\kappa$ B $\alpha$ WT and I $\kappa$ B $\alpha$ -Dominant negative (DN) were a gift from Dr. Annette C. Hollmann (McGill University). The pcDNA 3.1 empty vector-transfected cells were used as control. The transfections were done by calcium phosphate precipitation. Prior to transfection,  $1 \times 10^6$  of HEK293 cells were seeded on the 10 cm culture plate for 24 h. Then, cells were stably selected in the presence of hygromycin (400  $\mu$ g/ml, (Wisent, St-Bruno, QC)). For transient transfection assays, HEK 293 cells were analyzed 48 h post-transfection.

### **CD40 staining using Flow Cytometry**

Cells were harvested and incubated with anti-CD40 mAb G28-5 (1µg/100 µl) for 30 min on ice. After incubation, cells were washed with ice-cold PBS and incubated with Alexa fluor-488-conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen). Viable cells were gated by light scatter and were analyzed by FACScan (BD Biosciences, Mississauga, ON) using a Cell Quest program (BD Biosciences).

### **Lysosomal membrane permeabilization (LMP) analysis**

After incubation with anti-CD40, G28-5, overnight, cells were stained with Acridine Orange (5µg/ml) in complete media for 15 min at 37°C. Then, cells were washed twice with ice-cold PBS containing 2% FBS. At low pH environment inside the lysosome, Acridine Orange (AO) will emit a red fluorescence. However, during lysosomal membrane permeabilization, AO will diffuse into the cytoplasm (high pH) thus emitting a green fluorescence. We analyzed the percentage of cells showing a decrease of granular red fluorescence due to LMP by FACScan and Cell Quest program.

### **Immunoblotting**

After stimulation, samples were diluted 1:2 in 2x SDS sample buffer under reducing conditions (with β-mercaptoethanol, (Sigma-Aldrich), 2mM orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), and protease inhibitor (Roche tablets (Roche, Laval, QC)). The samples were boiled for 5 min and resolved by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). After blocking with 5%

skim Milk, 0.1% Tween-20 in PBS, the membranes were probed with phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (ser-32), or I $\kappa$ B $\alpha$  antibodies (1:1,000 in 5% BSA) O/N at 4°C then followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG Ab (1:10,000) for 1 h at room temperature and were visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (GEHealthcare Bioscience Inc., Piscataway, NJ). The membranes were probed and reblotted with total I $\kappa$ B $\alpha$ .

### **Statistical analysis**

Student *t-test* was used for statistical analysis, \*\*  $p < 0.05$  was considered significant (GraphPad Prism), and data are shown as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### CD40 stimulation induces lysosomal membrane permeabilization

We first assessed the sensitivity of Raji B cell line to CD40-mediated cell death using anti-CD40 antibodies which have been used successfully to induce cell death in various cell types expressing CD40 (Leveille et al., 1999b). As shown in Figure 1A, treatment of Raji cells with G28-5 anti-CD40 monoclonal antibody induced time-dependent cell death as evaluated by PI uptake. CD40-mediated cell death didn't show a significant increase between 2hrs and 7hrs of stimulation. In a second set of experiments, we wanted to examine the signals involved in CD40-mediated cell death. Reactive oxygen species (ROS), an important mediator of cell-death via many cell surface receptors, could be produced by cross-linking surface receptor CD40 in murine B cells (Lee, 2003). Therefore, in this study, we investigated the involvement of ROS in CD40-mediated cell death. Proximal events induced by CD40 were inhibited after the pre-incubation of Raji cells with an antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) known as a ROS scavenger. Thus, we were able to rescue Raji cells from CD40-mediated cell death after NAC treatment (Fig. 1B), suggesting that CD40-induced ROS production may play a role in CD40-mediated B cell death.

In addition, the production of intracellular mediators such as ROS, which have limited range of activity, may induce the permeabilization of lysosomal membranes. The enlargement of the lysosomal compartment and the subsequent lysosome membrane permeabilization (LMP) are hallmarks of cytoplasmic cell death (Ivanov et al., 2009). To further characterize the involvement of lysosomes in CD40-induced cell death, cells were pretreated with acridine orange (AO) to label the lysosomes followed by stimulation with anti-CD40. AO at acidic pH fluoresces in red, whereas its leakage from the lysosomes into the more neutral pH of the

cytosol results in green fluorescence. Decreased red fluorescence (FL3) was observed in approximately 30% of the cells 7hrs after G28-5 treatment compared to 4% in the samples treated with the isotype control (Fig. 1C). Non-stimulated Raji cells were used for gating purposes. In order to confirm that LMP was indeed occurring, we studied the effect of lysosomal enzymes released upon LMP on CD40-mediated cell death. Cathepsins are lysosomal proteases that remain active at neutral pH and therefore have been implicated in cell death. These proteases activate apoptotic effectors such as mitochondrial injury and/or caspases. To determine if these lysosomal products are playing a role in cell death induced via CD40, we first pre-treated Raji cells with zFA-Fmk, a cysteine protease inhibitor, which can also act as a general cathepsin inhibitor. As shown in Figure 1D, the general cathepsin inhibitor was able to reduce the cell death induced via CD40 by 61%. This prompted us to further elaborate into the involvement of specific cathepsins in our system. Hence, we used CA-074ME, a cathepsin B specific inhibitor, which abrogated by 45.6% the level of cell death induced by CD40 (Fig. 1D).

Taken together, these results show that CD40-mediated cell death required a ROS-dependent release of the lysosomal enzymes, especially cathepsin B, into the cytoplasm. Moreover, our data suggest that CD40-mediated cell death was similar in both HEK 293 cells and Raji B cells since CD40 induced ROS production and LMP in both cell types (Fig. 1E, F).

### **Cytoplasmic domain of CD40 is crucial for the induction of cell death**

CD40 cytoplasmic tail is crucial in CD40-mediated signaling. To determine its implication in our system, we generated HEK 293 expressing a human CD40 lacking its cytoplasmic domain. Similar levels of CD40 expression were exhibited in cells transfected with human

truncated CD40 (hCD40- $\Delta$ ) or with human CD40 wild type (hCD40WT) (Fig. 2A). CD40 engagement in 293 cells stably expressing CD40WT induced apoptosis as shown by AV/PI staining and FACS analysis (Fig. 2B). On the other hand, cells expressing CD40- $\Delta$  exhibited no cell death upon their stimulation with anti-CD40 mAb (Fig. 2B). Indeed, even high doses of the anti-CD40 mAb were unable to induce apoptosis in HEK293 expressing hCD40- $\Delta$  cells. These results emphasize the importance of CD40 cytoplasmic tail in CD40-induced cell death.

### **CD40-mediated cell death is NF $\kappa$ B- independent**

Upon ligation, CD40 receptor will lead to the activation of the NF $\kappa$ B pathway (Hostager et al., 2000), a signal implicated in cell survival. However, Fotin-Mleczek et al. showed that CD40 could negatively regulate the NF $\kappa$ B pathway activation via the recruitment of TRAF1 (Fotin-Mleczek et al., 2004). In order to determine if the cell death induced in HEK 293 ectopically expressing hCD40WT was due to a survival inhibition through NF $\kappa$ B inhibition, we examined the activation of NF $\kappa$ B pathway following CD40 engagement. To address this question, we generated HEK 293 cells coexpressing hCD40WT with I $\kappa$ B $\alpha$  WT, I $\kappa$ B $\alpha$ -Dominant Negative (DN) or Mock. Similar levels of CD40 expression were exhibited in these cotransfected cells (Fig. 3A). CD40WT/I $\kappa$ B $\alpha$  WT cells stimulated with anti-CD40 exhibited a more important increase of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation as compared to CD40WT/Mock cells (Fig. 3B). Such phosphorylation was abolished in cells expressing I $\kappa$ B $\alpha$ -DN (Fig. 3B). Furthermore, nor the overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$ -WT or the I $\kappa$ B $\alpha$ -DN affected cell death induced upon CD40 stimulation (Fig. 3C). These results show that CD40 engagement induces NF $\kappa$ B activation

rather than inhibition, and that such phenomenon is not implicated in CD40-mediated cell death.

### **The formation of CD40 homodimer downregulated apoptosis**

We recently demonstrated that B lymphocytes and several B cell lines constitutively express low levels of disulfide-bond CD40 (db-CD40) homodimer, and ligation of CD40 on cell surface with its natural ligand, CD154, or cross-linked Ab leads to significant and rapid formation of db-CD40 homodimer. Such homodimer formation is an absolute requirement for some but not all CD40-mediated signals (Reyes-Moreno et al., 2004). Therefore, we wanted to determine the role of CD40 homodimer in cell death induced by this receptor. To address this question and given our previous finding that CD40 homodimer formation is dependent upon the cytoplasmic cysteine at position 238, we used HEK 293 cells ectopically expressing either hCD40WT or CD40 containing a mutation converting cysteine 238 to alanine (hCD40-C238A; incapable of forming homodimers). Levels of CD40 expression were similar in cells transfected with mutant CD40 or with CD40WT (Fig. 4A). These cells were stimulated with anti-CD40 mAb. Results show that engagement of hCD40-C238A, not capable of forming homodimers, induced a more pronounced cell death compared to hCD40WT (Fig. 4B). These data indicate that CD40 homodimerization is a negative regulator of the apoptotic role of CD40.

### **Recruitment of TRAF6 and not TRAF2 or TRAF3 is required for CD40-mediated cell death**

CD40 downstream signaling required TRAFs binding as well as the recruitment of a tyrosine kinase Jak3 which is constitutively associated with the intracellular domain of CD40. This interaction required a proline-rich sequence in the membrane proximal region of CD40 (Hanissian and Geha, 1997). To determine the role of Jak3 as well as TRAFs association in our model, we generated cells expressing CD40 mutated in Jak3 binding domain (hCD40-P207A) and cells expressing CD40 depleted in TRAFs association box (hCD40- $\Delta$ TRAFs). Levels of CD40 expression were similar in cells transfected with hCD40-P207A, hCD40- $\Delta$ TRAFs, or with CD40WT (Fig. 5A). Our results show that a defect in Jak3-binding did not reduce apoptosis in cells stimulated with anti-CD40 mAb; however, CD40-mediated cell death was significantly reduced in the absence of the TRAFs binding domain (Fig. 5B). Thus, the CD40 cytoplasmic domain especially the TRAFs binding box is required for CD40-mediated cell death.

In order to identify which adaptor molecule or member of the TRAFs family is implicated in CD40-mediated cell death, we introduced a single or double point mutation in the cytoplasmic tail of CD40 corresponding to the different binding domains of TRAF2/TRAF3 (T234A), TRAF3 (Q243A) and TRAF6 (EE-AA). Levels of CD40 expression were similar in cells transfected with mutant CD40 or with CD40WT (Fig. 6A). Results show that CD40-EEAA cells (lacking the binding residues to TRAF6) exhibited a reduced cell death downstream of CD40 (Fig. 6B). On the other hand, apoptosis was still induced via CD40 in cells expressing CD40 mutated in TRAF2/TRAF3 (T234A) or TRAF3 (Q243A) binding site (Fig. 6B). These findings demonstrate that cell death induction via CD40 depends on the association of CD40 with TRAF6.

## Discussion

In the current study we investigate the role of CD40 in cell death and the mechanisms implicated in such a phenomenon. Our data reveal that cross-linking CD40 initiates lysosomal membrane permeabilization which gives rise to a Cathepsin B release resulting in apoptosis. CD40 homodimerization reported to be essential for some CD40-mediated signals (Reyes-Moreno et al., 2004; Reyes-Moreno et al., 2007), is herein shown to downregulate the apoptotic effect of CD40. In addition, our current results demonstrate that CD40-mediated cell death requires TRAF6 association and is affected by neither Jak3 nor TRAF2/TRAF3 binding.

Similarly, Ivanov et al. recently demonstrated the implication of a generalized lysosomal swelling and rupture in Raji cells, after treatment with either anti-CD20 or anti-HLA-DR mAbs, which resulted in the release of Cathepsin B. The authors also suggested that CD20 and HLA-DR mAbs mediated cytoplasmic cell death in Raji was caspase-independent but required the maintenance of integrity of the cytoskeleton (Ivanov et al., 2009). The same mechanism was proposed for CD40-induced cell death in Raji cells (Leveille et al., 1999b). Moreover, CD20 and CD40 could be physically coupled, suggesting that this physical coupling could lead to a cross-talk in signaling pathways (Leveille et al., 1999a). In addition, an increased inhibition of proliferation of human B cells was induced following the simultaneous induction of CD40 and other surface receptors such as CD20 (Benoit and Wade, 1996). Hence, we can propose that CD40 could synergise with other receptor molecules like CD20 in inducing cell death on B cells. In addition, tumour-infiltrating lymphocytes may use this mechanism to eliminate some tumour cells *in vivo* (Hess and Engelmann, 1996). Thus, the above proposed correlation between the B cell activation or/and transformation status and the

CD40 signaling leading to the activation of cell death program is possible, and indeed may highlight a physiological relevance for this form of LMP-dependent cell death.

Lysosomal membrane permeabilization could be induced by intracellular mediators, such as ROS (Jaattela, 2002). ROS are important metabolites which play a significant role in many important cellular events such the activation of transcription factors, cell proliferation, and apoptosis. They were also implicated in the downstream signaling events of various receptors, including TNFR family members (Bae et al., 1997; Lander, 1997; Sundaresan et al., 1995). CD40 engagement in B cells induced ROS production leading to the activation of JNK, NF- $\kappa$ B, and interleukin (IL)-6 secretion (Lee and Koretzky, 1998). Recently, Liu et al, have shown that exogenous ROS inhibited CD40-induced B cell proliferation assayed by thymidine uptake and abrogating CD40-mediated NF- $\kappa$ B activation, without affecting cell death (Liu et al., 2007). In the present study, we showed that CD40-mediated cell death process was inhibited by abrogating ROS production in Raji cells, suggesting that CD40-induced ROS production plays a role in CD40-induced B cell death. Result discrepancy could be due to the fact that Liu et al. examined the effect of exogenous ROS rather than the effect of inhibiting the endogenous ROS, and assessed cell death by a cell viability count rather than an apoptosis assay.

An interesting finding relating to CD40 ligation is the receptor homodimerization phenomenon found to be necessary for the initiation of important CD40-mediated signaling events (Reyes-Moreno et al., 2004; Reyes-Moreno et al., 2007). Indeed, we previously reported that CD40 homodimer formation is an absolute requirement for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) activation in B cells, suggesting a role for CD40 homodimerization in cell survival events. In agreement with such finding, our present study

shows that CD40 mutants, not capable of forming homodimers, exhibited an increased cell death compared to CD40WT. Taken together, these findings indicate that CD40 homodimerization downregulates the apoptotic role of CD40, and might be involved in CD40-mediated cell survival events.

A number of studies have tried to describe the mechanism implicated in CD40-induced cell death. Using a membrane-bound CD154, it was shown that the cell death induced via CD40 in carcinoma cells was dependent upon the increased expression and stabilization of TRAF3 and the downregulation of TRAF6 and its mediated survival signals, being PI-3K/Akt (Elmetwali et al., 2010). It has also been demonstrated that stimulating CD40 with membrane-bound CD154 and not soluble agonists, triggered cell death in malignant human urothelial cells by upregulating TRAF3 protein, followed by activation of the JNK/activator protein-1 (AP-1) pathway and induction of caspase-9/caspase-3-associated intrinsic apoptotic cascade (Georgopoulos et al., 2006). On the contrary, our group reported that CD40-induced cell death is caspase-independent in Raji cells and other EBV-positive B cell lines (Leveille et al., 1999b). Such result discrepancies could be related to the type of cells used, the level of CD40 expression on this cell type, and the type of stimuli. In addition to JNK/AP-1 cascade, several intracellular pathways have been implicated in CD40-mediated cell death, such as ERK (Hollmann et al., 2006). However, our study show that another intracellular effector, Jak 3 which could constitutively be associated with the intracellular domain of CD40 is not implicated in CD40-mediated cell death. As to the role of TRAF6 in CD40-mediating signaling, it has been controversial. TRAF6 association with CD40 was found to be important for B7-1 upregulation, but not for up-regulation of other surface molecules (Jalukar et al., 2000). TRAF6 functions as an adaptor molecule, positively regulating the NF $\kappa$ B pathway.

However, a new function has been attributed to human TRAF6, being the direct stimulation of apoptosis through a direct binding to caspase-8 via its RING domain (He et al., 2006). Our current results show that apoptosis induced by CD40 requires its association with TRAF6, and is independent of TRAF3 and TRAF2.

Taken together, the present study extends previous observations to further elucidate the mechanism(s) of CD40-induced cell death in B and epithelial cells. CD40-mediated cell death was shown to implicate a lysosomal permeabilization and cathepsin-B release pathway via an association of the receptor with TRAF6. In addition, cell death induced by CD40 was negatively regulated by receptor homodimerization. Considering the expression and the upregulation of CD40 in a large panel of human cancer cells, the development of anticancer agents with different modes of action, targeting CD40 and/or downstream molecules implicated in promoting programmed cell death, is of key importance in overcoming clinical therapy resistance.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Canadian Institute of Health Research (CIHR), and Canadian Arthritis Network (CAN). Mr. M. Jundi and Dr. A. Nadiri are recipients of an international award from CAN.

### **Disclosures**

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## References

- Ahmed-Choudhury J., Russell C. L., Randhawa S., Young L. S., Adams D. H. and Afford S. C. (2003) Differential induction of nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activity after CD40 ligation is associated with primary human hepatocyte apoptosis or intrahepatic endothelial cell proliferation. *Mol Biol Cell* **14**, 1334-45.
- Bae Y. S., Kang S. W., Seo M. S., Baines I. C., Tekle E., Chock P. B. and Rhee S. G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 217-21.
- Benoit N. E. and Wade W. F. (1996) Increased inhibition of proliferation of human B cell lymphomas following ligation of CD40, and either CD19, CD20, CD95 or surface immunoglobulin. *Immunopharmacology* **35**, 129-39.
- Bishop G. A. and Hostager B. S. (2003) The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 297-309.
- Boya P. and Kroemer G. (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**, 6434-51.
- Craxton A., Shu G., Graves J. D., Saklatvala J., Krebs E. G. and Clark E. A. (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol* **161**, 3225-36.
- Dugger K., Lowder T. W., Tucker T. A. and Schwiebert L. M. (2009) Epithelial cells as immune effector cells: the role of CD40. *Semin Immunol* **21**, 289-92.
- Eliopoulos A. G. and Young L. S. (2004) The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 360-7.
- Elmetwali T., Young L. S. and Palmer D. H. (2010) 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* **184**, 1111-20.
- Fotin-Mleczyk M., Henkler F., Hausser A., Glauner H., Samel D., Graness A., Scheurich P., Mauri D. and Wajant H. (2004) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **279**, 677-85.

- Franklin R. A. and McCubrey J. A. (2000) Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* **14**, 2019-34.
- Funakoshi S., Longo D. L., Beckwith M., Conley D. K., Tsarfaty G., Tsarfaty I., Armitage R. J., Fanslow W. C., Spriggs M. K. and Murphy W. J. (1994) Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood* **83**, 2787-94.
- Gauld S. B., Blair D., Moss C. A., Reid S. D. and Harnett M. M. (2002) Differential roles for extracellularly regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in B cell antigen receptor-induced apoptosis and CD40-mediated rescue of WEHI-231 immature B cells. *J Immunol* **168**, 3855-64.
- Georgopoulos N. T., Steele L. P., Thomson M. J., Selby P. J., Southgate J. and Trejdosiewicz L. K. (2006) A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ.*
- Gerondakis S. and Strasser A. (2003) The role of Rel/NF-kappaB transcription factors in B lymphocyte survival. *Semin Immunol* **15**, 159-66.
- Girouard J., Reyes-Moreno C., Darveau A., Akoum A. and Mourad W. (2005) Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression. *Mol Immunol* **42**, 773-80.
- Gomes E. M., Rodrigues M. S., Phadke A. P., Butcher L. D., Starling C., Chen S., Chang D., Hernandez-Alcoceba R., Newman J. T., Stone M. J. and Tong A. W. (2009) Antitumor activity of an oncolytic adenoviral-CD40 ligand (CD154) transgene construct in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **15**, 1317-25.
- Hanissian S. H. and Geha R. S. (1997) Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* **6**, 379-87.
- Hassan G. S., Rana M., Léveillé C., Nadiri A., Jundi M., Polyak M., El-Fakhry Y. and Mourad W. M. (2009) Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. *Curr Immunol Rev* **5**, 285-299.
- Hauer J., Puschner S., Ramakrishnan P., Simon U., Bongers M., Federle C. and Engelmann H. (2005) TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2874-9.

- He L., Wu X., Siegel R. and Lipsky P. E. (2006) TRAF6 regulates cell fate decisions by inducing caspase 8-dependent apoptosis and the activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* **281**, 11235-49.
- Hess S. and Engelmann H. (1996) A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* **183**, 159-67.
- Hollmann C. A., Owens T., Nalbantoglu J., Hudson T. J. and Sladek R. (2006) Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase predisposes diffuse large B-cell lymphoma cell lines to CD40-mediated cell death. *Cancer Res* **66**, 3550-7.
- Honeychurch J., Glennie M. J., Johnson P. W. and Illidge T. M. (2003) Anti-CD40 monoclonal antibody therapy in combination with irradiation results in a CD8 T-cell-dependent immunity to B-cell lymphoma. *Blood* **102**, 1449-57.
- Hostager B. S., Catlett I. M. and Bishop G. A. (2000) Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J Biol Chem* **275**, 15392-8.
- Ivanov A., Beers S. A., Walshe C. A., Honeychurch J., Alduaij W., Cox K. L., Potter K. N., Murray S., Chan C. H., Klymenko T., Erenpreisa J., Glennie M. J., Illidge T. M. and Cragg M. S. (2009) Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* **119**, 2143-59.
- Jaattela M. (2002) Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med* **34**, 480-8.
- Jalukar S. V., Hostager B. S. and Bishop G. A. (2000) Characterization of the roles of TNF receptor-associated factor 6 in CD40-mediated B lymphocyte effector functions. *J Immunol* **164**, 623-30.
- Lander H. M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* **11**, 118-24.
- Law C. L. and Grewal I. S. (2009) Therapeutic Interventions Targeting CD40L (CD154) and CD40: The Opportunities and Challenges. *Adv Exp Med Biol* **647**, 8-36.
- Lee J. R. (2003) Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine treatment. *Mol Cell Biochem* **252**, 1-7.

- Lee J. R. and Koretzky G. A. (1998) Production of reactive oxygen intermediates following CD40 ligation correlates with c-Jun N-terminal kinase activation and IL-6 secretion in murine B lymphocytes. *Eur J Immunol* **28**, 4188-97.
- Leveille C., R A. L.-D. and Mourad W. (1999a) CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol* **29**, 65-74.
- Leveille C., Zekki H., Al-Daccak R. and Mourad W. (1999b) CD40- and HLA-DR-mediated cell death pathways share a lot of similarities but differ in their use of ADP-ribosyltransferase activities. *Int Immunol* **11**, 719-30.
- Liu J., Yoshida Y. and Yamashita U. (2007) Suppressive effect of reactive oxygen species on CD40-induced B cell activation. *FEBS Lett* **581**, 5043-9.
- Reyes-Moreno C., Girouard J., Lapointe R., Darveau A. and Mourad W. (2004) CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem* **279**, 7799-806.
- Reyes-Moreno C., Sharif-Askari E., Girouard J., Leveille C., Jundi M., Akoum A., Lapointe R., Darveau A. and Mourad W. (2007) Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* **282**, 19473-80.
- Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Irani K. and Finkel T. (1995) Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296-9.
- Yellin M. J., Winikoff S., Fortune S. M., Baum D., Crow M. K., Lederman S. and Chess L. (1995) Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol* **58**, 209-16.

## Figures Legends

### **Figure 1: Apoptosis of Raji cells upon CD40 engagement requires ROS production and LMP.**

(A) Raji cells were incubated with 1 $\mu$ g/ml isotype control (IC) or G28-5 for different time intervals. (B) Raji cells were pre-treated overnight with 10 mM of NAC, then stimulated overnight with 1 $\mu$ g/ml isotype control (IC) or G28-5, or left unstimulated (NS). For A and B, samples were assessed for cell death by staining with propidium iodide (PI, 1  $\mu$ g/ml) and flow cytometry. Cell death was presented as percentage and plotted in a histogram. Each value represents the mean of 3 experiments done in triplicates. (C) Raji cells were stimulated with mAbs overnight and assessed for LMP by staining with acridine orange (AO). The relative decrease in red fluorescence (FL3) was measured by flow cytometry. (D) Raji cells were pre-treated for 1 hour with Cathepsin B inhibitor (CA-074ME) or cysteine protease inhibitor (zFA-fmk), or left untreated (NT). Then, cells were stimulated for 4 hours with isotype control (IC) or anti-CD40 (G28-5). Samples were assessed for cell death by staining with PI and flow cytometry. Anti-Class I (W6/32) was used as an isotype control (IC). (E) HEK 293 cells stably-transfected with hCD40WT were pretreated with 10mM of NAC, then stimulated overnight with 1 $\mu$ g/ml isotype control (IC) or G28-5, or left unstimulated (NS). Samples were assessed for cell death by staining with propidium iodide and flow cytometry, as described above. Each value represents the mean of 3 experiments done in triplicates. (F) These HEK 293 cells were stimulated with mAbs overnight and assessed for LMP by staining with acridine orange (AO), as described above.

### **Figure 2: CD40 cytoplasmic domain is required for cell death induction in HEK 293 cells.**

HEK 293 cells were stably transfected with hCD40WT or with the truncated form of CD40 (hCD40- $\Delta$ ) lacking the entire intracellular cytoplasmic tail. (A) CD40 expression was assessed by flow cytometry. The value in the flow cytometry graph represents the mean fluorescent intensity. (B) These HEK 293 cells were stimulated with two different concentrations of G28-5, 250ng/ml or 1 $\mu$ g/ml, or left unstimulated. The specificity of cell death induction via CD40 in these 293 cells was studied using Annexin V/PI staining and flow cytometry. The values in

each quadrant represent the percentage of AV<sup>+</sup> or PI/AV<sup>+</sup> cells. Such values are plotted in the histogram.

**Figure 3: CD40-mediated cell death is independent of NFκB activation.**

HEK 293 cells stably expressing hCD40WT were co-transfected transiently with either empty vector (Mock), IκBα-WT or the dominant negative form of IκBα (IκBα-DN). (A) CD40 expression was assessed by flow cytometry. The value in the flow cytometry graph represents the mean fluorescent intensity. (B) These co-transfected HEK 293 cells were stimulated for 15 min at 37°C with G28-5, or with isotype control (IC). To demonstrate the capacity of CD40 engagement to phosphorylate IκBα, and the inhibitory effect of the mutant on such phosphorylation, cell lysates were analyzed by western blot. (C) The co-transfected HEK 293 cells were stimulated as in B, and assessed for cell death by staining with PI (1 μg/ml) and flow cytometry. Cell death was presented as percentage and plotted in a histogram. All experiments were repeated three times with similar results.

**Figure 4: The formation of CD40 homodimer is not required for CD40-mediated apoptosis**

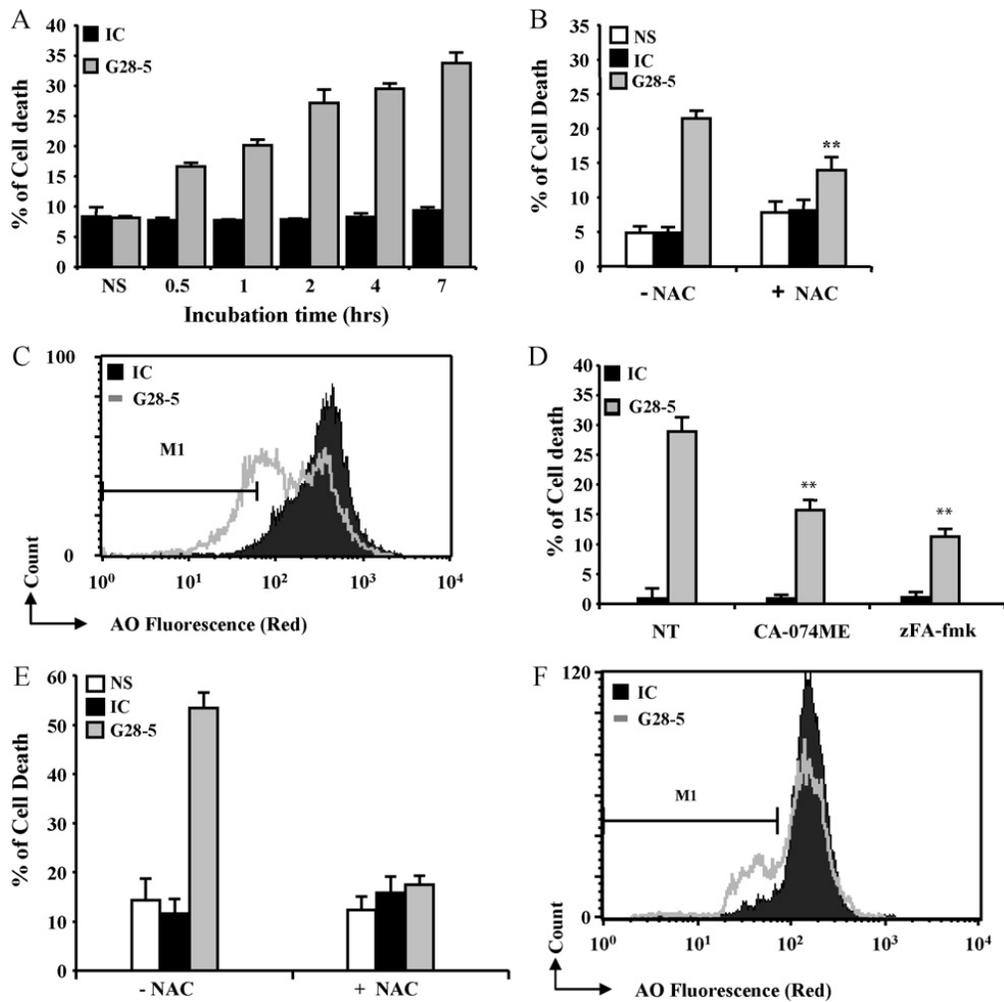
HEK 293 cells were stably transfected with hCD40WT or with the mutated form of hCD40 unable to form the disulfide-bond homodimer (hCD40-C238A). (A) CD40 expression was assessed by flow cytometry. The value in the flow cytometry graph represents the mean fluorescent intensity. (B) These cells expressing hCD40WT or hCD40-C238A were stimulated with isotype control (IC) or 500 ng/ml of G28-5. Their cell death was measured by PI (1 μg/ml) uptake, and plotted as percentage of cell death in a histogram.

**Figure 5: CD40-mediated cell death is dependent of TRAF- signaling**

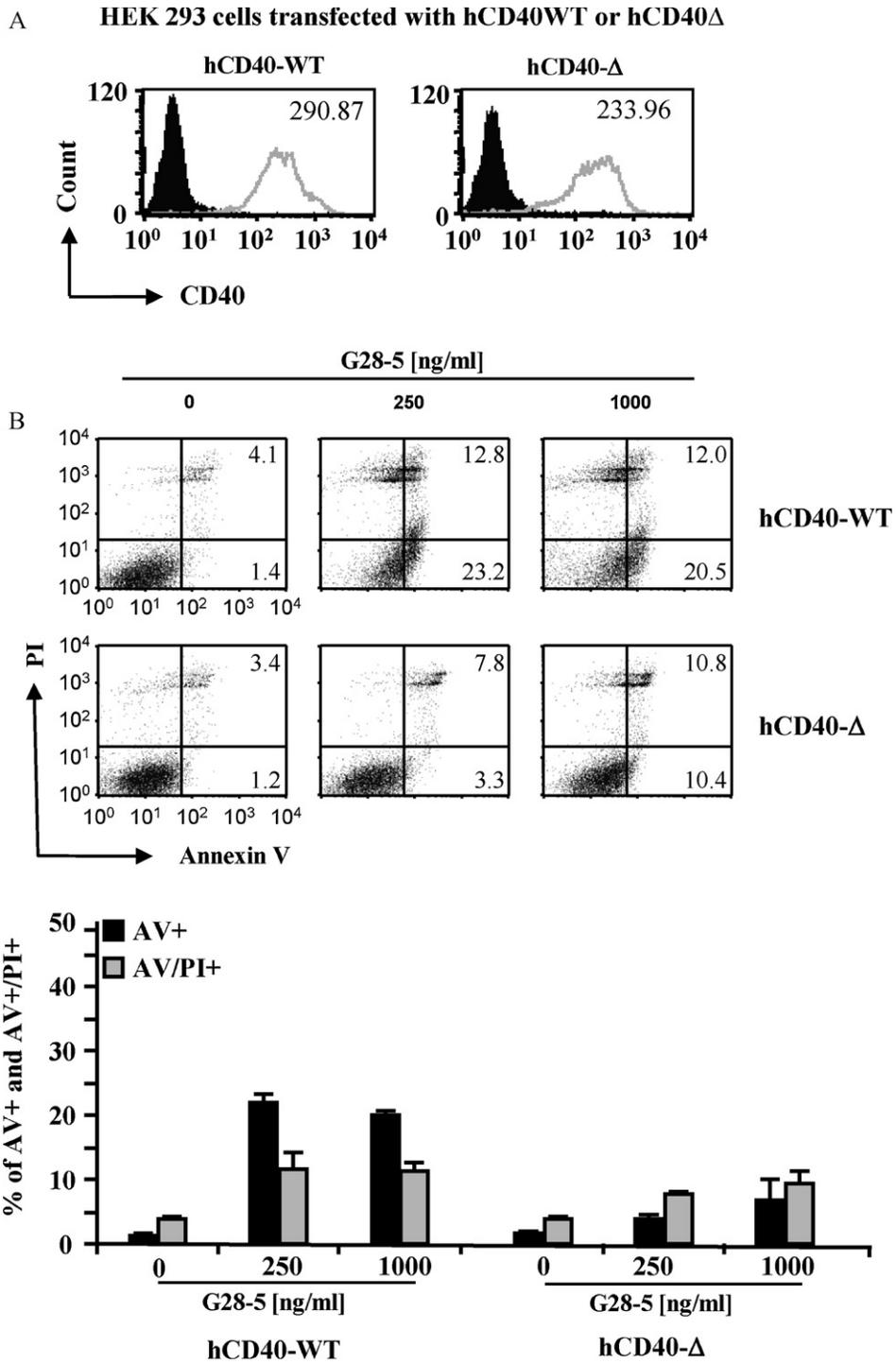
HEK 293 cells were stably transfected with hCD40WT, with hCD40-ΔTRAFs (CD40 depleted of its TRAFs association box), or with hCD40-P207A (CD40 mutated at Jak3 binding domain). (A) CD40 expression was assessed by flow cytometry. The value in the flow cytometry graph represents the mean fluorescent intensity. (B) These HEK 293 cells were stimulated with 250ng/ml or 1μg/ml of G28-5, or left unstimulated. Their cell death was measured by PI uptake (1 μg/ml), and plotted as percentage in a histogram.

**Figure 6: CD40-induced cell death requires TRAF6-mediated signaling**

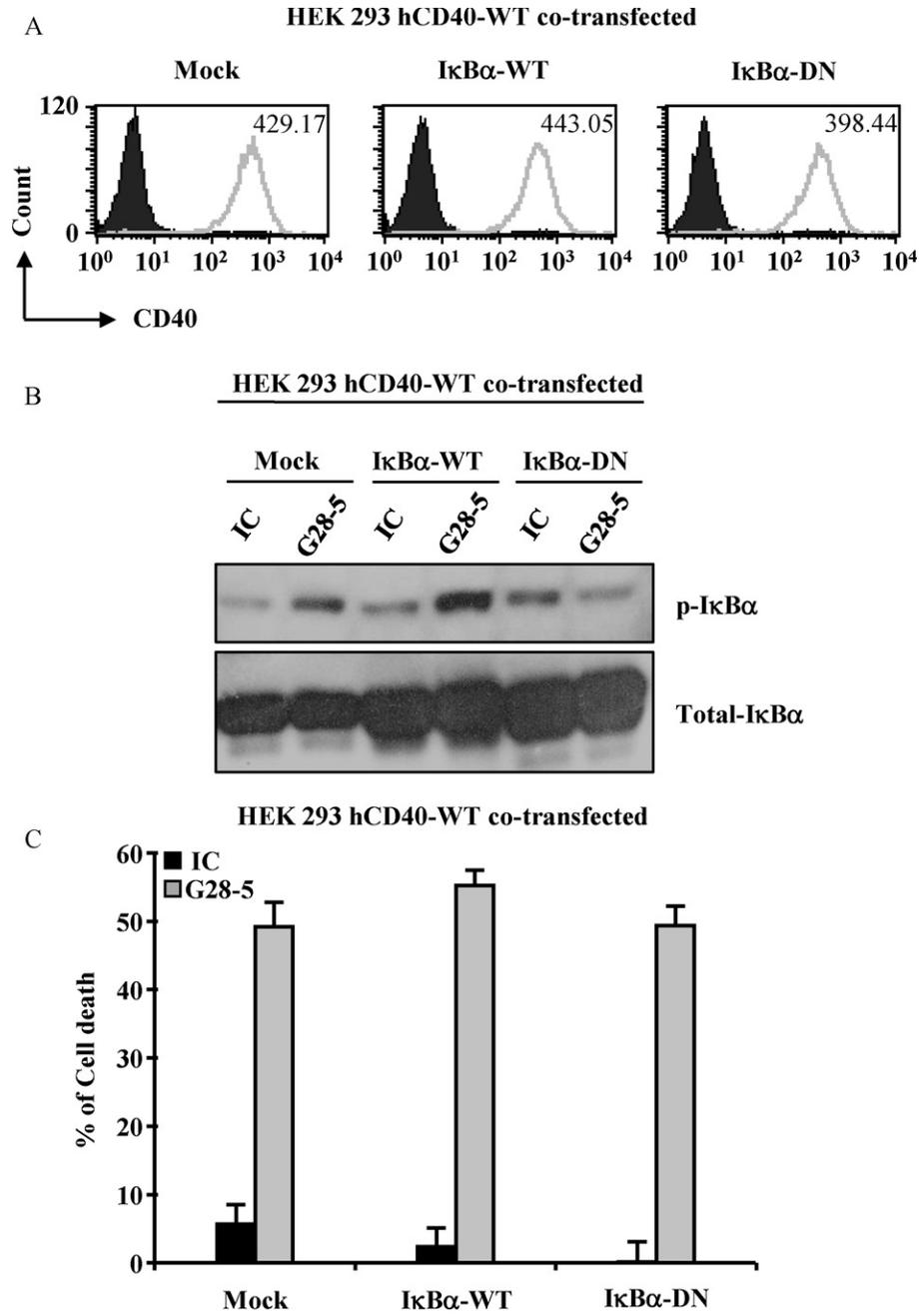
HEK 293 cells were stably transfected with hCD40WT, with hCD40-EEAA (CD40 mutated at TRAF6 binding domain), with hCD40-T234A (CD40 mutated at TRAF2/TRAF3 binding domain) or with hCD40-Q243A (CD40 mutated at TRAF3 binding domain). (A) CD40 expression was assessed by flow cytometry. The value in the flow cytometry graph represents the mean fluorescent intensity. (B) These HEK 293 cells were stimulated with 250 ng/ml of G28-5, and their cell death was measured by PI uptake, and plotted as percentage in a histogram. Cell death percentages of each group were compared to values obtained for cells expressing hCD40WT.



**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

A HEK 293 cells transfected with hCD40WT or hCD40C238A

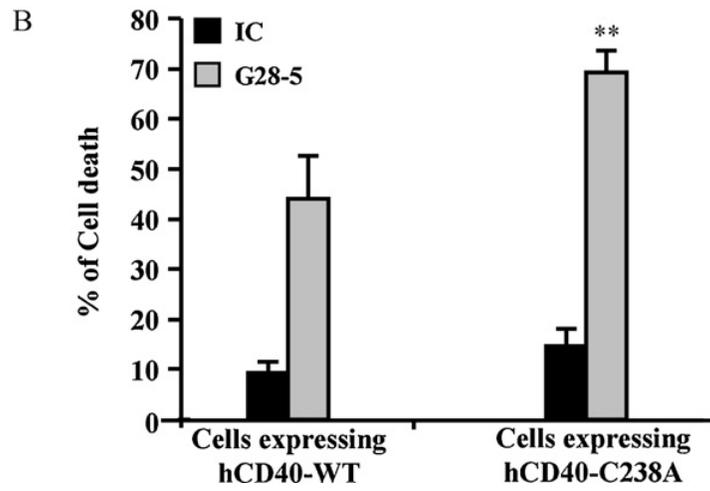
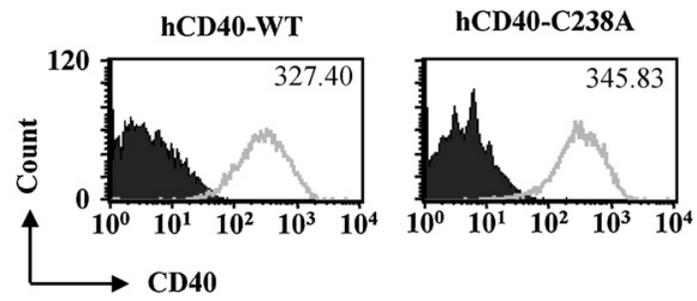


Figure 4

A HEK 293 cells transfected with hCD40WT, hCD40-ΔTRAFs or hCD40P207A

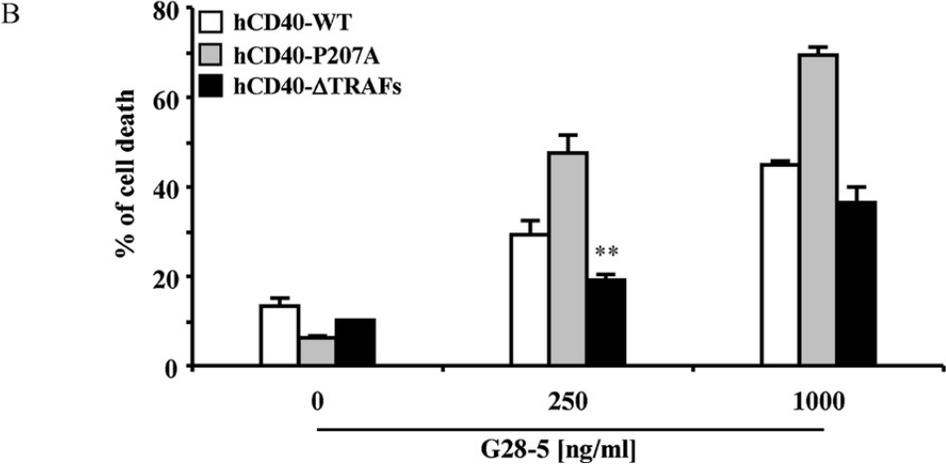
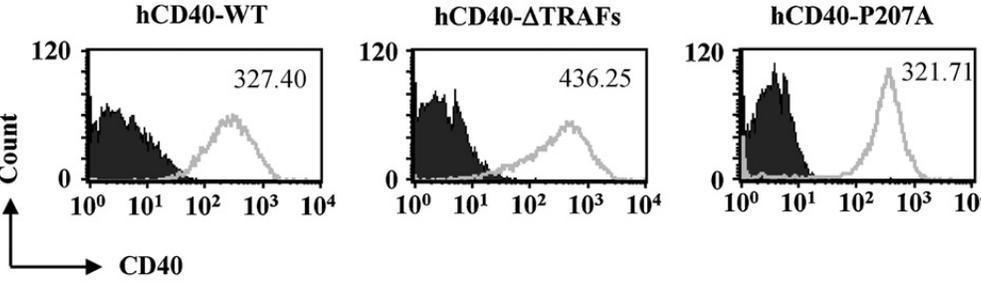


Figure 5

HEK 293 cells transfected with hCD40WT, or hCD40 mutated at TRAF domains

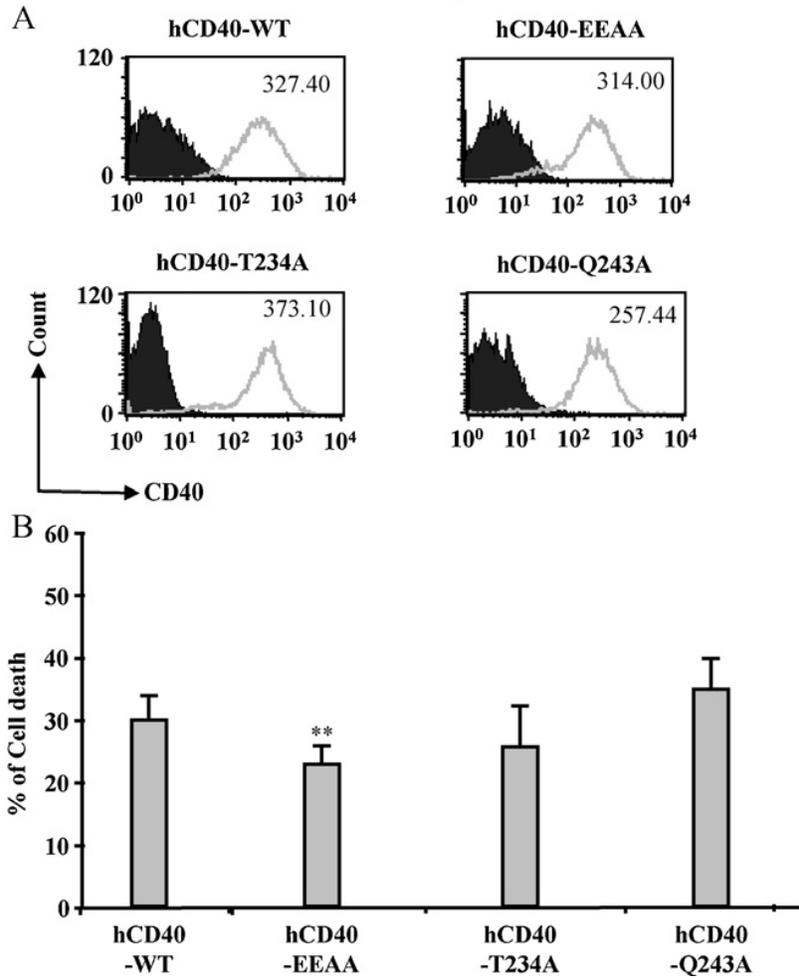


Figure 6

**Chapitre 3. L'importance de la translocation du CD40  
vers les radeaux lipidiques pour l'induction de certaines  
réponses biologiques.**

### ***3.1. Mise en contexte***

Notre étude sur l'induction de la mort cellulaire par le CD40 nous a permis de démontrer l'importance de son homodimérisation dans la régulation de la mort cellulaire. De plus, nos résultats antérieurs nous ont permis de suggérer, de manière indirecte, l'importance de la translocation du CD40 dans les radeaux lipidiques pour l'homodimérisation du CD40 ainsi que l'activation de l'AKT, qui représente un signal de survie cellulaire. Ainsi, la détermination du mécanisme impliqué dans la translocation du CD40 dans les radeaux lipidiques nous permettrait de mieux comprendre le mécanisme par lequel le CD40 pourrait réguler l'induction de la mort cellulaire, l'expression des molécules co-stimulatrices ainsi que l'induction de la réponse cellulaire adaptative.

### ***3.2. Contribution des co-auteurs***

**Malek Jundi:** La planification et la réalisation des expériences reliées à l'induction du CD80 par le hCD40L membranaire (figure S-2, 3 et 4) et l'analyse de la cytométrie (figure 4 et 5). Ainsi que la rédaction et la correction de l'article.

**Amal Nadiri:** La planification et la réalisation des expériences reliées à l'interaction du hCD40L avec les cellules transfectées (figure 3) et des expériences reliées à l'induction du CD80 par l'anti-CD40 (G28-5) (figure 4 et 5). Ainsi que la rédaction et la correction de l'article.

**Maria J. Polyak:** La planification et la réalisation des expériences reliées à la transfection des cellules A20 avec les différents plasmides (Vector, hCD40-WT, hCD40/CD45 et hCD40- $\Delta$ ) mutants utilisés dans ce papier et des expériences reliées aux translocations du CD40 dans les radeaux lipidiques (figure 1). Ainsi que la rédaction de l'article.

### ***3.3. Résumé***

Le CD40, un membre de la famille des récepteurs du TNF, est exprimé sur une variété de cellules. De plus, l'interaction du CD40 avec son ligand, le CD154, joue un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire humorale. Par ailleurs, il a été démontré qu'un faible niveau de CD40 est constitutivement associé aux radeaux lipidiques. Or, à la suite d'un engagement du CD40, il y aura une augmentation significative du CD40 associé aux radeaux lipidiques. L'objectif de cette étude est de déterminer le mécanisme impliqué dans l'association du CD40 aux radeaux lipidiques ainsi que la réponse biologique induite par cette association. Nos résultats démontrent que l'association du CD40 aux radeaux lipidiques est indépendante de l'activation de la PI-3-kinase, de la famille des Src kinases et du p38 MAPK. De plus, la translocation de la forme tronquée du CD40, qui est incapable d'induire de signalisation, vers les radeaux lipidiques est venue confirmer que l'association du CD40 aux radeaux lipidiques était indépendante de l'activation des voies de signalisations. Nos études sur le rôle biologique de cette association suggèrent que la déstabilisation de l'intégrité des radeaux lipidiques abolissait spécifiquement la phosphorylation de l'AKT par le CD40. Par ailleurs, le remplacement de la partie transmembranaire du CD40 par celle du CD45 (une protéine qui est exclue des radeaux lipidiques) a significativement réduit l'activation du PI3-kinase ainsi que l'induction de l'expression du B7.1. Cependant, l'induction des MAP kinases comme p38, ERK et JNK n'était pas affecté par cette mutation. En somme, ces résultats nous permettent d'élucider le mécanisme impliqué dans l'association du CD40 aux radeaux lipidiques ainsi que le signal induit par l'engagement du CD40 par le CD154.

## **CD40 translocation to lipid rafts: signaling requirements and downstream biological events.**

Amal Nadiri<sup>1\*</sup>, Maria J. Polyak<sup>1\*</sup>, Malek Jundi<sup>1\*</sup>, Haydar Alturaihi<sup>1</sup>, Carlos Reyes-Moreno<sup>2</sup>, Ghada S. Hassan<sup>1</sup>, and Walid Mourad<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, St-Luc Hospital, Montreal, QC, Canada H2X 1P1

<sup>2</sup>Department of Chemistry/Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada G9A 5H7

**Key words:** CD40, lipid rafts, signaling, transmembrane domain.

§ **Correspondence:** Walid Mourad, Ph.D.; Mailing Address: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, St-Luc Hospital, Pavillon Edward Asselin, 264 Blvd René Lévesque East, Montreal, QC, H2X 1P1, Canada. Tel.: 514-890-8000 Ext : 35287; Fax : 514-412-7314;

**Eur J Immunol. 2011 Aug;41(8):2358-67. doi: 10.1002/eji.201041143.**

**Abbreviations:** TRAF, TNFR-associated factor proteins; stCD154, soluble trimeric CD154; mCD154, membrane-bound CD154; CD40wt, CD40 wild type; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

\* Authors have equal contribution in this work.

## **Summary**

CD40, a member of the TNF receptor family, is expressed on a variety of immune and non-immune cells. Its interaction with its ligand, CD154, plays a pivotal role in humoral and cell-mediated immunity. A low level of CD40 is constitutively associated within membrane lipid rafts and upon engagement, this level is significantly enhanced. In this study, our objective is to evaluate the process of CD40/lipid rafts association in terms of signals required for its initiation and the resulting biological outcomes. Here, we show CD40/lipid raft association to be independent of PI-3-kinase, Src family kinases and p38 MAPK pathways. Moreover, CD40 lacking its intracellular domain which is usually required for CD40-mediated signaling, still localizes to lipid rafts upon engagement, confirming that CD40/lipid raft association is independent of signaling events. As to the biological outcomes of CD40/lipid rafts association, we show that disrupting lipid raft integrity selectively abolishes CD40-mediated Akt phosphorylation. In addition, replacing the transmembrane domain of CD40 with that of CD45 (a protein excluded from lipid rafts) dramatically reduced CD40-mediated Akt phosphorylation and B7.1 up-regulation, while not influencing p38, ERK and JNK activation. Together, these findings clarify the requirements for CD40/lipid raft association and the signals triggered upon CD40 engagement by CD154.

## Introduction

Interaction between the TNFR, CD40 and its ligand CD154 drives crucial steps in humoral immune responses [1-3]. Notably, CD40/CD154 interaction is critical for the affinity/maturation of immunoglobulins (Ig), the development of long-lived plasma B cells and the clonal expansion of memory B cells [1, 4, 5]. In the absence of intrinsic tyrosine kinase activity, CD40 transmits its intracellular signal via recruitment of several adaptor proteins, such as JAK3 [6] and TNFR-associated factor (TRAF) proteins [5], to specific domains in the CD40 cytoplasmic tail [4, 7-9]. This results in the activation of members of the Src kinase family (such as Lyn and Fyn), and other protein tyrosine kinases (such as Syk and Btk) [10, 11]; the activation of PI-3 kinase and phospholipase C $\gamma$ 2 [11]; and the activation of the MAP kinases p38, JNK, and ERK [12-14].

Lipid rafts are detergent-resistant plasma membrane microdomains that are enriched in cholesterol and sphingolipids. Being scaffolds of many signaling effectors including lipid-anchored proteins (such as Thy-1 and alkaline phosphatase), and signaling molecules (such as some Src kinase family members), lipid rafts act as platforms to initiate and regulate signal transduction processes in many cellular models [15, 16]. Engagement of CD40 molecules leads to CD40 clustering into ceramide-enriched lipid rafts of living human B cells [17, 18]. Common early events following CD40 clustering in mouse B cells [19] and in human dendritic cells [20] include Lyn activation within, and TRAF-2 and -3 recruitment to, lipid rafts. In dendritic cells, CD40 translocation to lipid rafts is required for initiating signaling events leading to the production of interleukin-1 $\alpha/\beta$  (IL-1 $\alpha/\beta$ ) and IL-1Ra mRNA [20]. In addition, it was previously shown in B cells, that CD40 lipid raft localization is a pre-requisite for CD40 homodimer formation [21] that plays an important role in some CD40-mediated

signaling [22]. Ceramide release and subsequent CD40 clustering leading to maximal signal transduction in human B cells are triggered only when anti-CD40 mAbs are cross-linked with a secondary Ab. This suggests that these events require a high, stringent level of receptor cross-linking to occur. Although oligomerized CD40 molecules cluster in, and trigger some intracellular signals within lipid rafts, the dependence for lipid rafts in CD40 signaling remains to be completely elucidated.

The importance of CD40 membrane localization in disease pathology has been emphasized by several studies. Sustained localization of CD40 to lipid rafts has been implicated in the enhanced proliferation of B cells in non-Hodgkin's lymphomas [23]. The manipulation of membrane cholesterol by *Leishmania major* alters CD40 lipid raft localization and subsequent signaling events, skewing the response from T helper type Th1 to Th2 and increasing the susceptibility of macrophages to infection [24]. CD40 is up-regulated and constitutively associates with lipid rafts in an auto-aggressive subset of T cells in a murine model of diabetes [25]. The autoimmune pathology in this mouse model is influenced by CD40 mediated anti-apoptotic signals.

Taken together, the above studies indicate that the localization of CD40 within lipid rafts is important for CD40-induced responses. However, the requirements and the downstream signaling effects in B cells have not yet been fully determined. Here we demonstrate that CD40 translocation to lipid rafts does not require signaling as shown using biochemical inhibitors and mutational analysis. CD40 translocation to lipid rafts is required for PI-3K-induced Akt phosphorylation and subsequent CD80 up-regulation, but not for CD40-mediated p38, ERK and JNK activation. These findings further emphasize the

importance of CD40 lipid raft localization for influencing downstream signaling events and cellular outcome.

## **Results**

### **CD40 translocation to lipid rafts occurs independently of signaling events**

It is well established that CD40 translocates to lipid rafts upon receptor engagement; however, the requirements for its localization in these membrane microdomains and the biological role of this localization are not yet well known. Previous studies have shown that CD40 lipid raft localization is important for recruitment and activation of some signaling effectors [19, 20], but this does not eliminate the possibility that signaling events could precede CD40 translocation to lipid rafts. To determine if CD40 lipid raft localization is dependent on intracellular signaling, several of the known CD40-initiated signaling pathways were targeted using biochemical inhibitors. Indeed, BJAB B cells were either pre-treated with vehicle DMSO or inhibitors of the PI-3 kinase (LY294002), Src family kinases (PP1) or p38 MAPK (SB203580) pathways. Cells were then either unstimulated or stimulated with soluble trimeric human CD154 (stCD154) and then lysed. Cell lysates were fractionated by sucrose density gradient centrifugation and analyzed under non-reducing conditions and western blot. As previously described [26], lipid rafts were found exclusively in the low density fractions 3 and 4, corresponding with localization of the lipid raft marker, glycosphingolipid GM1, whereas the Triton-soluble proteins were present in the high-density fractions 9 to 11, in which the membrane phosphatase CD45 was detected (data not shown). Figure 1A shows CD40 analysis in combined lipid raft fractions (3 and 4; R) and soluble fractions (9, 10 and 11; S). The majority of CD40 fractionated from unstimulated cells was predominantly detected as a monomer in the soluble compartment (Fig. 1A). Upon engagement with stCD154, CD40

redistributed to the lipid raft fraction where it was detected as a homodimer, as we previously described [21]. A similar distribution pattern was observed in cells pre-treated with the various biochemical inhibitors. These results indicate that CD40 gradient localization was not affected by inhibition of the different tested signaling pathways.

Since it is well established that CD40-mediated signaling requires its cytoplasmic tail, and to completely rule out the possible involvement of CD40 signaling in lipid raft association, CD40 translocation to lipid rafts was tested in A20 cells stably expressing human CD40 wild type (hCD40wt) or CD40 lacking its intracellular domain (hCD40 $\Delta$ ) (Fig. 1B). These cells were unstimulated or stimulated with membrane-bound CD154 (mCD154), lysed and fractionated by sucrose gradient centrifugation. Gradient fractions were analyzed for CD40 localization under non-reducing conditions and western blot. Human CD40wt and hCD40 $\Delta$  from non-stimulated samples constitutively localized to the soluble fractions (fractions 9-11) (Fig. 1B). Upon CD40 engagement, hCD40wt monomers as well as hCD40wt homodimers were detected in fractions 3 and 4, however, only hCD40 $\Delta$  monomers and not homodimers were detected in the lipid raft fractions, (Fig. 1B). This latter finding was expected as hCD40 $\Delta$  lacks the cytoplasmic cysteine at position 238 reported earlier by our group to be required for homodimer formation [21]. The lower panel of Fig. 1B shows the localization of the lipid raft marker, glycosphingolipid GM1, in the low density fractions 3 and 4. Results of the current experiments indicate that CD40 cross-linking resulted in localization of hCD40wt as well as of hCD40 $\Delta$  to the buoyant, lipid raft fractions. Taken together, results of the signaling inhibitors and mutational experiments show that signaling and, more specifically, CD40 signaling is not required for its lipid raft localization in B cells.

### **Disrupting lipid raft integrity abolishes CD40-mediated Akt activation**

To determine the importance of CD40 translocation to lipid rafts in intracellular signaling events, the activation of downstream signaling effectors was monitored in BJAB B cells depleted of cholesterol using methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD). CD40 engagement with stCD154 resulted in increased Akt phosphorylation. Such response was dramatically abrogated in cholesterol-depleted cells as compared to untreated control cells. JNK and p38 activation were not affected by M $\beta$ CD treatment (Fig. 2A). This effect was not due to a lower CD40 expression in the treated cells, because M $\beta$ CD treatment did not affect surface CD40 expression as assessed by CD154 binding (Fig. 2B). On the other hand, there was no detectable difference in B cell antigen receptor-mediated activation of Akt, JNK and p38 upon cholesterol depletion as compared to the control. Similarly, cells activated using hydrogen peroxide exhibited an increased Akt, JNK, and p38 phosphorylation independently of lipid raft integrity. Overall, these results show that CD40-mediated activation of Akt is specifically affected upon lipid raft disruption.

### **Inhibiting the CD40 translocation to lipid rafts dramatically reduces Akt activation**

To further confirm the direct role of CD40 lipid raft localization on signaling, we used A20 cells expressing a human CD40 mutant that is excluded from lipid rafts. Such a mutant consist of CD40 containing the transmembrane domain of CD45 (a protein excluded from lipid rafts). This chimeric form of CD40 (CD40/CD45) has been shown to be important for receptor clustering and lipid raft association when ectopically expressed in a murine T cell line [27]. Herein, we wanted to determine whether or not CD40-mediated signaling would be affected in B cells expressing CD40/CD45. Constructs containing either empty vector, human CD40wt

(hCD40wt) or hCD40/CD45 were stably expressed in murine A20 B cells. Cells expressing hCD40wt or the chimeric receptor were sorted and stained with biotin-conjugated anti-CD40 (G28-5 mAb), followed by Alexa-488-conjugated streptavidin (Fig. 3A). It is worth noting here that the hCD40/CD45 was expressed at slightly reduced levels compared with hCD40wt. Since A20 murine B cells express a low level of murine CD40, a binding assay using human Alexa fluor 488-conjugated stCD154 were used to confirm (1) that human CD154 did not bind to murine CD40; (2) that it could engage the ectopically expressed human CD40 constructs; and (3) that replacing the transmembrane domain of CD40 with that of CD45 in the human chimeric construct did not alter CD154 binding. Flow cytometry data indicated that human CD154 binds specifically to hCD40wt as well as to the hCD40/CD45 chimeric receptor consistent with their levels of expression (Fig. 3B). A second set of experiments investigated the importance of CD40 transmembrane domain in CD40-mediated signaling in B cells. For this purpose, A20 cells stably transfected with empty vector, hCD40wt or hCD40/CD45 were stimulated over time using stCD154 or anti-CD40 (G28-5 mAb). The activation of several signaling effectors was then monitored. Engagement of hCD40wt and hCD40/CD45 resulted in equivalent activation of ERK, p38, JNK (Fig 3C), as well as  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Fig. S-1). It is worth noting here, that these data have been further confirmed using increasing concentrations of stCD154 and G28-5 and at different time intervals of stimulation (data not shown). In contrast, stimulation of A20 cells transfected with hCD40/CD45 did not lead to any detectable Akt phosphorylation as compared to cells transfected with hCD40wt (Fig. 3C and Fig. S-1). It is worth mentioning at this point, that variability was observed in basal pAkt levels, due to factors such as the number of cell passages, their confluence level, and their exact number prior to the experimental procedure. To overcome this variability, and achieve a clear

interpretation of a stimulated response, basal levels of pAkt as well as of other phosphorylated effectors, were determined for each experiment.

These results underline the importance of CD40 transmembrane domain and thus the CD40 localization to lipid rafts in selective intracellular signaling events, namely the Akt activation.

### **CD40 translocation to lipid rafts is required for CD80 expression in B cells.**

Based on the above observations, we wanted to determine whether CD40 recruitment into lipid rafts and the consequent CD40-mediated Akt phosphorylation affected the expression of co-stimulatory molecules. Since A20 cells constitutively expressed a high level of CD86 (data not shown), expression of another co-stimulatory molecule, the CD80, whose up-regulation is also dependent upon PI-3K activation [28], was investigated. Engagement of hCD40wt in A20 cells with anti-CD40 (G28-5 mAb) (Fig. 4) or mCD154 (Fig. S-2) led to significant increase in CD80 expression. In contrast, stimulation of A20 cells expressing hCD40/CD45 mutant exhibited no change in CD80 expression (Figs. 4 and S-2). These results indicated that yet another intracellular event, namely the CD80 expression, requires the CD40 localization into lipid rafts.

To confirm the role of PI-3K phosphorylation in the CD40-induced CD80 upregulation, A20 cells expressing hCD40wt were stimulated with anti-CD40 (G28-5 mAb), or mCD154, in the presence or absence of PI-3K inhibitor, Ly294002. The increased CD80 expression observed upon engagement of CD40 with G28-5 (Fig. 5), or mCD154 (Fig. S-3) was abrogated by PI-3K inhibitor. These data indicate that PI-3K is upstream of CD40-mediated CD80 upregulation.

## **Discussion**

In this study we demonstrate that CD40 translocation to lipid rafts does not require PI-3-kinase, the Src family kinases and p38 MAPK signaling pathways. Such translocation was even shown not to necessitate the CD40 cytoplasmic tail, confirming therefore its independence of intracellular signaling. On the other hand, we show herein, that CD40 localization into lipid rafts is essential for some CD40-mediated events such as PI-3K-induced Akt phosphorylation and subsequent CD80 up-regulation, but not for p38, ERK and JNK activation.

The crucial role of lipid rafts in signaling transduction of several receptors, such as BCR, TCR, and other members of the multichain immune recognition receptor family, has been well documented [29-31]. In each case, the lipid rafts concentrate the Src-family kinase (Lyn, Fyn, and Lck among others) that initiates signaling and the immune receptors are excluded from the lipid rafts in resting or inactivated cells [32, 33]. The binding of multivalent ligands induces the oligomerization of these receptors, resulting in the translocation of the receptors into the lipid rafts where the tyrosine residues within the immunoregulatory tyrosine activation motifs (ITAMs) are phosphorylated [27, 34]. CD40 receptor could be constitutively associated with lipid rafts at a level that is cell type-dependent [20]. In our recent study, we demonstrated that following high levels of CD40 oligomerization with multivalent ligands, the weak interactions existing between CD40 and the membrane rafts might be strengthened and lead to stabilization of this association as measured by induced resistance to detergent extraction [21].

Although it is well established that CD40 translocates to lipid rafts upon receptor engagement [21], the requirements for its raft localization are not completely understood. Previous studies have shown that CD40 lipid raft localization is a prerequisite for recruitment

and activation of some signaling effectors, without analyzing the possibility that signaling events could precede CD40 translocation to lipid rafts. Using the signaling pathways inhibitors LY294002 (PI 3-kinase), PP1 (src-family kinases) and SB203580 (p38 MAP kinase), our results indicate that activation of these signaling pathways are not required for CD40 translocation to lipid rafts in B cells. In fact, the recruitment of CD40 into lipid raft is shown not to require a specific CD40-induced signal because cytoplasmic tail-truncated CD40 molecules easily translocate into these microdomains. Similar findings were reported for other immune receptors such as BCR [35, 36] and TCR [37, 38]. Indeed, initial studies concerning the mechanism of BCR raft association showed that signaling-incompetent mutant BCR translocated to lipid rafts upon receptor oligomerization suggesting that the signaling function of the BCR does not appear essential for translocation to lipid rafts [36]. Consistent with this finding, the treatment of B cells with Src-family kinase inhibitors, PP1 or PP2, failed to block BCR translocation [35, 36]. It was also proposed that cell signaling events, such as protein phosphorylation,  $Ca^{2+}$  mobilization/influx, cytoskeleton rearrangement, and phosphorylation of TCR components, might be necessary determinants for the recruitment of CD3/TCR complex into lipid rafts [37]. Moreover, Lck activation was shown not to be essential for TCR raft association [38]. Therefore, our current results, supported by data reported for other immune receptors, demonstrate that CD40 translocation to lipid rafts is independent of cell signaling events and is driven by a mechanism not yet proposed. It was previously suggested by the group of Pierce that the new conformation acquired by an oligomerized receptor might be more compatible to a lipid raft composition as compared to the monomeric form of the receptor [39]. Indeed, such view was first described in 1999, for the high-affinity IgE receptor, FcεR shown to localize into LR when bound to its ligand [39, 40]. In our study, CD154 was

capable of inducing CD40 translocation probably by allowing receptor oligomerization. Consistent with this model, our previous studies showed that a high affinity multivalent ligand/receptor interaction is required for CD40 to translocate to lipid rafts and that the relocalization of CD40 monomers within these microdomains may be necessary to form CD40/CD40 homodimers [21]. Similarly, BCR and TCR translocate to lipid raft microdomains only upon their binding to multivalent ligands [41, 42], possibly via a conformational change that favors their stable association with lipid rafts.

As mentioned earlier, lipid rafts being scaffolds of many intracellular effectors, we wanted to examine if CD40 translocation to lipid rafts is important for CD40-induced signaling. Depleting the plasma cholesterol and therefore lipid rafts integrity, using *M $\beta$ CD*, did not affect CD40-mediated JNK and p38 activation. However, Akt phosphorylation induced by CD40 engagement, was dramatically reduced in cells treated with the cholesterol depleting agent as compared to non-treated cells. This latter finding was consistent with our previously published data demonstrating that CD40 homodimer formation, which is also dependent upon lipid raft localization, is required for Akt activation [21, 22].

Lipid rafts are not only a platform specifically enriched in a subset of proteins, they also selectively exclude other proteins. It is of particular interest that the tyrosine phosphatase CD45 is specifically excluded from lipid rafts in B cells [27, 36, 43] and T cells [27, 31, 44]. While general molecular requirements for raft exclusion are not well understood, the CD45 transmembrane domain is sufficient to re-target otherwise raft associated proteins to non-raft membranes. Indeed, in a murine T cell line, the replacement of the transmembrane of CD40 with that of CD45 showed that the transmembrane domain of CD40 is central for the recruitment to and the clustering of CD40 in membrane microdomains [27]. The preferential

integration of CD40 rather than CD45 into lipid rafts might be due to the amino acid composition of their transmembrane domains. Indeed, the CD40 transmembrane domain contains uncharged and phenylalanine residues favoring its inclusion in the hydrophobic environment of lipid rafts, while CD45 transmembrane domain contains hydrophilic amino acids [27]. In the present study, we show that CD40/CD45 engagement with stCD154 yielded a dramatic reduction of Akt phosphorylation in B cells. On the other hand, B cells transfected with the chimeric CD40/CD45 receptor still exhibit p38, ERK and JNK as well as I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation upon cell stimulation with stCD154. Contrary to this result, Bock and Gulbins have shown that the exclusion of the chimeric CD40/CD45 receptor from the rafts domain was associated with a deficiency in activating JNK, p38 MAP kinase and SAPK pathways [27]. These discordances may be attributed to differences in the plasma membrane lipid composition and properties of the different cell types used. In the context of CD40-mediated signaling, we have previously demonstrated PI-3K activation induced by CD40 engagement to be dependent on the receptor homodimerization, a phenomenon requiring an intact lipid raft integrity [22]. Another mechanism possibly explaining the dependence of PI-3K activation on CD40/LR association is the type of TRAF involved. Indeed, TRAFs, which are adaptor molecules associated to CD40, exhibit distinct translocation capacities, depending on the type of TRAFs isoform and the type of cells. In epithelial cells and B cells, TRAFs 2 and 3 have been shown capable of translocating to LR upon CD40 engagement [19, 45]. On the other hand, TRAF6 has been shown to translocate to lipid rafts in osteoclasts upon activation of another TNF-R family member, the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK). In addition, the TRAF-6 translocation following RANK engagement was accompanied by Akt activation, a phenomenon inhibited by lipid raft disruption [46]. Therefore, in our study,

CD40-mediated PI-3K activation might be dependent on LR translocation due to the type of TRAF upstream of its signaling.

To further explore the biological outcomes of CD40 translocation to lipid rafts, we examined the expression of co-stimulatory molecules, such as CD80 following engagement of CD40 excluded from raft domains. In the present study, we show that CD40-mediated upregulation of CD80 is abolished by exclusion of CD40 from lipid rafts and the subsequent inhibition PI-3K activation, using cells transfected with the chimeric receptor, CD40/CD45. We have previously demonstrated that CD40-mediated Akt phosphorylation dependent upon PI-3K activation resulted in the up-regulation of the co-stimulatory molecule CD86 [22]. Therefore, our study outline yet another biological effect associated with CD40 recruitment into lipid rafts, being the upregulation of CD80 subsequent to Akt phosphorylation in B cells.

In summary, this study provides direct evidence that engaged CD40 molecules translocate to lipid rafts through their transmembrane domain, independently of intracellular signaling. However, such localization was found to be an absolute requirement for PI-3 kinase and Akt activation playing a central role in autoimmune diseases such as asthma. Indeed, it has been shown that the blockade of PI-3K signaling pathway leads to enhanced B-cell switch to IgE and increased IgE level *in vivo*, two parameters characteristically seen in asthma [47, 48]. In our study, we demonstrate that CD40 translocation to lipid rafts is also required for the upregulation of the costimulatory molecule CD80. This upregulation is an important element influencing T cell-B cell interactions and the immune response against pathogens.

In conclusion, our results point out the selective signaling pathways requiring a translocation of CD40 to lipid rafts and represent an advance in the understanding of CD40 signal transduction. Given the importance of CD40 interactions in many types of cells, and

their implications in several diseases, a better understanding of CD40-mediated signaling will have a great impact on preventive and therapeutic approaches in CD40-related diseases.

## **Materials and Methods**

### **Cells**

BJAB Burkitt's lymphoma B cells (ATCC, Rockville, MD, USA) were maintained in RPMI/5% Fetal Bovine Serum (FBS). A20 murine B cells (ATCC) stably expressing human wild type CD40 (hCD40wt), empty vector (vector), CD40 chimera (hCD40/CD45), or CD40 truncation mutant (hCD40 $\Delta$ ), were maintained in RPMI/5% FBS supplemented with 400 $\mu$ g/mL Hygromycin B (Wisent, Inc., Montreal, QC). HEK 293 cells stably expressing human CD154, or empty vector were maintained in DMEM/5% FBS supplemented with 100 $\mu$ g/ml zeomycin (InvivoGen, Cederlane Laboratories, Burlington, Canada).

### **Antibodies and reagents**

The hybridomas producing the mouse mAbs directed against human CD40 (G28.5 mAb; IgG1) were obtained from ATCC. Biotin-labeled G28.5 was prepared using the method provided by Pierce (Pierce, Rockford, IL). FITC-labeled anti-mouse CD80 was purchased from BD Biosciences. Human trimeric soluble CD154 (stCD154) was a generous gift from Immunex Corporation (Seattle, WA), PP1, Ly294002 and SB203580 were purchased from Invitrogen, and methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) was from Sigma-Aldrich. Rabbit antibodies (Ab) directed against total and phosphorylated ERK, JNK, p38 MAPK, I $\kappa$ B $\alpha$ , and Akt (ser473) were obtained from Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA). Secondary antibodies used were peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit

IgG (H+L) (Jackson Laboratories). Horseradish-peroxidase-conjugated cholera toxin B subunit (HRP-CTB) was purchased from Sigma-Aldrich.

## **Mutagenesis**

Human CD40 wild type (CD40wt) and CD40 lacking its cytoplasmic domain (CD40 $\Delta$ ) were transferred from the pDOI vector into the EcoRI site of pcDNA 3.1 hygromycin vector. The CD40/CD45 construct was made by overlap extension PCR using human CD40wt cDNA template, following the protocol described by (Ho et al., 1989). Briefly, a fragment encoding the extracellular domain of human CD40 (M1-R193) was first generated from pcDNA3.1 containing human CD40wt insert using a pCMV forward primer 5'CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3' and the reverse primer 5'CAGAAATGCTATCAGTGCTCTCAGCCGATCCTGGGGACC 3' overlapping the 3'end of the CD40 extracellular domain and the 5' end of CD45 transmembrane domain. The resulting PCR fragment was amplified in second round PCR using the pCMV forward primer and a reverse primer overlapping the 66 bp of the CD45 transmembrane domain 5'ATGGAGAACAACAAGCAGGGCTATTGATGTCACAATAATCAGAAATGCCAGAAATGCTATCAGTGC 3'. A fragment encoding the cytoplasmic domain of CD40 (K215-Q277) was also generated separately, using a forward primer overlapping the 3'end of CD45 transmembrane domain and the 5'end of CD40 cytoplasmic domain: 5'GTTGTTCTCTACAAAAGGTGGCCAAGAAG 3' and a BGH reverse primer 5'TAGAAAGGCACAGTCGAGG 3'. In the final PCR round, the two fragments (CD40-TM and CD40Cyto) were mixed and amplified using the forward pCMV primer and the reverse BGH

primer to obtain cDNA encoding the chimera of CD40/CD45. The cDNA was then cloned into the KpnI-NotI restriction sites of pcDNA3.1 Hygro (Invitrogen).

As to the human CD154 plasmid construct, hCD154 was extracted from pcDNA 3.1-hCD154 (a generous gift from Dr. Daniel Yung (Hema-Quebec, Quebec)) and inserted into the KpnI-NotI restriction sites of pcDNA4-TO-myc-His A Zeocin (Invitrogen).

### **Transfections**

A20 murine B cells ( $4 \times 10^6$  cells/sample) were transfected with 20 $\mu$ g plasmid DNA (empty vector or CD40 construct as described above) using the Gene Pulser II (Biorad, Hercules, CA) (260V, 950 $\mu$ F) followed by selection. Cells expressing comparable levels of CD40 were sorted and maintained in RPMI/5% FBS supplemented with 400 $\mu$ g/mL Hygromycin B. HEK 293 cells were transfected with pcDNA4-hCD154 by DNA-calcium phosphate precipitation and selected in 100  $\mu$ g/ml of Zeocin (InvivoGen, Cederlane Laboratories, Burlington, Canada) for a stable expression.

### **Immunofluorescence Flow Cytometry**

To determine the ability of CD154 to bind, A20 murine B cells ectopically expressing CD40 construct, or BJAB B cells were incubated with media alone or Alexa-488 conjugated soluble human CD154 for 30 min on ice. To determine expression of hCD40 in A20 murine B cells transfected with CD40 constructs, cells were stained with biotin-conjugated anti-CD40 (G28-5 mAb), followed by Alexa-488-conjugated streptavidin. To determine CD80 expression, cells were stained with FITC-conjugated CD80 antibody 30 min at 4°C. Immunofluorescence was

detected using a LSRII flow cytometry analyzer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). CellQuest Pro software (Becton Dickinson) was used for data analysis.

## **Cell Stimulation**

***Intracellular signaling upstream of translocation to LR:*** BJAB B cells were pre-treated with DMSO, LY294002 (LY29; 30 $\mu$ M), PP1 (10 $\mu$ M) or SB203580 (SB; 10 $\mu$ M) for 20min at 37°C. These cells were then either non-stimulated (-) or stimulated (+) with stCD154 (10 $\mu$ g/mL) for 30min at 37°C. Cells were lysed in 1% Triton X-100 and fractionated on a sucrose density gradient, as described below.

***CD40-mediated signaling:*** Three tools have been used to induce stimulation via CD40: human recombinant soluble trimeric CD154 (stCD154), anti-CD40 mAb (G28-5), or membrane-bound CD154 (mCD154; by co-culturing cells with HEK293 stably expressing CD154). Cells ( $5 \times 10^5$ ) were stimulated with the indicated concentrations of stCD154, G28.5, anti-IgM, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the indicated lengths of time at 37°C. For the experiments showing the effect of cholesterol chelating agent, M $\beta$ CD, BJAB cells were pretreated with 10mM M $\beta$ CD (in serum-free media) for 10min at 37°C, then stimulated in serum free media. Cell stimulations were stopped using an equal volume of 2X reducing sample buffer containing protease inhibitor cocktail (Roche, Laval, QC) supplemented with orthovanadate. Samples were boiled for 5min at 95°C and analyzed by western blot.

A20 cells stably transfected with hCD40wt, hCD40 $\Delta$ , or hCD40/CD45 were co-cultured with HEK 293 cells transfected with CD154 (mCD154 (+)), or with HEK 293 cells transfected with empty vector (non-stimulated (-)) for the indicated time intervals at 37°C. Cells were then

either analysed by FACS, as described above, or lysed in 1% Triton X-100 and fractionated on a sucrose density gradient and analysed by Western Blot.

### **Western Blotting**

To detect signaling effectors, samples were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. However, for the detection of CD40, samples were separated by non-reducing SDS-PAGE. Samples were then transferred to Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with either 5% BSA/ TTBS (0.1% Tween-20, 10mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl) or 5% milk/TTBS depending upon the blotting antibody. Membranes were blotted using the indicated antibody diluted in blocking buffer and detected using the appropriate HRP conjugated secondary. Proteins were visualized using enhanced chemiluminescence (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) and recorded using a Kodak X-OMAT 2000A processor.

### **Sucrose Density Gradient Centrifugation**

Detergent resistant rafts were isolated by sucrose density gradient centrifugation as described previously. Briefly, BJAB cells and A20 cells stably expressing CD40 construct ( $1 \times 10^7$  cells/sample) were either non-stimulated or stimulated with stCD154 or mCD154 as mentioned above. Cells were washed, centrifuged, and lysed in 400 $\mu$ L 1% Triton X-100/TNE (pH 7.5; 10mM TRIS (pH 7.5), 150mM NaCl, 5mM EDTA) containing protease inhibitor cocktail and combined with an equal volume of 85% sucrose/TNE for a final 42.5% solution. The preparation of discontinuous density gradients was completed with a 2.4mL layer of

35% sucrose/TNE followed by a 1 mL layer of 5% sucrose/TNE. Samples were centrifuged in a Beckman L7-55 ultracentrifuge at 35 000 rpm overnight at 4°C using a SW 60 Ti rotor. Gradient fractions (380 µL) were collected from the top with the fraction number increasing from top to bottom. Fraction 12 corresponded with the insoluble pellet. Aliquots of each fraction or of the pooled fractions were combined with non-reducing SDS sample buffer for subsequent western blot analysis.

#### **Dot Blot analysis of ganglioside M1 (GM1)**

Immobilon P membrane (Millipore, Bedford, MA) was dotted with 10 µl of each gradient fraction obtained from the sucrose density fractionation. The membrane was then blocked for 1 hr at room temperature in 5% Milk (TBS-Tween20). GM1 was detected by adding HRP-CTB (1/2000) for 1 hr at room temperature.

**Acknowledgements**

We thank Mr. Djibril Diallo for his technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, as well as the Canadian Arthritis Network (CAN). Dr. A. Nadiri, Dr. M. Polyak and Mr. M. Jundi are recipients of an international award from CAN.

**Conflict of interest**

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## References

- 1 **Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J. C., Rangel, R. and Martinez-Valdez, H.,** Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* 2002. **107**: 167-175.
- 2 **Schonbeck, U. and Libby, P.,** The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001. **58**: 4-43.
- 3 **van Kooten, C. and Banchereau, J.,** CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000. **67**: 2-17.
- 4 **Lu, L. F., Cook, W. J., Lin, L. L. and Noelle, R. J.,** CD40 signaling through a newly identified tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) binding site. *J Biol Chem* 2003. **278**: 45414-45418.
- 5 **Grammer, A. C. and Lipsky, P. E.,** CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. *Adv Immunol* 2000. **76**: 61-178.
- 6 **Hanissian, S. H. and Geha, R. S.,** Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 1997. **6**: 379-387.
- 7 **Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T., Crute, J. J. and Kehry, M. R.,** CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 1998. **37**: 11836-11845.
- 8 **Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T. and Inoue, J.,** 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**: 28745-28748.
- 9 **Ishida, T. K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T. and Inoue, J.,** TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 9437-9442.

- 10 **Faris, M., Gaskin, F., Parsons, J. T. and Fu, S. M.**, 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**: 1923-1931.
- 11 **Ren, C. L., Morio, T., Fu, S. M. and Geha, R. S.**, 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**: 673-680.
- 12 **Li, Y. Y., Baccam, M., Waters, S. B., Pessin, J. E., Bishop, G. A. and Koretzky, G. A.**, CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK and JNK in resting murine splenic B cells. *J Immunol* 1996. **157**: 1440-1447.
- 13 **Sakata, N., Patel, H. R., Terada, N., Aruffo, A., Johnson, G. L. and Gelfand, E. W.**, Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J Biol Chem* 1995. **270**: 30823-30828.
- 14 **Sutherland, C. L., Heath, A. W., Pelech, S. L., Young, P. R. and Gold, M. R.**, Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J Immunol* 1996. **157**: 3381-3390.
- 15 **Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M. P.**, Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001. **106**: 403-411.
- 16 **Brown, D. A. and London, E.**, Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000. **275**: 17221-17224.
- 17 **Grassme, H., Bock, J., Kun, J. and Gulbins, E.**, Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem* 2002. **277**: 30289-30299.
- 18 **Grassme, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A. and Gulbins, E.**, Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 2002. **168**: 298-307.
- 19 **Hostager, B. S., Catlett, I. M. and Bishop, G. A.**, Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J Biol Chem* 2000. **275**: 15392-15398.

- 20 **Vidalain, P. O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D. and Manie, S.,** CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *Embo J* 2000. **19**: 3304-3313.
- 21 **Reyes-Moreno, C., Sharif-Askari, E., Girouard, J., Leveille, C., Jundi, M., Akoum, A., Lapointe, R., Darveau, A. and Mourad, W.,** Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 2007. **282**: 19473-19480.
- 22 **Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A. and Mourad, W.,** 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**: 7799-7806.
- 23 **Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lo, P., Terry, N., Reid, P. S. and Ford, R. J.,** 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**: 37-50.
- 24 **Rub, A., Dey, R., Jadhav, M., Kamat, R., Chakkaramakkil, S., Majumdar, S., Mukhopadhyaya, R. and Saha, B.,** Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. *Nat Immunol* 2009. **10**: 273-280.
- 25 **Vaitaitis, G. M. and Wagner, D. H., Jr.,** High distribution of CD40 and TRAF2 in Th40 T cell rafts leads to preferential survival of this auto-aggressive population in autoimmunity. *PLoS One* 2008. **3**: e2076.
- 26 **Bouillon, M., El Fakhry, Y., Girouard, J., Khalil, H., Thibodeau, J. and Mourad, W.,** Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules. *J Biol Chem* 2003. **278**: 7099-7107.
- 27 **Bock, J. and Gulbins, E.,** The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts. *FEBS Lett* 2003. **534**: 169-174.
- 28 **Xie, J., Qian, J., Yang, J., Wang, S., Freeman, M. E., 3rd and Yi, Q.,** Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol* 2005. **33**: 564-572.

- 29 **Stoddart, A., Dykstra, M. L., Brown, B. K., Song, W., Pierce, S. K. and Brodsky, F. M.,** Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* 2002. **17**: 451-462.
- 30 **Kabouridis, P. S. and Jury, E. C.,** Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett* 2008. **582**: 3711-3718.
- 31 **Janes, P. W., Ley, S. C. and Magee, A. I.,** Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 1999. **147**: 447-461.
- 32 **Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P. and He, H. T.,** Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 2000. **12**: 250-255.
- 33 **Lou, Z., Jevremovic, D., Billadeau, D. D. and Leibson, P. J.,** A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med* 2000. **191**: 347-354.
- 34 **Reth, M. and Wienands, J.,** Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1997. **15**: 453-479.
- 35 **Weintraub, B. C., Jun, J. E., Bishop, A. C., Shokat, K. M., Thomas, M. L. and Goodnow, C. C.,** Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J Exp Med* 2000. **191**: 1443-1448.
- 36 **Cheng, P. C., Brown, B. K., Song, W. and Pierce, S. K.,** Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol* 2001. **166**: 3693-3701.
- 37 **Giurisato, E., McIntosh, D. P., Tassi, M., Gamberucci, A. and Benedetti, A.,** T cell receptor can be recruited to a subset of plasma membrane rafts, independently of cell signaling and attendant to raft clustering. *J Biol Chem* 2003. **278**: 6771-6778.
- 38 **Campi, G., Varma, R. and Dustin, M. L.,** Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* 2005. **202**: 1031-1036.
- 39 **Dykstra, M. L., Cherukuri, A. and Pierce, S. K.,** Floating the raft hypothesis for immune receptors: access to rafts controls receptor signaling and trafficking. *Traffic* 2001. **2**: 160-166.

- 40 **Baird, B., Sheets, E. D. and Holowka, D.,** How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys Chem* 1999. **82**: 109-119.
- 41 **Drevot, P., Langlet, C., Guo, X. J., Bernard, A. M., Colard, O., Chauvin, J. P., Lasserre, R. and He, H. T.,** TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J* 2002. **21**: 1899-1908.
- 42 **Pierce, S. K.,** Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 96-105.
- 43 **Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N. and Pierce, S. K.,** A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* 1999. **190**: 1549-1560.
- 44 **Rodgers, W. and Rose, J. K.,** Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J Cell Biol* 1996. **135**: 1515-1523.
- 45 **Ardila-Osorio, H., Pioche-Durieu, C., Puvion-Dutilleul, F., Clause, B., Wiels, J., Miller, W., Raab-Traub, N. and Busson, P.,** TRAF interactions with raft-like buoyant complexes, better than TRAF rates of degradation, differentiate signaling by CD40 and EBV latent membrane protein 1. *Int J Cancer* 2005. **113**: 267-275.
- 46 **Ha, H., Kwak, H. B., Lee, S. K., Na, D. S., Rudd, C. E., Lee, Z. H. and Kim, H. H.,** Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. *J Biol Chem* 2003. **278**: 18573-18580.
- 47 **Fanslow, W. C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M. G., Spriggs, M. K. and Armitage, R. J.,** Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol* 1994. **6**: 267-278.
- 48 **Doi, T., Obayashi, K., Kadowaki, T., Fujii, H. and Koyasu, S.,** PI3K is a negative regulator of IgE production. *Int Immunol* 2008. **20**: 499-508.

## Figure Legends

### Figure 1. CD40 translocation into lipid rafts occurs independently of signaling events.

(A) BJAB B cells were pre-treated with DMSO, LY294002 (LY29), PP1 or SB203580 (SB) for 20min at 37°C. Cells were then either untreated (-) or treated (+) with soluble trimeric CD154 (stCD154; 10µg/mL) for 30min at 37°C. Cells were lysed and fractionated on a sucrose density gradient. Fractions corresponding to the lipid raft (R) or to the soluble membrane (S) were pooled and aliquots analyzed by non-reducing SDS-PAGE and CD40 immunoblot. (B) (*Upper panel*) hCD40wt and hCD40Δ were stably expressed in A20 murine B cells. The cells were then either unstimulated (-) or stimulated (+) with membrane-bound CD154 (mCD154) for 30 min at 37°C. Cells were then lysed and fractionated as described in A. 100µl of fractions 3 and 4 corresponding to the lipid raft domain, and 25µl of fractions 9, 10, and 11 corresponding to the soluble domain were analyzed as in A. The positions of the CD40 monomers (M) and homodimers (D) are indicated on the right side of each blot. *B. (Lower panel)* Lipid raft distribution was verified by dot blot analysis of ganglioside M1 (GM1). Data in A and B are representative of three experiments.

### Figure 2. CD40-mediated activation of Akt is dependent upon lipid raft integrity. BJAB

B cells were untreated (- MβCD) or depleted of cholesterol (+ MβCD) for 10min at 37°C. (A) Cells were stimulated with either stCD154 (10µg/mL), anti-IgM (10µg/mL) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10µM) for 15min at 37°C, before lysis. Lysates were analyzed by SDS-PAGE and blotted for phosphorylated Akt (p-Akt), JNK (p-JNK) and p38 (p-p38) as well as total p38. (B) Cells were incubated with Alexa-488-conjugated streptavidin (negative control, black) or Alexa-conjugated human CD154 (grey) for 30min on ice, and the binding of CD154 to CD40 on the

cell surface was measured by flow cytometry. Data in A and B are representative of three experiments.

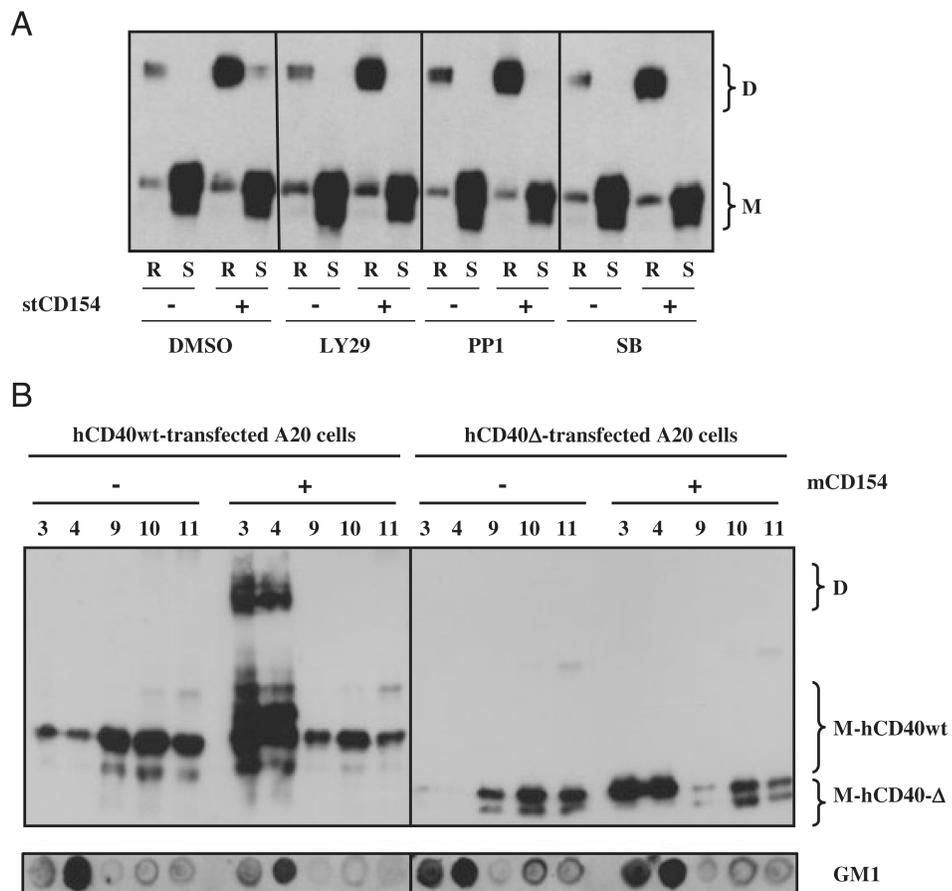
**Figure 3. Soluble human CD154 specifically binds to human CD40wt and CD40/CD45 ectopically expressed in mouse B cells, while it differentially activates these receptors.**

A20 murine B cells were transfected with construct containing vector alone (vector), human CD40 wild type (hCD40wt) or hCD40/CD45 chimeric receptor. (A) Cells were stained with either Alexa-488-conjugated streptavidin (black) or biotin-conjugated anti-hCD40, G28-5 mAb (grey). (B) Transfected cells were incubated with Alexa-488-conjugated streptavidin (black) or Alexa-conjugated human CD154 (grey) for 30min on ice. Cells in A and B were analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) values are indicated. (C) Transfected cells were either incubated with media alone (non-stimulated, NS), stCD154 (5µg/ml) or with anti-CD40mAb (G28.5; 5µg/ml) for 5 min at 37°C, prior to lysis. Samples were analyzed by SDS-PAGE and blotted for phosphorylated Akt (p-Akt), p-ERK, p-JNK and p-p38. Membranes were stripped and blotted for total ERK. Data in A/B and in C are representative of three and four experiments, respectively.

**Figure 4. CD80 expression was unbraided upon engagement of chimeric CD40/CD45 receptor.**

A20 B cells transfected with vector, hCD40wt or hCD40/CD45 were either incubated with media (non-stimulated, NS) or with anti-CD40 (G28.5 mAb; 5µg/ml) overnight at 37°C. Cells were stained with either FITC-conjugated isotype control (black) or FITC-conjugated CD80 antibody (grey) and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity values (MFI) are indicated. Data are representative of three experiments

**Figure 5. CD40-mediated CD80 upregulation is dependent on PI-3K activation.** A20 B cells transfected with hCD40wt were untreated or treated (+LY294002) with 50 $\mu$ M Ly294002 for 1 hr at 37°C. Cells were then stimulated overnight with either media (non-stimulated, NS) or with anti-CD40mAb (G28-5; 5 $\mu$ g/ml). Cells were stained with either FITC-conjugated isotype control (black) or FITC-conjugated CD80 antibody (grey) and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity values (MFI) are indicated. Data are representative of two experiments.



**Figure 1**

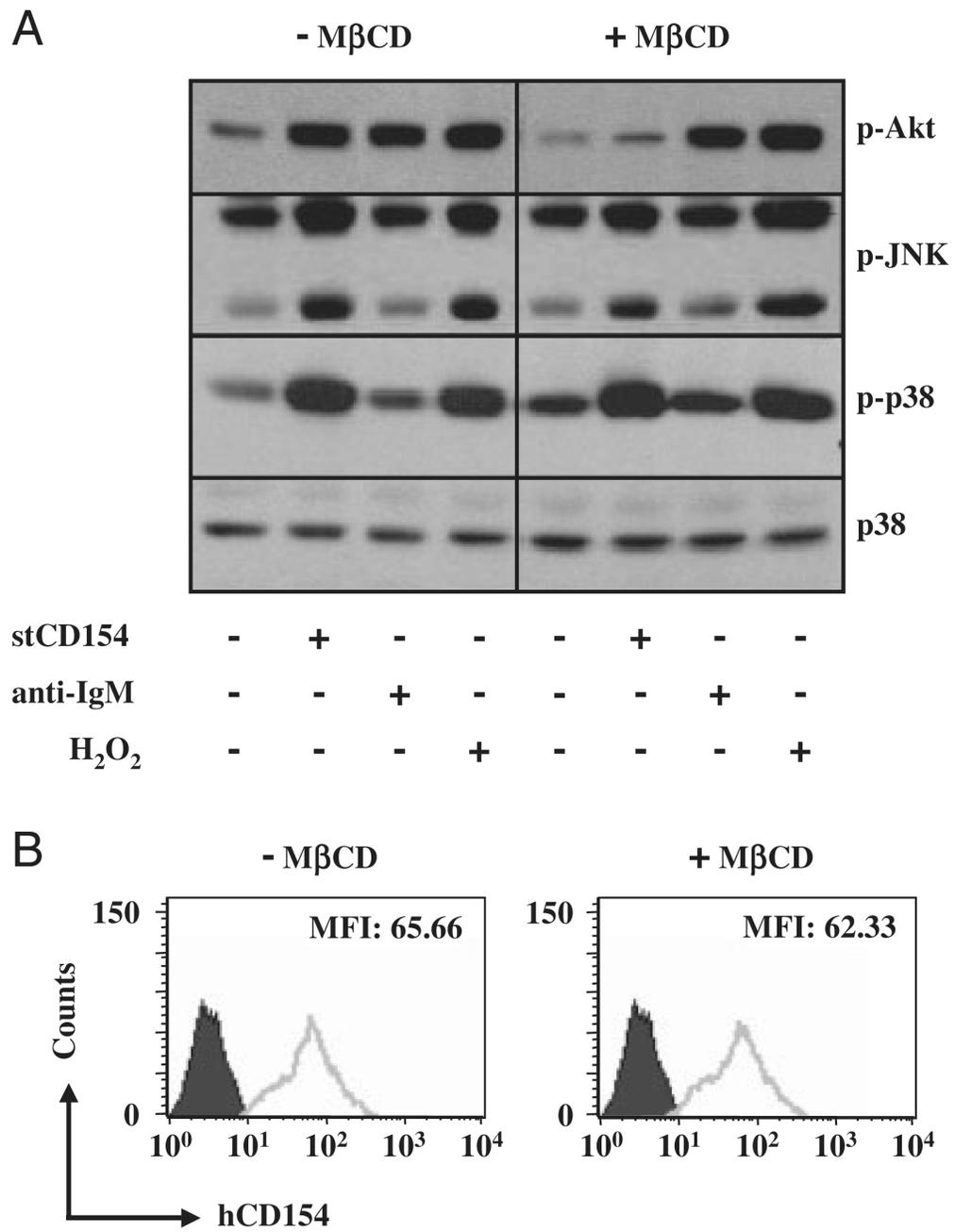


Figure 2

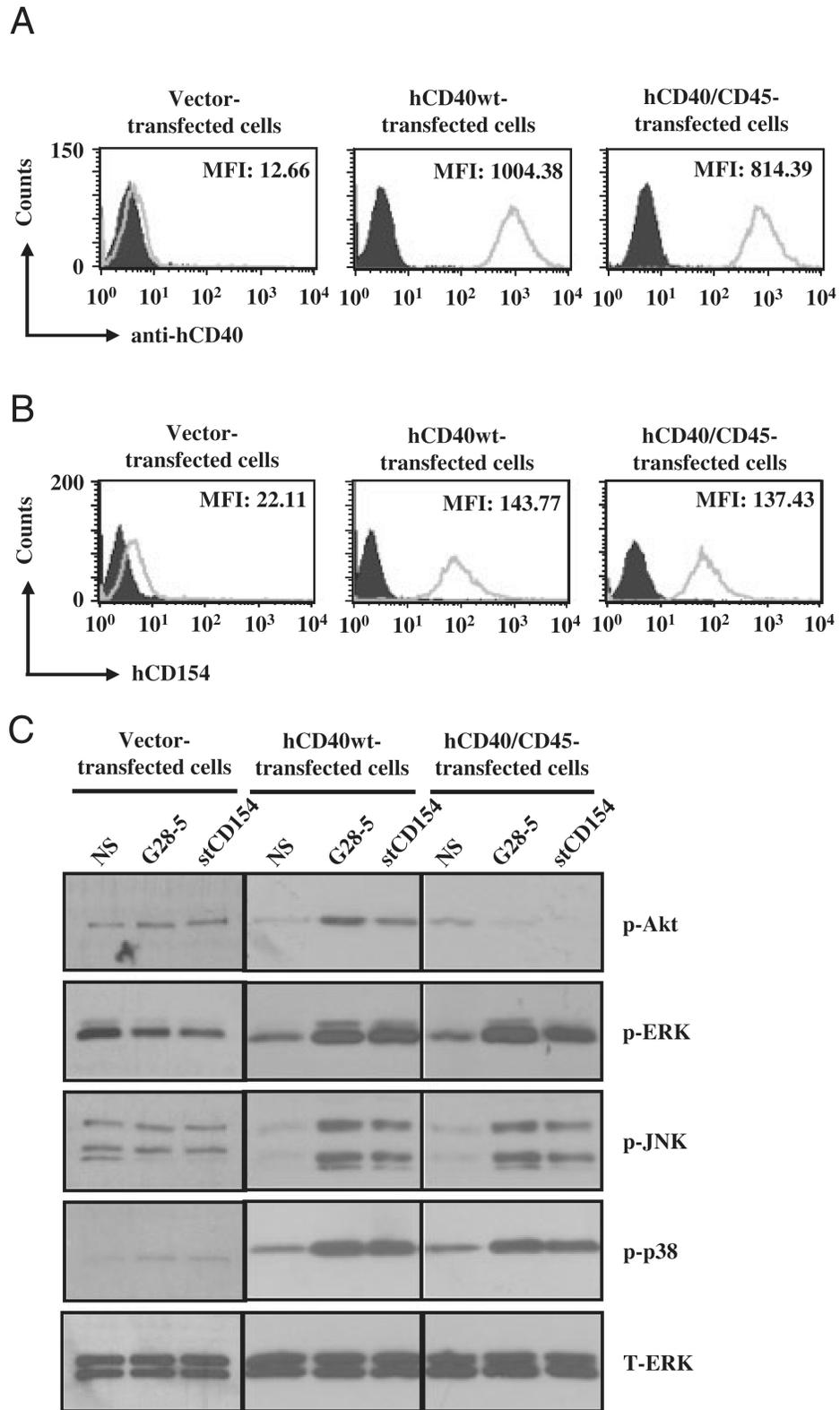
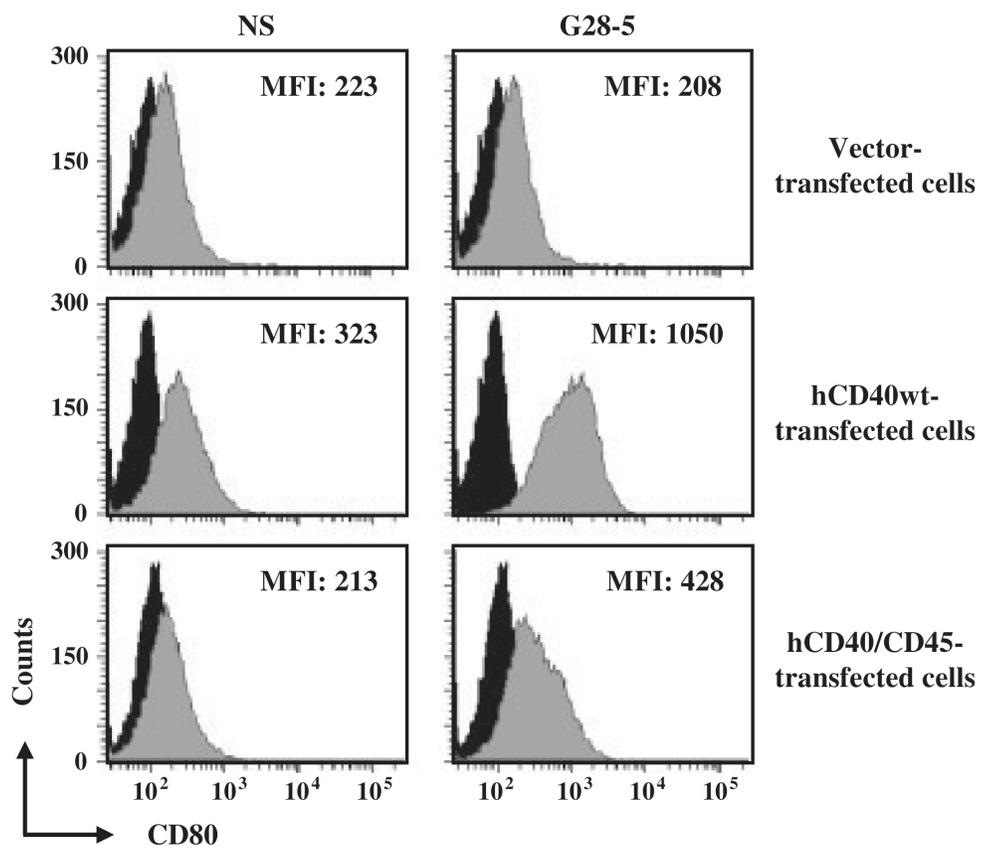
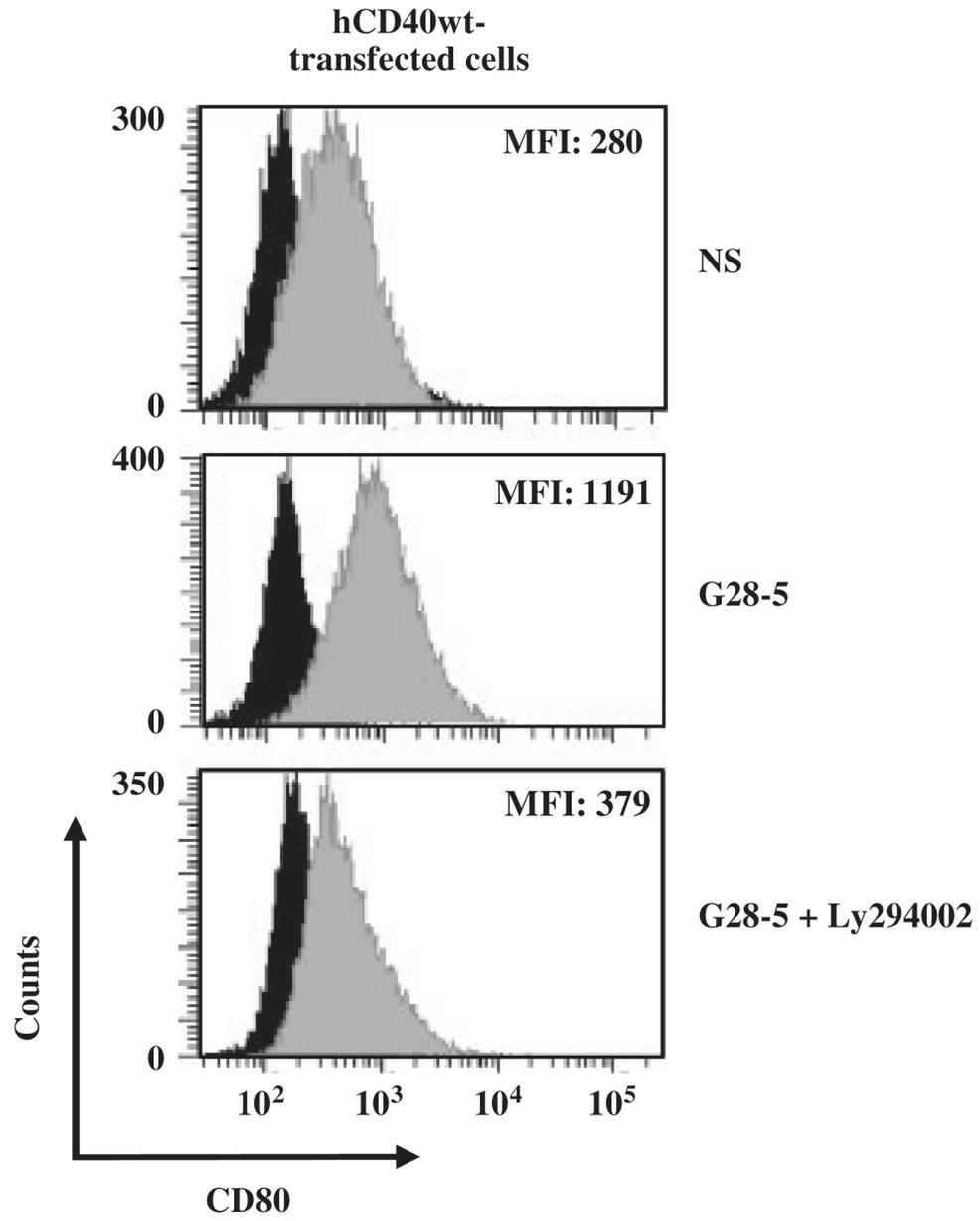


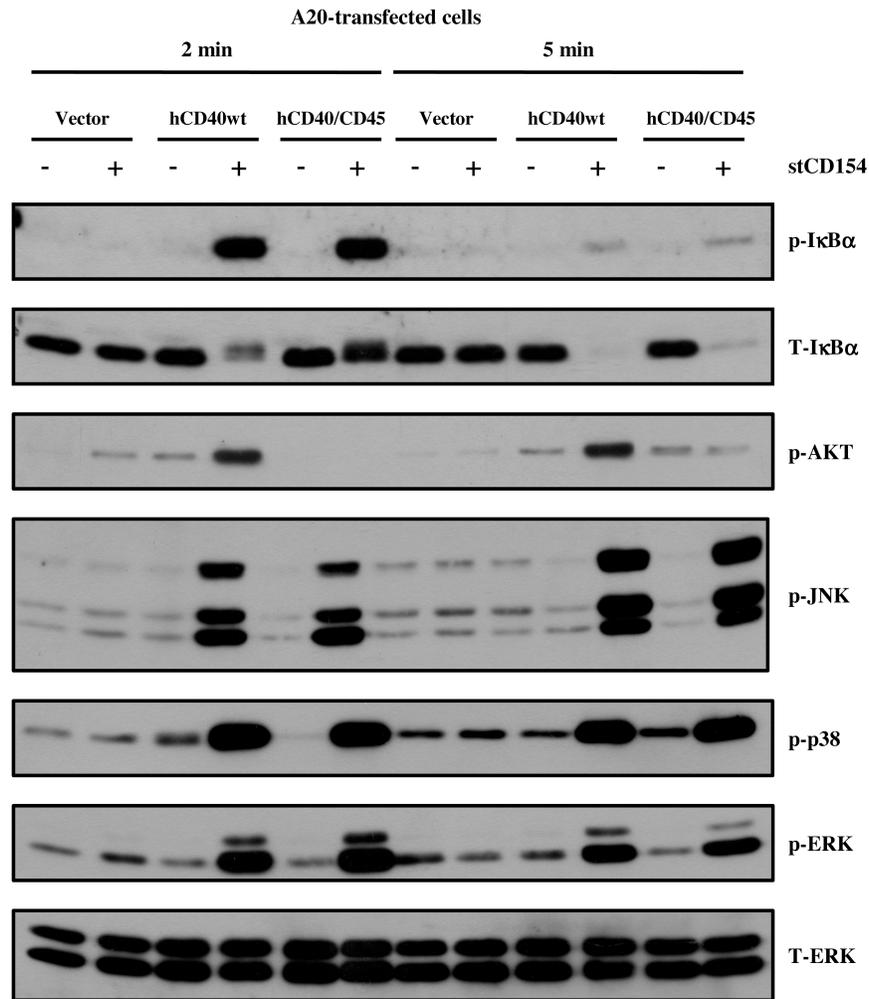
Figure 3



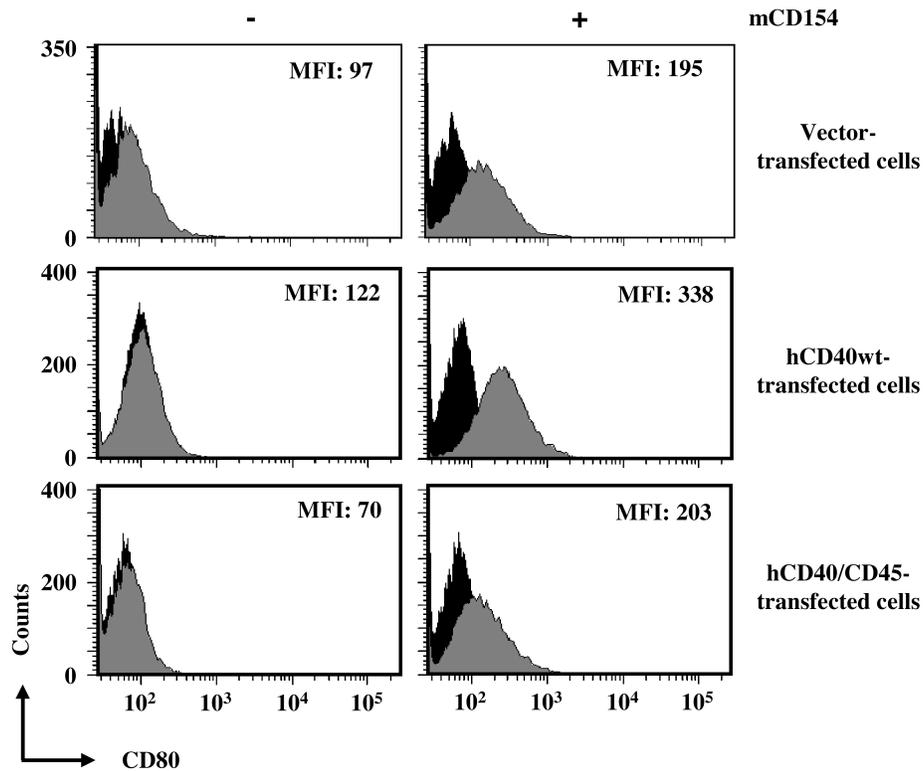
**Figure 4**



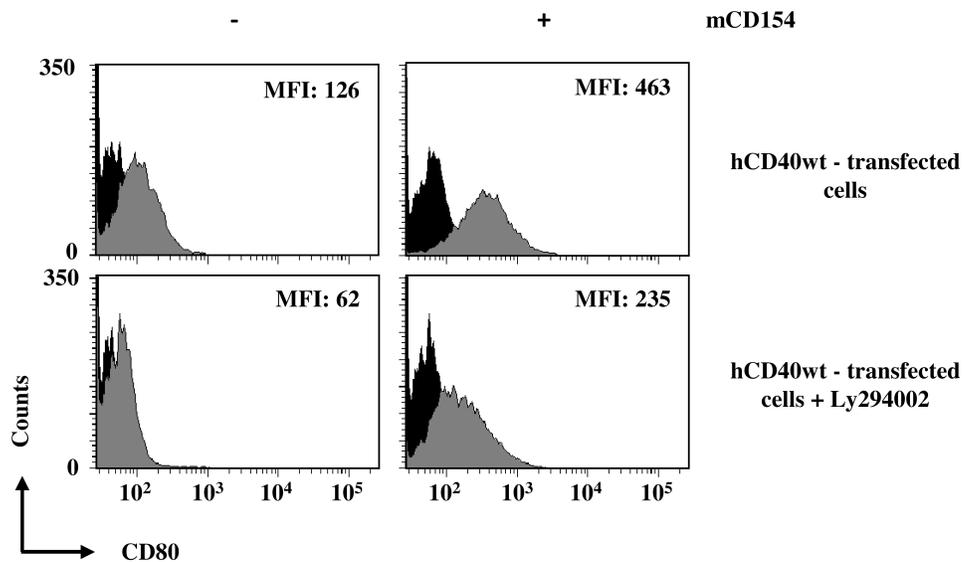
**Figure 5**



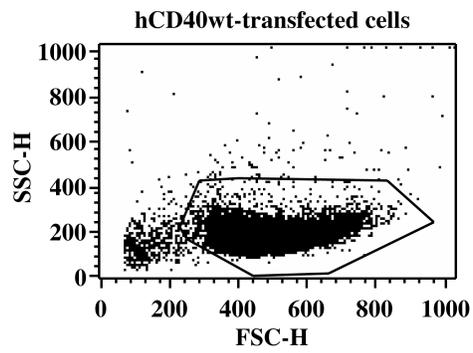
**Figure S-1. Soluble human CD154 differentially activates hCD40wt or hCD40/CD45.** A20 B cells transfected with vector alone (vector), human CD40 wild type (hCD40wt) or CD40 transmembrane mutant (hCD40/CD45) were incubated with media alone (-) or with soluble trimeric CD154 (+) (stCD154; 5μg/ml) for 2 min and 5 min at 37°C, prior to lysis. Samples were analyzed by SDS-PAGE and blotted for phosphorylated IκBα (p-IκBα), p-Akt, p-JNK, p-ERK, p-p38. Membranes were stripped and blotted for total IκBα (T-IκBα), and total ERK (T-ERK). Data is representative of three experiments.



**Figure S-2. Human CD154 differentially modulate CD80 expression via CD40wt or CD40/CD45.** A20 B cells transfected with vector, hCD40wt or hCD40/CD45 were either non-stimulated (-) or stimulated with membrane-bound CD154 (+) overnight at 37°C. Cells were then stained with either FITC-conjugated isotype control (black) or FITC-conjugated CD80 antibody (grey) and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity values (MFI) are indicated. Data is representative of two experiments.



**Figure S-3. CD80 upregulation induced by CD154 stimulation of CD40 is dependent on PI-3K activation.** A20 B cells transfected with hCD40wt were either non-stimulated (-) or stimulated with membrane-bound CD154 (+), in the presence or absence of 50  $\mu$ M LY294002, overnight at 37°C. Cells were stained with either FITC-conjugated isotype control (black) or FITC-conjugated CD80 antibody (grey) and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity values (MFI) are indicated. Data is representative of two experiments.



**Figure S-4. Gating strategy in FACS analysis.** A20 cells were analyzed by FACS analysis. The closed line sketch represents the gated population throughout the analysis, which was done for 10,000 events.

**Chapitre 4. La cystéine 238 du CD40 est nécessaire pour  
l'activation des cellules B.**

#### ***4.1. Mise en contexte***

La translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques serait une étape précurseur à l'homodimérisation du CD40. En effet, suite à un engagement du CD40, la forme tronquée du CD40 peut s'associer aux radeaux lipidiques sous sa forme monomérique. Ce qui suggère que la forme monomérique du CD40 est capable de s'associer aux radeaux lipidiques. Par ailleurs, il a été démontré que l'homodimérisation du CD40 nécessitait la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines à la position 238. De plus, il a été démontré que l'homodimérisation du CD40 était nécessaire pour l'induction de l'expression du CD80 et du CD86. Par conséquent, l'étude des signaux nécessitant la formation du CD40 homodimère serait utile pour une meilleure compréhension du rôle du CD40 dans les maladies auto-immunes.

#### ***4.2. Contribution des co-auteurs***

**Malek Jundi:** La planification et la réalisation des expériences reliées à l'induction de l'homodimérisation du CD40 (figure 1, 2), la production de ROS induite par le CD40 (figure 3), l'induction de l'expression du CD23 à la surface des cellules A20 et l'analyse de la cytométrie (figure 4A et 5). Ainsi que la rédaction et la correction de l'article.

**Amal Nadiri:** La planification et la réalisation des expériences reliées à l'induction de l'expression du CD80, CD69, mCD40 et mMHC-Class II à la surface des cellules A20 et l'analyse de la cytométrie (figure 4B, C, D, E et figure 6). Ainsi que la rédaction et la correction de l'article.

### ***4.3. Résumé***

Le CD40, un membre de la famille des TNFR, joue un rôle dans la réponse immunitaire adaptative et innée. Le CD40 est aussi impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes. L'engagement du CD40 par son ligand naturel, le CD40L, ou par des anticorps monoclonaux réticulés induit l'oligomérisation du récepteur. Or, cette oligomérisation impliquerait l'homodimérisation du CD40 moyennant la formation du pont disulfure au niveau de la cystéine-238 située au niveau de la partie intracellulaire du CD40. Ce processus requiert une translocation du récepteur vers les radeaux lipidiques. L'objectif de cette étude est d'élucider l'effet biologique du CD40 homodimère, en particulier sur les marqueurs d'activation des cellules B. Nos résultats suggèrent que l'homodimérisation du CD40 induite par le stress oxydatif (ROS) peut avoir lieu indépendamment de l'association du CD40 avec son ligand. De plus, l'engagement du CD40 suivi par l'induction de ROS peut amplifier la formation du CD40 homodimère. Par ailleurs, la production de ROS qui mènerait à l'activation du JNK et l' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  serait indépendante de la formation du CD40 homodimère. La formation du CD40 homodimère serait importante pour l'activation des cellules B puisqu'il est nécessaire pour l'amplification du niveau d'expression du CD23, CD69 et CD80. Or, cette amplification induite par le CD40 homodimère semble nécessiter le recrutement du JAK3 au niveau de la queue cytoplasmique du CD40 et l'activation du PI-3 kinase. Par conséquent, nos résultats suggèrent un nouveau rôle pour le CD40 homodimère. De plus, ils permettent aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques contre les maladies auto-immunes.

## **Cysteine-238 Mediated CD40 Homodimer is Required For B cell Activation**

Amal Nadiri\*, Malek Jundi\*, Walid Mourad\*\*

From the Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital St-Luc, Montréal, QC, Canada, H2X 1P1

- These authors contributed equally to this work

Running title: CD40 homodimer enhance B cell activation

**\*\* To whom correspondence should be addressed:** Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Saint-Luc, Pavillon Edward Asselin, Local: 415, 264 René Lévesque Est, Montréal, QC, H2X 1P1, Canada; Tel: 514-890-8000 ext 35287; fax 514-412-7314;

**Keywords:** Cys-238 residue, CD40 homodimer, B cells, oxidative stress, autoimmune diseases.

## **Abstract**

CD40-a member of TNFR superfamily, plays a central role in both innate and adaptive immunity and has been implicated in several autoimmune diseases. Engagement of CD40 by its natural ligand CD40L or by cross-linked monoclonal antibodies, results in clustering and/or oligomerization of the receptor. There is growing evidence to indicate that CD40 oligomerization involves disulfide-linked (dl) homodimer formation which is mediated by Cysteine-238 residue of the cytoplasmic tail. This process is dependent on translocation of engaged receptors to lipid rafts. The present study was designed to elucidate the biological effects of CD40 homodimer, in particular, on the early markers of B cell activation. Our results indicate that oxidative stress (ROS) induced CD40 dimerization mediated by the Cys-238 residue can take place even in the absence of ligand binding, and is augmented by receptor engagement. Furthermore, ROS production leading to JNK and I $\kappa$ B $\alpha$  activation downstream of CD40 is independent of CD40 homodimer formation. CD40 homodimer formation following receptor engagement, parallels full activation of B cells as reflected by enhanced expression of CD23, CD69 and CD80, and seems to require the recruitment of JAK3 to the cytoplasmic tail of CD40 with subsequent activation of PI-3 kinase. Thus, our results highlight new role of CD40 homodimer and identify a new target for therapeutic strategies in autoimmune disease.

## **Introduction**

CD40—a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, is expressed on a number of different cell types, including B-Cells, macrophages, dendritic cells, endothelial cells, and fibroblasts, and plays a critical role in the regulation of immune response and host defense [1]. Ligation of CD40 on B cells with its major receptor, CD154 (CD40 ligand) initiates bi-directional signaling which induces production of various lymphokines [2-4], chemokines [5-7], and expression of CD27 and CD70 [8,9] to regulate isotype switching, migration, proliferation, rescue from cell death and development of humoral and cellular immunity [10-12]. CD40 can also synergise with B cell antigen receptor (BCR) and/or the IL-4 receptor, MHC class II to induce B cell proliferation [13,14].

Like other members of the TNFR family, CD40 utilizes adapter proteins called TNFR-associated factors (TRAFs) that bind to different structural motifs in the CD40 cytoplasmic domain [15-18] for downstream signal transduction after ligand binding. Following CD40 ligation, TRAF2 and 3 are recruited to cytoplasmic tail of CD40 [19], which then allows CD40-ligand complex to translocate to cholesterol-rich membrane microdomains, or lipid rafts [20,21] whose integrity is required for CD40 translocation and subsequent activation of stress-activated protein kinases (SAPKs) [20,22]. Following raft localization, exchange of TRAFs binding to CD40 takes place [20,23,24]. As TRAFs themselves have no known enzymatic activity, they serve as adapter proteins in CD40 signaling. Thus, TRAFs aggregation, initiated by the clustering of CD40 and translocation to lipid rafts, leads to their interactions with downstream signaling molecules. At least several distinct CD40 signaling pathways appear to be linked to TRAF proteins [25], and activation of NF- $\kappa$ B has been shown to be critical for some, but not all, CD40 effector functions [7,26-29]. Enhanced activity of the CD40 pathway in B-cell lineage is associated with many autoimmune diseases including multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus (SLE) [30,31] and affects the host response during sepsis in animal models [32], and in humans [33].

Receptors are displayed on the surface of cells in the form of monomers in equilibrium with a small population of receptor dimers. Ligand binding to the extracellular domain stimulates homodimerization of receptor monomers or structural rearrangement within preformed dimers

to induce structural modifications [34-36] creating specific binding sites for downstream signaling molecules [37], and affecting receptor mobility at the cell surface and in intracellular trafficking [38]. Preformed CD40 homodimers have been reported in several cell lines [39,40]. Integrity of lipid raft microdomains is necessary for CD40 homodimer formation mediated by the cysteine residue at position 238 in the cytoplasmic tail of CD40, independently of any signaling [41]. However, homodimer of CD40 is an absolute requirement for IL-8 secretion, activation of phosphatidylinositol 3-kinase, and regulated expression of B7.2 [40,41]. It has been reported that oxidative stress could promote rapid oxidation of surface receptors to form homodimers following ligand binding [42] and affect signaling [43]. Here we report that CD40 ligation, leads to the production of ROS independently of CD40 homodimer formation, and CD40 mutated at Cystein-238 induce the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  the phosphorylation of JNK to the same extent as CD40 homodimer. Eventhough CD40 C238A mutant failed to dimerize following ligation, it actively mediated the induction of early markers of B cell activation, however, this effect was significantly enhanced by Cystein-238 mediated dimerization of CD40.

## **Materials and Methods**

### ***Cells***

The A20 is B lymphoma cell line originally derived from a spontaneous reticulum cell neoplasma from BALB/c (ATCC, TIB 208, Manassa VA). A20 cells ectopically expressing human wild type CD40 (hCD40-WT), hCD40 mutants (hCD40-C238A, hCD40-P227A), or empty vector- (Control) were maintained in RPMI1640 medium supplemented with 5% (v/v) FBS, 2mM l-glutamine, 1mM of sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, and 100 $\mu$ g/ml streptomycin and 400 $\mu$ g/mL hygromycin B (Wisent, Inc., Montreal, QC).

### ***Antibodies and Reagents***

Human anti-CD40 monoclonal antibody (mAb) G28-5 (mouse, IgG1), and rat anti-CD40 monoclonal antibody (mAb) FGK45.5 (rat, IgG2a) with appropriate isotype control were

produced in our laboratory. Biotin-labeled G28.5 was prepared following the protocol provided by Pierce (Thermo Scientific, Rockford, IL USA). Goat anti-mouse IgG (H+L)-AlexaFluor-488-conjugated, Streptavidin-A488, MAPKs inhibitors, Ly294002, SB203580, U0126, and carboxy-H2DCF-DA probe were purchased from Invitrogen (Life technologies, Burlington ON, Canada). Rabbit Ab directed against the phosphorylated form of JNK and IκBα were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Secondary antibodies used were peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (H1L) and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Diamide and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich. Biotin-conjugated murine anti-CD23 (B3B4) (rat, IgG2ακ), was purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada), anti--mouse CD69 FITC (H1.2F3), FITC Hamster Anti-Mouse CD80 and Armenian Hamster IgG2, κ, were from BD Pharmingen™ FITC anti-mouse I-A<sup>b</sup> ( AF6-120.1), mouse, IgG2ακ were from BioLegend)

### ***Fluorescence measurement of intracellular ROS***

ROS production in A20 cells was measured by flow cytometry using the carboxy-H2DCF-DA probe as described by the manufacturer (Invitrogen). Briefly, cells were washed extensively and re-suspended in phenol-red-free and FBS-free RPMI at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml, cells were then pre-treated with 10 μM of carboxy-H2DCF-DA for 30 min in the dark at 37°C. Following pre-treatment,  $0.2 \times 10^6$  cells were distributed into FACs tubes, washed, and stimulated with 10 μg/mL of G28-5, matching isotype control or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, for 30 min in the dark at 37°C. After treatment cells were washed and re-suspended in phenol-red-free and FBS-free RPMI and analysed.

### ***Western blotting***

Western blotting was done as described previously [44]. Briefly, to detect signaling effectors, samples were analyzed by SDS- PAGE under reducing conditions. However, for the detection of CD40 homodimer, samples were separated under non-reducing SDS-PAGE. Samples were then transferred to Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) and blocked with either 5% BSA/TTBS (0.1% Tween-20, 10mM Tris (pH 7.5), 100mM NaCl) or 5%

milk/TBST depending upon the blotting antibody. Membranes were blotted using the indicated antibody diluted in blocking buffer and detected using the appropriate HRP-conjugated secondary antibody and enhanced chemiluminescence (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

### ***cDNA Cloning and Stable transfection of B-cell lines***

For human CD40-WT and CD40-C238A, cDNA were cloned as described previously [41,45]. The mutant affecting JAK3 binding in the cytoplasmic domain of hCD40 was generated using the Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). PCR-directed mutagenesis was used for the construction of CD40 mutant P227A, affecting JAK3 binding [22,46]. Briefly, CD40-mutants were PCR amplified using oligonucleotides primers containing appropriately positioned point mutations. The PCR product was inserted into pCDNA3.1 used as a template. DNA sequencing confirmed that all PCR products were free of any undesired mutations. The pCDNA 3.1 empty vector-transfected cells were used as control. A20 cells ( $4 \times 10^6$  cells/sample) were transfected with 20 $\mu$ g plasmid DNA (hCD40-WT and hCD40-C238A or empty vector) using the Gene Pulser II (Biorad, Hercules, CA) (260V, 950 $\mu$ F). For hCD40-P227A cDNA, A20 cells were transfected by electroporation with the Neon<sup>®</sup> transfection system (Invitrogen) (1350V, 20ms, 2 pulsation) following the manufacture instructions. Surface expression of transfected CD40 was determined by immunofluorescence flow cytometry. Clones with similar levels of transfected CD40 were used for experiments.

### ***Immunofluorescence Flow Cytometry***

A20 cells ( $5 \times 10^5$  cells/ sample) stably expressing the different CD40 constructs were incubated in phosphate-buffered saline (PBS; 140mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)/2% FBS with indicated mAb on ice for 30 min. Samples were then incubated with A488-goat anti-mouse IgG (H+L) antibody or streptavidin-Alexa-488, on ice for 30 min. Immunofluorescence was detected using a LSRII flow cytometry analyzer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) was used for data analysis.

### ***Diamide Treatment***

Dimerization of CD40 by the pro-oxidant (diamide) was done essentially as described by Ozsoy *et al.* [43]. Briefly, A20 transfected cells with hCD40-WT, hCD40-C238A or empty vector (Vect), as a negative control were stimulated by incubating  $2 \times 10^6$  cells with 1mM of diamide (Dia) in 100  $\mu$ L of PBS for 15 min at 37°C or left untreated (NT). Cells were then washed and lysed in 50  $\mu$ L of lysis buffer. CD40 dimerization was assessed by western blot in non-reducing condition as described previously [41]. Similarly, A20 cells transfected with hCD40-WT were pre-treated with different concentrations of diamide for 15 min followed by stimulation with G28-5 (1  $\mu$ g/  $1 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ L of PBS). A20 cells transfected with empty vector were used as a negative control. After lysis, 50  $\mu$ g of proteins in non-reducing condition were analysed by western blot.

### ***Statistical analysis***

Student *t*-test was used for statistical analysis (GraphPad Prism), and data are shown as mean $\pm$  SEM.

## **Results**

### ***Effect of Oxidative Stress on CD40 homodimer formation***

CD40 is characterized by having several cysteine residues in the extracellular as well as the intracellular domain raising the possibility that redox-induced modifications of these cysteine residues might induce the CD40 homodimer formation as has been shown for other members of TNFR superfamily (TNFR1 and TNFR2) [43]. To test this possibility, we examined the effect of a thiol-oxidant (diamide) that can readily diffuse through cell membranes, on CD40 self-association. A20 B cells expressing ectopically either hCD40-WT or hCD40-C238A with comparable levels (Fig.1A) were treated with diamide (1mM) and analyzed for CD40 homodimer formation as described before [41]. Treatment of A20-hCD40-WT cells resulted in the formation of CD40 forms with molecular masses consistent with the self-association of CD40 into a dimer (Fig. 1A). However, no such higher molecular weight forms of CD40 were observed when A20-hCD40-C238A cells were similarly treated the diamide (Fig. 1A), even

though, other cysteines in its extracellular domain were present. Taken together, these results suggest that oxidative stress, in the absence of the ligand is sufficient to induce and/or increase the self-interaction of CD40, and that this event is mediated only by the cysteine-238 in the cytoplasmic tail of CD40.

Oxidative stress is increasingly recognized as an underlying cause of a broad variety of inflammatory diseases. To determine whether lower level of oxidative stress was sufficient to augment G28-5 mAb induced CD40 dimer formation, we examined the dimer formation in A20-hCD40WT and A20-hCD40-C238A cells in the presence or absence of anti-CD40 mAb G28-5. Cells were pretreated with a concentration of diamide (20 $\mu$ M) that had no discernable effect on the dimer formation comparable with vehicle (Fig. 1B). In the presence of this low level of pro-oxidant, ligation of CD40 in A20-hCD40-WT cells enhanced CD40 dimers (Fig. 1B-C). However, no such effect was observed when on A20-hCD40-C238A cells were similarly treated (Fig. 1B-C). Our data illustrates two important findings. First, low concentration of diamide (20 $\mu$ M) had no effect on CD40 dimer formation when compared with diluent. Second, pretreatment with 20 $\mu$ M of diamide augmented CD40 dimer formation by G28-5. Most importantly, this effect was mediated by cysteine-238 in the cytoplasmic tail of CD40 (Fig. 1A-B). Time course treatment of A20-hCD40-WT cells with G28-5 resulted in continuous increase in the CD40 homodimer over time, whereas, there was no detectable level of CD40 dimer formation in A20-hCD40-C238A cells treated similarly (Fig 2).

#### ***CD40-mediated ROS production occurs independently of CD40 homodimerization***

Reactive oxygen species (ROS) have been identified as important signal mediators for many cell surface receptors. It has been previously reported that ROS are generated upon CD40 engagement, resulting in JNK activation and enhancing IL-6 secretion, and this effect is required for TRAF3 association with CD40 as well as Rac1 activation [47], and further downstream signaling events [41,48]. The role of ROS in the formation of the CD40 homodimer after CD40 cross-linking, was suggested by using an anti-oxidant ROS scavenger on BJAB cells [41]. Treatment with ROS scavenger decreased significantly the CD40 homodimer formation, however, there was no evidence if the monomer will affect the ROS production and subsequent JNK phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. To address this question,

we investigated the CD40-induced production of intracellular ROS in A20 cells expressing hCD40-WT, hCD40-C238A or empty vector as a control. Cells were incubated with a redox-sensitive fluorescent probe (carboxy-H<sub>2</sub>DCF-DA) continuously during the CD40 stimulation. Increase in fluorescence intensity produced by CD40-stimulated ROS in A20-hCD40-WT and A20-hCD40-C238A transfected cell was comparable (Fig. 3A, Fig S-1), however in A20 expressing empty vector, used as control, ROS production was observed only after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (Fig. 3A, Fig S-1). We further analysed some signaling pathways such as JNK and NF- $\kappa$ B activation following ROS production. A20-hCD40-WT and A20-hCD40-C238A cells were left either untreated or treated with 1  $\mu$ g/ml of G28-5 for different times. Treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control. After treatment, protein samples were probed with polyclonal Abs directed against the phosphorylated form of JNK and  $\kappa$ B $\alpha$ , and  $\beta$ -actin was used as loading control. Equivalent levels of activation of JNK and  $\kappa$ B $\alpha$  over time was observed after engagement of hCD-WT and hCD40-C238A (Fig. 3B), suggesting that ROS production downstream of CD40 stimulation does not require CD40 homodimerization, and that CD40 homodimer resulting in higher order oligomerisation of CD40-complexes induces some other specific signaling pathways.

#### ***Cys-238 mediated CD40 dimers enhance B cell activation***

CD40 signals have been shown to induce homotypic adhesion of B cells, mediated by up-regulation of a number of cell surface molecules, including LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and CD23 [49]. Using an thiol-alkylating agent (IA), it was shown that CD40 homodimer formation is required for CD40-induced PI-3 Kinase activation and subsequent CD86 induction in human B Cell line [40], suggesting that different degrees of CD40 oligomerization result in different cellular responses. Thus, we examined the possible role of CD40 homodimers in the activation of CD40-induced signaling pathway in B cell activation i.e., surface expression of CD23, CD69 and CD80. Our results indicate that upon CD40 stimulation of A20-hCD40-WT cells with G28-5 for 24hrs, there was significant increase in surface expression of activation markers (CD23, CD69 and CD80) (Fig 4A-B and C; Fig S-2A-B and C). This effect was more pronounced for CD23 (Fig 4A) and CD80 (Fig 4C; Fig S-2C) after 48hrs stimulation, whereas no such increase was observed in surface expression of

CD69 after long-term stimulation (Fig 4B; Fig S-2B). However, there was a modest increase in the expression of CD23 and CD80 following treatment of A20-hCD-C238A for 24h and 48h (Fig 4A and Fig 4C; Fig S-2A and 2C). There was no difference in response when these cells were treated PMA (Fig 4A; Fig S-2A). Furthermore, induction of CD40 and MHC-II expression was comparable between A20-hCD40-WT and A20-hCD40-C238A following G28-5 treatment for 24h (Fig 4D and Fig 4E; Fig S-2D and 2E). These results further strengthened our hypothesis that different signaling events are initiated depending on the level of CD40 oligomerization.

### ***The P-227 residue in the cytoplasmic tail of CD40 is required for CD23 expression***

After CD40 ligation, signal transduction events are initiated by recruiting adaptor molecules such as TRAFs and JAK3 to the cytoplasmic tail of CD40 [50]. Indeed, engagement of CD40 induces tyrosine phosphorylation and activation of JAK3, which is constitutively associated with a proline-rich sequence in the membrane-proximal region of CD40. Thus, we investigated the effect JAK3 binding in mediating CD40 induced expression of CD23. The A20 cells expressing hCD40-WT or hCD40-P227A (which fails to bind JAK3) to the same levels, were stimulated with a G28-5 or PMA (positive control), or left untreated (negative control). Stimulation of A20-hCD40-P227A cells failed to upregulate CD23 upon CD40 engagement after 24 h (Fig 5A) and 48hrs of stimulation (Fig 5B). However these cells responded to the same level as A20-hCD40-WT when treated with PMA (Fig 5). These results indicate that JAK3 plays an important role in mediating CD40 signal transduction in term of CD23 expression and subsequent B cell activation.

### ***Role of PI-3kinase and MAP kinase in regulating CD23***

MAPK is a key player in some important cellular signaling pathway. To gain insight into the molecular mechanism involved in the induction and the up-regulation of CD23 in B cell line through CD40 ligation, several known CD40-initiated signaling pathways were targeted using biochemical inhibitors. A20 cells expressing hCD40-WT were either pre-treated with vehicle (DMSO) or inhibitors of the PI-3 kinase (LY294002), ERK (U0126) or p38 MAPK (SB203580) pathways. Cells were then either left unstimulated or stimulated with G28-5 for 24hrs, and assessed for the surface expression of CD80 (Fig 6A) and CD23 (Fig 6B). Our

results indicate that only PI-3 kinase inhibitor (LY294002) significantly abrogated the expression of CD80 on A20-hCD40-WT cells (Fig 6A), whereas the expression of CD23 was significantly affected by the pre-treatment with all the inhibitors used (Fig 6B) suggesting that CD23 is regulated by the P-I3K/AKT pathway.

### ***Discussion***

In the current study we investigate the role of Cys-238 residue in CD40 clustering and homodimerisation, and subsequent B cell activation. Our results showed that the Cys-238 residue is an absolute requirement for CD40 homodimerisation and for full activation of B cells, which seems to be mediated through JAK3 association with CD40- and PI-3 kinase activation.

Engagement of various members of TNFRs family triggers self-association, dimerization or even oligomerization [51]. It is well established that such an event is commonly required for maximal signal transduction [40,52]. Preformed CD40 homodimers were observed on some human B cell lines and CD40-transfected cells. CD40 ligation with stCD154, mCD154 or with cross-linked anti-CD40 mAbs leads to a rapid and significant increase in the levels of CD40 homodimers in different cell types [41]. The observation that CD40 has numerous cysteine residues in the extracellular domain and only one in the intracellular domain, together with the prior observation that the antioxidant NAC significantly prevents the formation of dl-CD40 homodimers, without interfering with the translocation of CD40 into DRMs [41], raised the intriguing possibility that the oxidative stress could induce CD40 homodimerization. It is well established that oxidative stress is a cause for a broad variety of inflammatory diseases. Indeed, ROS could induce post-translational modification of proteins which may play an important role in cell signaling [53,54]. Most of the disulfide bonds are mediated by two cysteines upon oxidation by ROS. Accordingly, in the present study we sought to determine whether pro-oxidant conditions were sufficient to modulate oligomerization of CD40 molecules. Herein, we report that oxidative stress is sufficient to promote self-interaction of CD40 independently of biological ligand. Our results suggest that the presence of a high levels of ROS observed in chronic human diseases such as neurodegeneration, Crohn's disease, and cancer, could enhance CD40 self-association prior to the ligand binding. In addition, these

diseases are also characterized by deregulated inflammatory responses. As ROS seems to promote CD40 dimerization, this could actively participate in the deregulated inflammatory responses by in part up-regulation of inflammatory cytokines [55].

Signaling via CD40 triggers the generation of ROS in various cell type, and is important for CD40-mediated signaling and gene expression [56]. Furthermore, previous reports demonstrate that CD40-mediated proximal events, which include protein serine phosphorylation, protein translocation between membranes and cytosol, as well as receptor complex formation, were inhibited by the pretreatment of cells with the NAC [41,56]. Thus, it was proposed that CD40-engagement leading to ROS production precedes the formation of homodimer. Indeed our data show that ROS production takes place in the absence of CD40 homodimer formation and induction of gene expression and that oxidative stress could enhance CD40 dimer formation after receptor stimulation confirming earlier reports that ROS and CD40 synergistically drive hepatocyte death by apoptosis and necrosis [57] and impair the anti-platelet function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells (EOCs) to regulate atherothrombosis [58]. Further studies are undertaken to assess the enzymes implicated in CD40 induced ROS production.

It is also well known that CD40 engagement in B cells induced ROS production leading to the activation of JNK and NF $\kappa$ B [56]. In the present study, we showed that CD40-mediated ROS production is not affected by mutation of Cys-238 residue. In addition our results demonstrated that activation of the MAP kinase JNK and I $\kappa$ B $\alpha$  triggered by G28-5 mAb was independent of CD40 homodimer formation. These findings suggest that certain biological functions do not require high levels of CD40 oligomerization. Consequently, we hypothesized that ligation of disulfide-linked CD40 dimers could induce some specific and precise biological responses.

Ligation of CD40 is known to induce activation signals in B cells leading to the expression of CD23, CD69 and CD80. Although the specific role of CD69 is not fully known, some studies suggest it may act as a co-stimulatory molecule for T-cell activation and proliferation and play a major role in regulating immune responses to infections [30,59]. Expression of CD69 was

significantly affected in early phase of G28-5 stimulation; however, in late phase Cys-238 mutation had no effect. Co-stimulatory molecule CD80 might enhance the antigen-presenting function [60]. Previous work indicates that lupus patients have increased proportions of B cells expressing this activation marker. However, it was unclear whether the elevation of this costimulatory molecule was due to an increased proportion of some specific B cell subsets, which are known to express higher levels of costimulatory molecules or whether altered activation of other B cell subsets was present. In our study we also focused on the change of CD23 surface expression following CD40 ligation as CD23 is the low-affinity receptor for IgE on B cells. The anti-CD23 mAb, lumiliximab, down-regulated IgE synthesis by human B cells in vitro and reduced human serum IgE levels in a phase I clinical trial in patients with mild-to-moderate persistent allergic asthma. This suggested that CD23 is a valid target for therapy. Understanding the regulation of CD23 has the potential to inspire to more cost-effective interventional strategy. In the present study, we showed that CD40 homodimer following G28-5 ligation, increased significantly the surface expression of CD23 (Fig 4A). It has been shown that IgE synthesis is inhibited in human B cells by anti-CD23 antibodies or antigen-IgE complexes, which bind to surface CD23. These observations suggest that surface expressed CD23 may act in a negative feedback mechanism on IgE synthesis. CD23 is shown to be upregulated upon CD40/CD154 ligation, apparently the transcription factor NF- $\kappa$ B, which is induced by CD40, plays a role in the induction of CD23. However our data indicate that there was no difference in the activation of I $\kappa$ B $\alpha$  when A20 cells expressing hCD40-WT or hCD40-C238A were stimulated with G28-5. Thus, there could be some differences in the activation of the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway.

The importance of JAK3 in immune function was highlighted by two reports describing JAK3 deficiency in SCID patients [61,62]. These patients lack T cells but possess circulating B lymphocytes, which however function poorly. Knowing that JAK3 is constitutively associated with CD40 [22], we attempted to study the role of the JAK-STAT pathway in CD40-mediated expression of CD23. Our results indicate that CD40 signals through JAK3 to activate the expression of CD23 and involves PI-3 kinase/AKT pathway.

Elucidating role of molecules involved in regulation of cell-cell interactions is crucial for

understanding the immunological processes and for improving therapeutic strategies. Conventionally, role of CD40 have been implicated in the initiation of sequence of events leading to proliferation, activation and differentiation of B cells. Our study provides evidence that divergent pathways of CD40 signal transduction exist. Engagement of CD40 leading to homodimer formation and subsequent translocation to lipid rafts elicits a different biological outcome than the engagement of CD40 that does not lead to homodimer formation. Further studies would be needed to explore the physiological role of CD40 homodimerization using transgenic animal models.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to acknowledge Dr. Waris Ali Shah for his critical insights and revision of the manuscript.

## REFERENCES:

1. Gommerman JL, Summers deLuca L (2011) LTbetaR and CD40: working together in dendritic cells to optimize immune responses. *Immunol Rev* 244: 85-98.
2. Urashima M, Chauhan D, Hatziyanni M, Ogata A, Hollenbaugh D, et al. (1996) CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. *Leuk Res* 20: 507-515.
3. Busch LK, Bishop GA (1999) The EBV transforming protein, latent membrane protein 1, mimics and cooperates with CD40 signaling in B lymphocytes. *J Immunol* 162: 2555-2561.
4. Bishop GA, Ramirez LM, Baccam M, Busch LK, Pederson LK, et al. (2001) The immune response modifier resiquimod mimics CD40-induced B cell activation. *Cell Immunol* 208: 9-17.
5. Hostager BS, Bishop GA (2002) Role of TNF receptor-associated factor 2 in the activation of IgM secretion by CD40 and CD120b. *J Immunol* 168: 3318-3322.
6. Schaniel C, Pardali E, Sallusto F, Speletas M, Ruedl C, et al. (1998) Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J Exp Med* 188: 451-463.
7. Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, et al. (2002) Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1497-1502.
8. Hartwig UF, Karlsson L, Peterson PA, Webb SR (1997) CD40 and IL-4 regulate murine CD27L expression. *J Immunol* 159: 6000-6008.
9. Jacquot S, Kobata T, Iwata S, Morimoto C, Schlossman SF (1997) CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol* 159: 2652-2657.
10. Bishop GA, Hostager BS (2003) The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 297-309.
11. Revy P, Hivroz C, Andreu G, Graber P, Martinache C, et al. (1999) Activation of the Janus kinase 3-STAT5a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells. *J Immunol* 163: 787-793.

12. Pype S, Declercq W, Ibrahim A, Michiels C, Van Rietschoten JG, et al. (2000) TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 275: 18586-18593.
13. Brines RD, Klaus GG (1993) Polyclonal activation of immature B cells by preactivated T cells: the role of IL-4 and CD40 ligand. *Int Immunol* 5: 1445-1450.
14. Mehindate K, al-Daccak R, Damdoumi F, Mourad W (1996) Synergistic effect between CD40 and class II signals overcome the requirement for class II dimerization in superantigen-induced cytokine gene expression. *Eur J Immunol* 26: 2075-2080.
15. Inui S, Kaisho T, Kikutani H, Stamenkovic I, Seed B, et al. (1990) Identification of the intracytoplasmic region essential for signal transduction through a B cell activation molecule, CD40. *Eur J Immunol* 20: 1747-1753.
16. Hostager BS, Hsing Y, Harms DE, Bishop GA (1996) Different CD40-mediated signaling events require distinct CD40 structural features. *J Immunol* 157: 1047-1053.
17. Goldstein M, Watts T (1996) Identification of distinct domains in CD40 involved in B7-1 induction or growth inhibition. *J Immunol* 157: 2837-2843.
18. Bishop GA, Hostager BS, Brown KD (2002) Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 72: 19-23.
19. Kuhne M, Robbins M, Hambor J, Mackey M, Kosaka Y, et al. (1997) Assembly and regulation of the CD40 receptor complex in human B cells. *J Exp Med* 186: 337-342.
20. Hostager BS, Catlett IM, Bishop GA (2000) Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J Biol Chem* 275: 15392-15398.
21. Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, et al. (2008) Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* 321: 663-668.
22. Hanissian S, Geha R (1997) Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 6: 379-387.
23. Bishop GA, Hostager BS (2001) Molecular mechanisms of CD40 signaling. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49: 129-137.

24. Brown KD, Hostager BS, Bishop GA (2001) Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J Exp Med* 193: 943-954.
25. Ren CL, Morio T, Fu SM, Geha RS (1994) Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2. *J Exp Med* 179: 673-680.
26. Hsing Y, Bishop GA (1999) Requirement for nuclear factor-kappaB activation by a distinct subset of CD40-mediated effector functions in B lymphocytes. *J Immunol* 162: 2804-2811.
27. Baccam M, Bishop GA (1999) Membrane-bound CD154, but not CD40-specific antibody, mediates NF-kappaB-independent IL-6 production in B cells. *Eur J Immunol* 29:3855-66: 3855-3866.
28. Jalukar SV, Hostager BS, Bishop GA (2000) Characterization of the roles of TNF receptor-associated factor 6 in CD40-mediated B lymphocyte effector functions. *J Immunol* 164: 623-630.
29. Gallagher E, Enzler T, Matsuzawa A, Anzelon-Mills A, Otero D, et al. (2007) Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol* 8: 57-63.
30. Abreu JR, Dontje W, Krausz S, de Launay D, van Hennik PB, et al. (2010) A Rac1 inhibitory peptide suppresses antibody production and paw swelling in the murine collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R2.
31. Hassan GS, Rana M, Léveillé C, Nadiri A, Jundi M, et al. (2009) Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. *Curr Immunol Rev* 5: 285-299.
32. Gold JA, Parsey M, Hoshino Y, Hoshino S, Nolan A, et al. (2003) CD40 contributes to lethality in acute sepsis: in vivo role for CD40 in innate immunity. *Infect Immun* 71: 3521-3528.

33. Lorente L, Martin MM, Varo N, Borreguero-Leon JM, Sole-Violan J, et al. (2011) Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Crit Care* 15: R97.
34. Pawson T (1994) Signal transduction. Look at a tyrosine kinase. *Nature* 372: 726-727.
35. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10: 251-337.
36. Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225.
37. van der Geer P, Pawson T (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20: 277-280.
38. Lohse MJ (2010) Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr Opin Pharmacol* 10: 53-58.
39. Braesch-Andersen S, Paulie S, Koho H, Nika H, Aspenstrom P, et al. (1989) Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40. *J Immunol* 142: 562-567.
40. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W (2004) CD40/CD40 Homodimers Are Required for CD40-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Expression of B7.2 by Human B Lymphocytes. *J Biol Chem* 279: 7799-7806.
41. Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, Leveille C, Jundi M, et al. (2007) Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 282: 19473-19480.
42. Arthur JF, Gardiner EE, Kenny D, Andrews RK, Berndt MC (2008) Platelet receptor redox regulation. *Platelets* 19: 1-8.
43. Ozsoy HZ, Sivasubramanian N, Wieder ED, Pedersen S, Mann DL (2008) Oxidative stress promotes ligand-independent and enhanced ligand-dependent tumor necrosis factor receptor signaling. *J Biol Chem* 283: 23419-23428.
44. Nadiri A, Polyak MJ, Jundi M, Alturaihi H, Reyes-Moreno C, et al. (2011) CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events. *Eur J Immunol* 41: 2358-2367.

45. Girouard J, Reyes-Moreno C, Darveau A, Akoum A, Mourad W (2005) Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression. *Mol Immunol* 42: 773-780.
46. Tinnell SB, Jacobs-Helber SM, Sterneck E, Sawyer ST, Conrad DH (1998) STAT6, NF-kappaB and C/EBP in CD23 expression and IgE production. *Int Immunol* 10: 1529-1538.
47. Ha YJ, Lee JR, Haxhinasto SA, Bishop GA (2004) Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40(phox), a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* 172: 231-239.
48. Lee BO, Moyron-Quiroz J, Rangel-Moreno J, Kusser KL, Hartson L, et al. (2003) CD40, but not CD154, expression on B cells is necessary for optimal primary B cell responses. *J Immunol* 171: 5707-5717.
49. Bishop G, Ramirez L, Waldschmidt T (1994) Differential responses to Ig and class II-mediated signals in splenic B cell subsets from normal and autoimmune mice. *Int Immunol* 6: 1049-1059.
50. van Kooten C, Banchereau J (2000) CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67: 2-17.
51. Wollman EE, Kahan A, Fradelizi D (1997) Detection of membrane associated thioredoxin on human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 602-606.
52. Baker MP, Eliopoulos AG, Young LS, Armitage RJ, Gregory CD, et al. (1998) Prolonged phenotypic, functional, and molecular change in group I Burkitt lymphoma cells on short-term exposure to CD40 ligand. *Blood* 92: 2830-2843.
53. Moriarty-Craige SE, Jones DP (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* 24: 481-509.
54. Dominici S, Valentini M, Maellaro E, Del Bello B, Paolicchi A, et al. (1999) Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of gamma-glutamyl transpeptidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and S-thiolation. *Free Radic Biol Med* 27: 623-635.
55. Naik E, Dixit VM (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* 208: 417-420.

56. Lee JR (2003) Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine treatment. *Mol Cell Biochem* 252: 1-7.
57. Bhogal RH, Weston CJ, Curbishley SM, Adams DH, Afford SC (2012) Activation of CD40 with platelet derived CD154 promotes reactive oxygen species dependent death of human hepatocytes during hypoxia and reoxygenation. *PLoS One* 7: e30867.
58. Bou Khzam L, Hachem A, Zaid Y, Boulahya R, Mourad W, et al. (2013) Soluble CD40 ligand impairs the anti-platelet function of peripheral blood angiogenic outgrowth cells via increased production of reactive oxygen species. *Thromb Haemost* 109.
59. Wang X, Xu H, Alvarez X, Pahar B, Moroney-Rasmussen T, et al. (2011) Distinct expression patterns of CD69 in mucosal and systemic lymphoid tissues in primary SIV infection of rhesus macaques. *PLoS One* 6: e27207.
60. Chen B, Stiff P, Sloan G, Kash J, Manjunath R, et al. (2001) Replicative response, immunophenotype, and functional activity of monocyte-derived versus CD34(+)-derived dendritic cells following exposure to various expansion and maturational stimuli. *Clin Immunol* 98: 280-292.
61. Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, et al. (1995) Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 270: 797-800.
62. Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco MG, Frattini A, et al. (1995) Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 377: 65-68.

## **Figure Legends**

### **Figure 1: Effect of Oxidative Stress on CD40 homodimer formation**

Effect of oxidative stress on CD40 homodimerization was studied by treatment of cells with pro-oxidant, diamide. **(A)** The level of CD40 expression at the surface of A20 cells transfected with either hCD40-WT or hCD40-C238A was assessed by flow cytometry. Briefly, cells were stained with biotinylated G28-5 (anti-CD40) (1/500) or biotinylated isotype control followed by Streptavidin-Alexa 488 (1/1000). A20 transfected cells with hCD40-WT, hCD40-C238A or empty vector (Vect), as a negative control were stimulated by incubating  $2 \times 10^6$  cells with

1mM of diamide (Dia) in 100  $\mu$ L of PBS for 15 min at 37°C or left untreated (NT). Cells were then lysed in 50  $\mu$ L of lysis buffer (TNE, 1% Triton, protease inhibitors (Roche tablets)). CD40 dimerization was assessed by western blot in non-reducing as described previously [45]. **(B)** hCD40-WT transfected A20 cells were pre-treated with different concentration of diamide for 15 min followed by stimulation with G28-5 (1  $\mu$ g/  $1 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ L of PBS). After lysis, 50  $\mu$ g of proteins in non-reducing condition were analysed by western blot. Cells incubated with DMSO were used as a negative control for diamide and cells incubated with PBS were used as a negative control for G28-5. **(C)** The histogram represents a quantification of the CD40-homodimer from two experiments using the analysis software Quantity One (BIO-RAD) (\* $p < 0.05$ ).

**Figure 2: Treatment with G28-5 induces the formation of CD40 homodimers.**

A20 transfected with either hCD40-WT or hCD40-C238A were stimulated for 24h or 48h with or without anti-CD40 mAbs G28-5 at 37°C. Monomeric (M) and dimeric (D) forms of CD40 molecules were revealed by non-reducing SDS-PAGE and immunoblotting using G28-5 mAb. Results are representative of two independent experiments.

**Figure 3: CD40-mediated ROS production occurs independently of CD40 homodimerization.**

**(A)** ROS production in A20 cells transfected with either hCD40-WT or hCD40-C238A was measured by flow cytometry using the carboxy-H2DCF-DA probe. Briefly, cells were washed extensively and re-suspended in phenol-red-free and FBS-free RPMI and re-suspended at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL. Cells were pre-treated with 10  $\mu$ M of carboxy-H2DCF-DA for 30 min in the dark at 37°C. Following pre-treatment, the  $0.2 \times 10^6$  cells were distributed into FACs tubes, washed, and stimulated with 10  $\mu$ g/mL of G28-5 for 30 min in the dark at 37°C. After treatment cells were washed and re-suspended in phenol-red-free and FBS-free RPMI and analysed. The histogram represents the average of four independent experiments of the fold increase of ROS production of stimulated cells over non-stimulated cells (\*\* $p < 0.0001$ ,  $N=12$ ). **(B)** For the signalling experiment,  $0.5 \times 10^6$  cells were distributed into 1.5 mL eppendorff tubes and starved in Advanced RPMI for 2 hr at 37°C. Afterwards the cells were stimulated with 1  $\mu$ g of G28-5 or 500  $\mu$ M  $H_2O_2$  (as positive

control) or left non-stimulated (NS) for the allocated times. The stimulation was then stopped under reducing condition with hot SDS- $\beta$ ME ( $\beta$ -mercaptoethanol) and heated at 95°C for 5 min. The samples were then migrated on gel. After transfer, the blots were incubated with anti pI $\kappa$ B $\alpha$  Ab (1/1000 in 5% BSA overnight at 4°C). The blot was then stripped and re-probed with anti pJNK Ab (1/1000 in 5% BSA overnight at 4°C). Actin was used a loading control. A representative of three independent experiments is shown (\*\*\*) $p < 0.05$ .

#### **Figure 4: Cys-238 mediated CD40 homodimers enhance B cell activation**

The expression of the B cell activation markers (CD23, CD69, CD80) was studied in A20 cells transfected with either hCD40-WT or hCD40-C238A or empty vector as control. Cells ( $0.5 \times 10^6$ ) were stimulated as indicated in a 24 wells plate with G28-5 (1  $\mu$ g/mL), PMA (10 ng/mL) or left unstimulated for 24 and 48h. Following stimulation, the cells were washed and pre-treated on ice for 10 min with a 2% FBS/PBS (0.02 % NaN<sub>3</sub> /2.5 mM EDTA) solution. The level of expression of the various receptors was measured by flow cytometry done in triplicate for each B cell activation marker. **(A)** The expression of CD23 was measured by indirect staining. Following pre-treatment, the cells were incubated with biotinylated anti-CD23 in 2% FBS/PBS) or with an isotype control (biotinylated rat IgG2a) for 30 min on ice. The cells were then incubated with streptavidin-Alexa 488 in 2% FBS/PBS) for 30 min on ice. The histograms represent the average of the mean fluorescence intensity (MFI). The experiments were repeated five times independently. **(B and C)** Expression of CD69 (B) and CD80 (C) was measured by direct staining. Following pre-treatment, the cells were incubated with anti-CD69-FITC or anti-CD80-FITC in 2% FBS/PBS) or with an isotype control (hamster IgG2a-FITC) for 30 min on ice. **(D)** A20-hCD40-WT or A20-hCD40-C238A, cells were stimulated as before. The expression of mCD40 was measured by direct staining using FITC conjugated anti-FGK in 2% FBS/PBS) or with an isotype matching control for 30 min on ice. **(E)** A20-hCD40-WT or A20-hCD40-C238A cells were stimulated as before and the level of expression of mMHC-Class II was measured by direct staining by incubation with anti-I-A<sup>b</sup>FITC in 2% FBS/PBS) or with an isotype control (hamster IgG2a-FITC) for 30 min on ice followed. The histograms represent the average of the mean fluorescence intensity

(MFI), done in triplicate, for each B cell activation marker. The experiments were repeated three times independently (\*\*p<0.05).

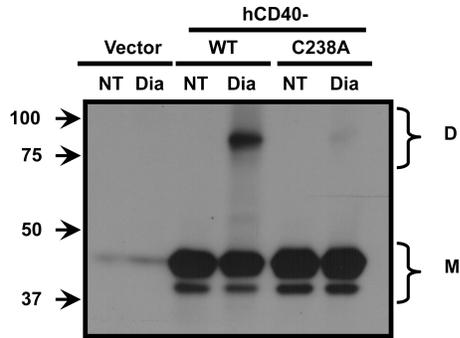
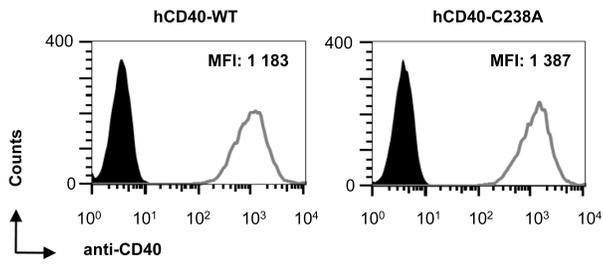
**Figure 5: CD40-P227A failed to induce CD23 expression after CD40 engagement.**

A20-hCD40-WT or A20-hCD40-P227A cells were stimulated with G28-5 as described before. Following stimulation, cells were washed and pre-treated on ice for 10 min with a 2% FBS/PBS containing (0.02 % NaN<sub>3</sub> /2.5 mM EDTA). The surface expression of CD23 was measured by indirect staining as before. The histograms represent the average of the mean fluorescence intensity (MFI) done in triplicate. The experiments were repeated five times independently (\*\*p<0.05).

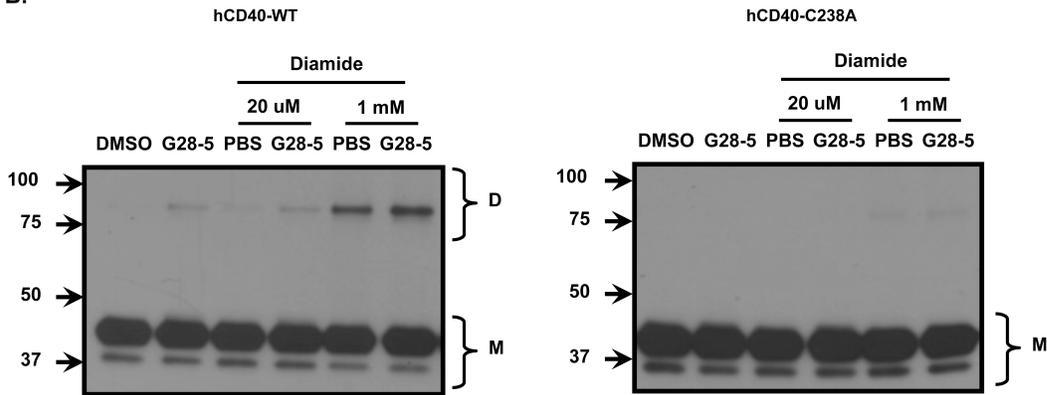
**Figure 6: CD40-mediated CD23 expression is PI3-Kinase dependent.**

Signalling pathway involved in the induction of CD23 and CD80 was analysed by pre-treating the A20-hCD40-WT with inhibitors of the ERK pathway (U0126, 20 µM), the p38 pathway (SB203580, 30 µM) and PI3-K pathway (LY294002, 50 µM) for 1h at 37°C. Non-treated (NT) cells were used as a control. Following the pretreatment, cells were stimulated with G28-5 or PMA as above, after 24hrs the expression level of CD80 (A) and CD23 (B) was measured by direct staining as described before by FACs. The histograms represent the average of the fold increases in the mean fluorescence intensity (MFI) of CD80 (A) or CD23 (B), done in duplicate, of stimulated cells over non-stimulated cells. The experiments were repeated three times independently (\*\*p<0.05).

A.



B.



C.

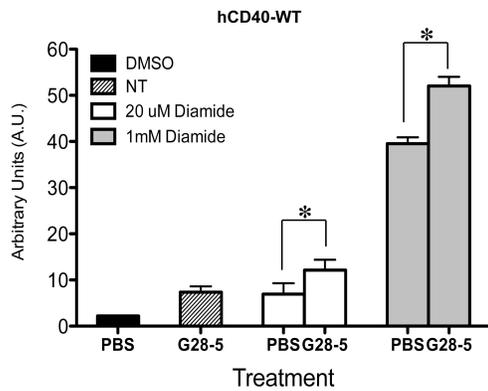


Figure 1

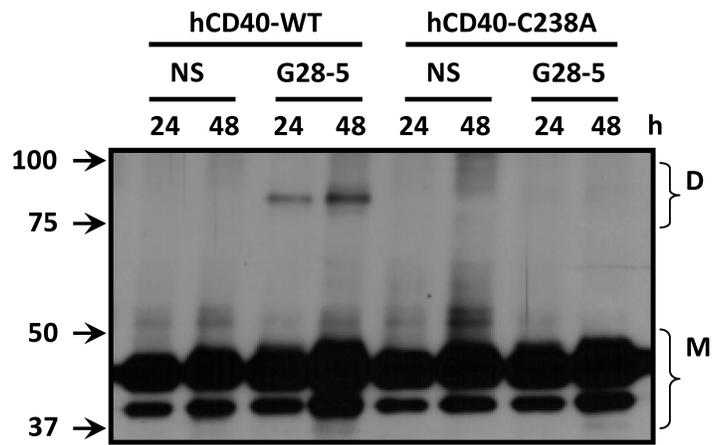
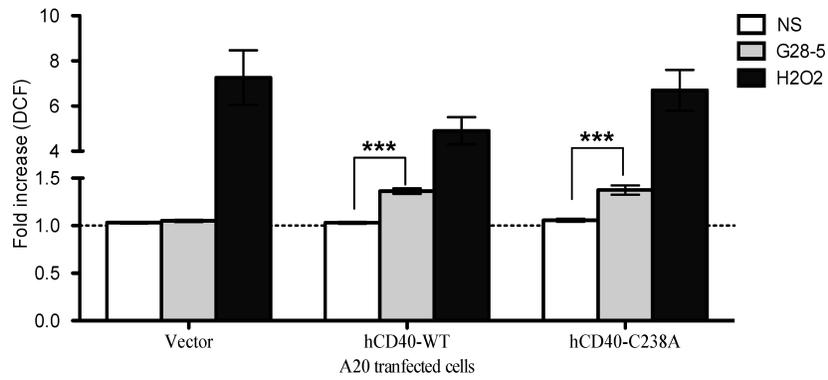


Figure 2

A.



B.

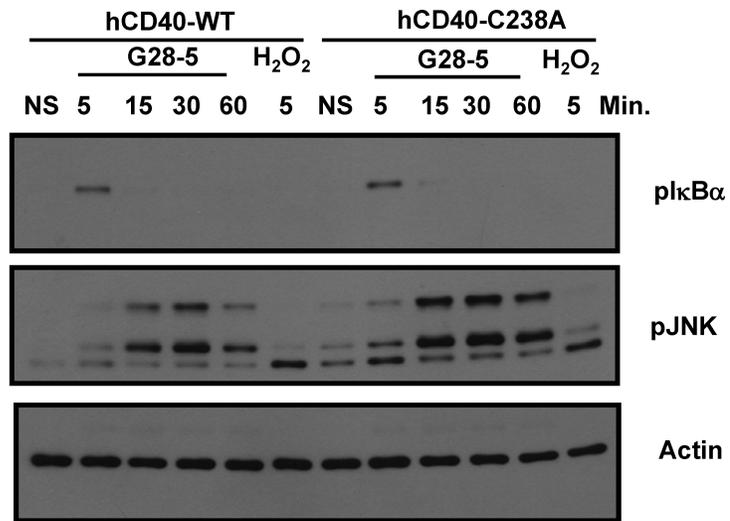
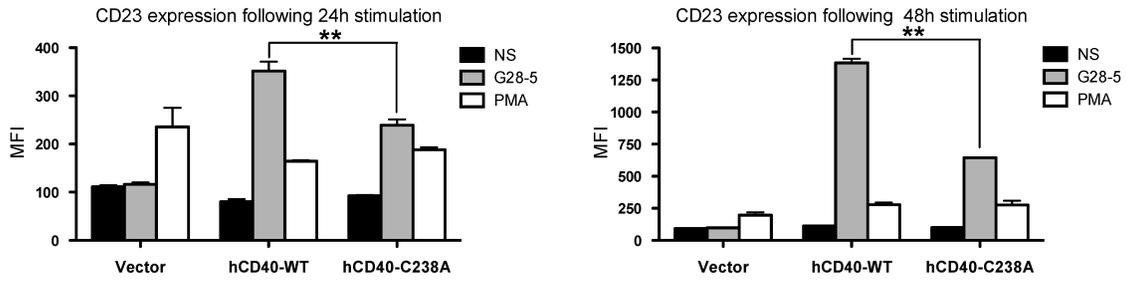
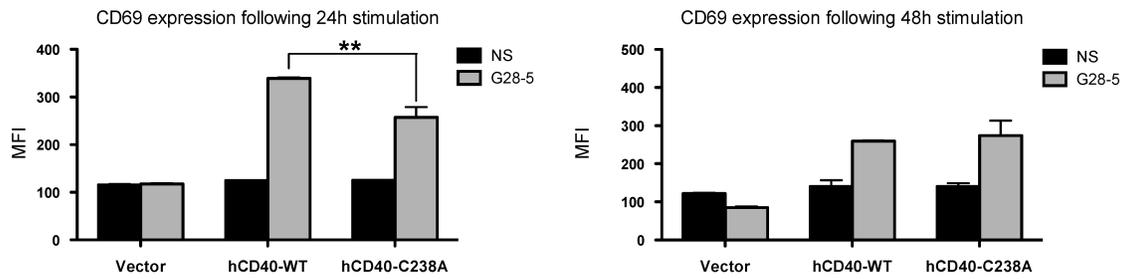


Figure 3

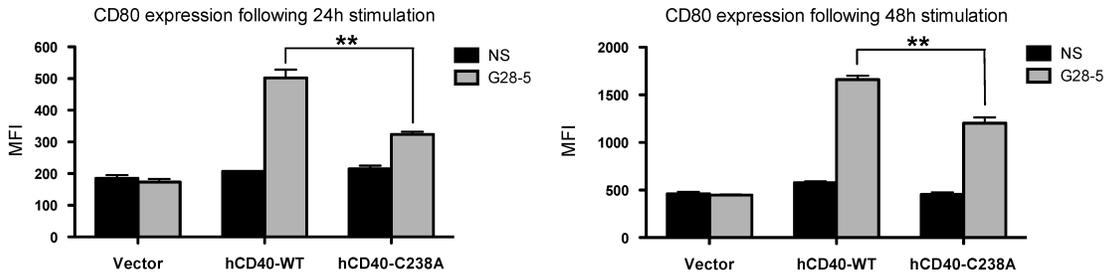
A.



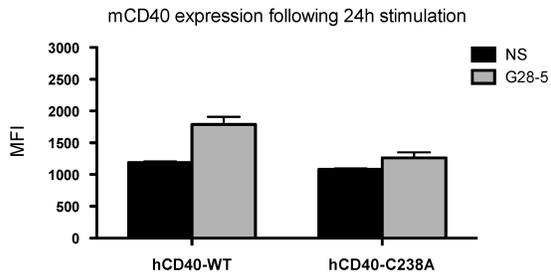
B.



C.



D.



E.

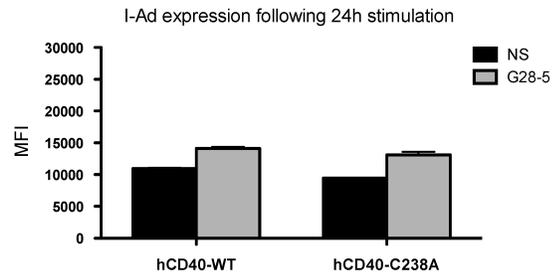
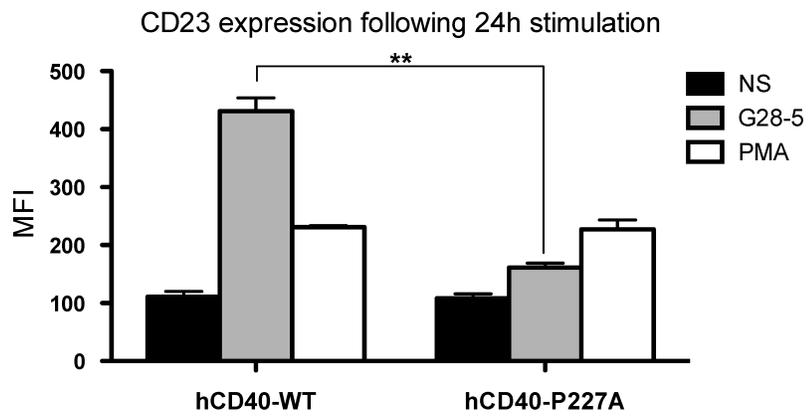


Figure 4

A.



B.

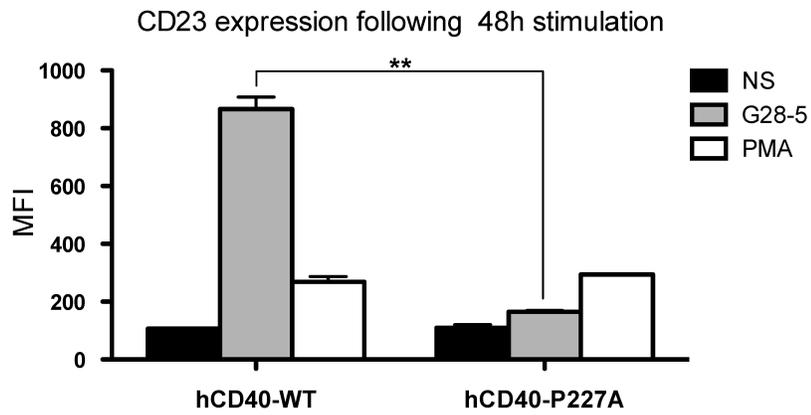
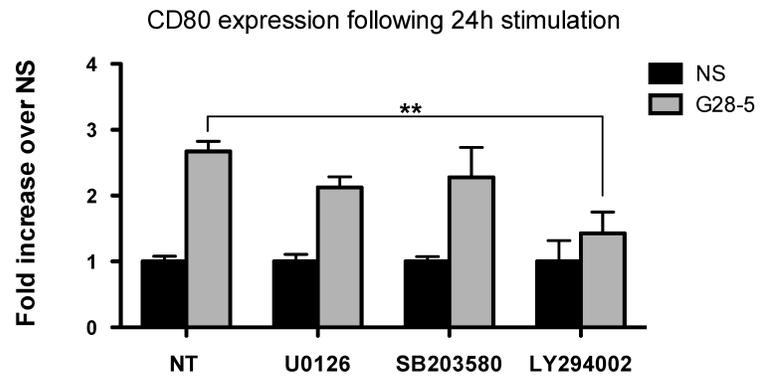


Figure 5

A.



B.

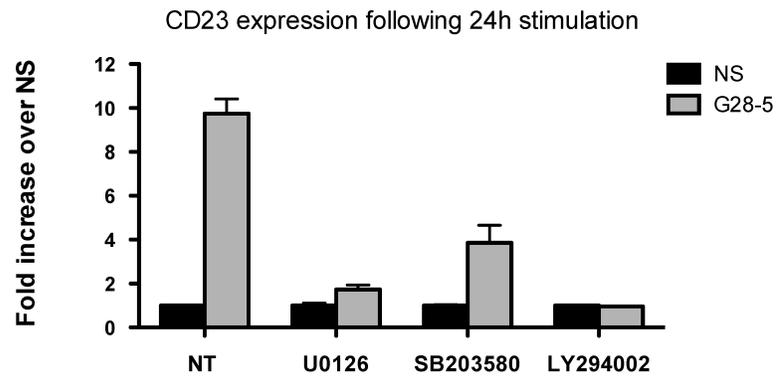
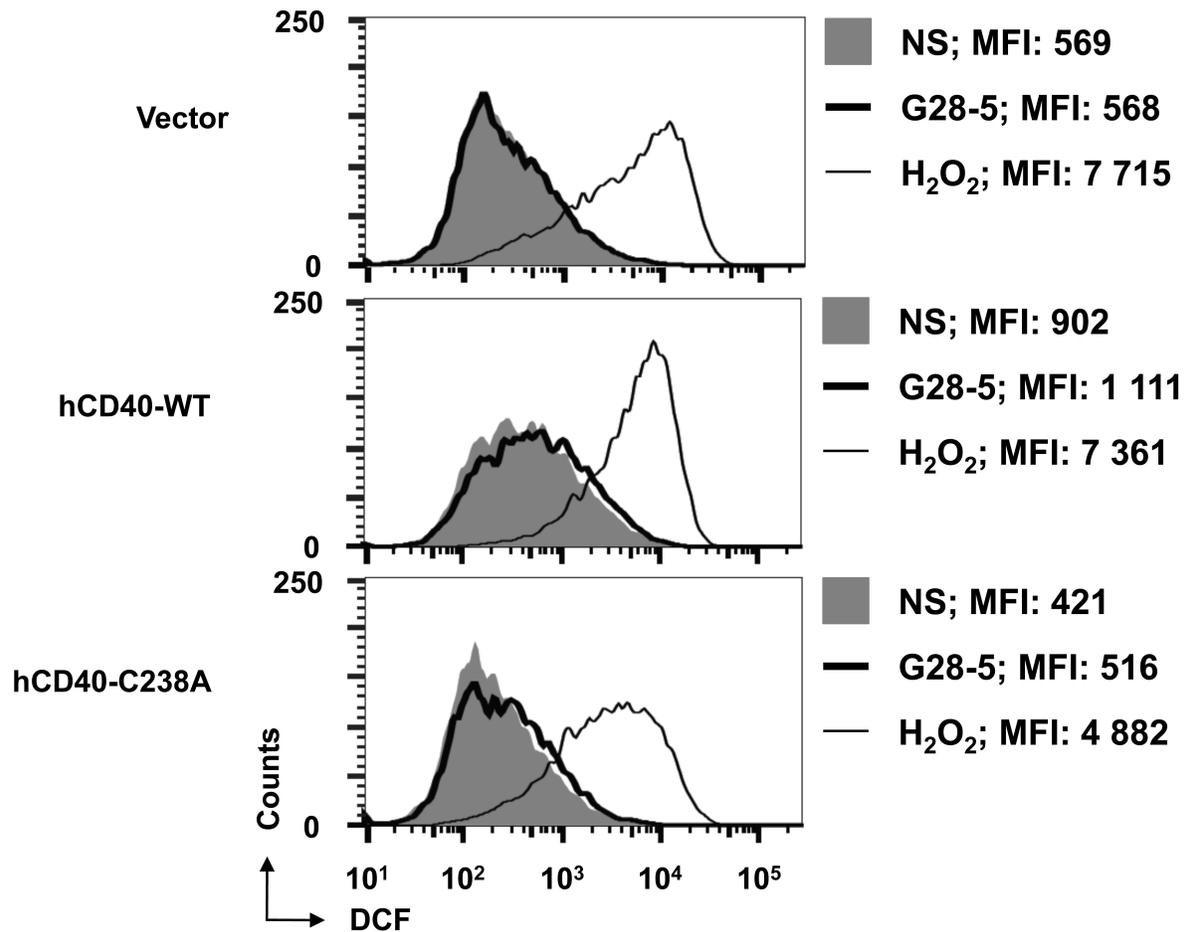
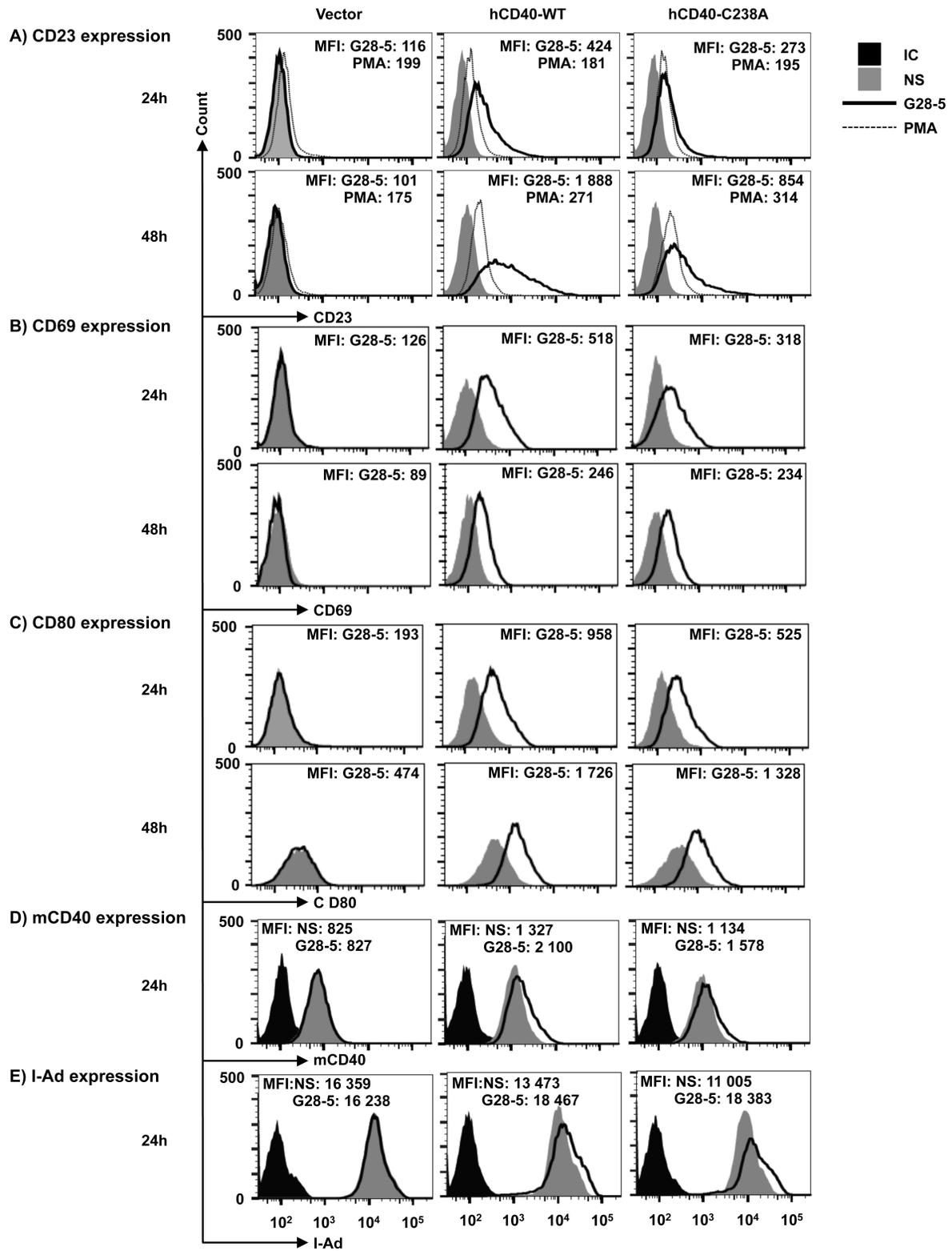


Figure 6



**Figure S-1: CD40-mediated ROS production occurs independently of CD40 homodimerization.** ROS production in A20 cells transfected with either hCD40-WT or hCD40-C238A was measured by flow cytometry using the carboxy-H<sub>2</sub>DCF-DA probe as described in the figure 3. The data is representative of an experiment repeated four times and analysed in figure 3.



**Figure S-2: Cys-238 mediated CD40 homodimers enhance B cell activation.** The expression of the B cell activation markers (CD23, CD69, CD80) was studied in A20 cells transfected with either hCD40-WT or hCD40-C238A or empty vector as control. Cells ( $0.5 \times 10^6$ ) were stimulated as indicated in a 24 wells plate with G28-5 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PMA (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) or left unstimulated for 24 and 48h as it was described in figure 4. The data is representative of the flow cytometry (MFI) analysis of the expression level of (A) CD23, (B) CD69, (C) CD80, (D) mCD40, and (E) mMHC-Class II as it is described in figure 4.

**Chapitre 5. La cystéine 238 du CD40 est nécessaire pour la régulation de la signalisation induite par le TLR4.**

## ***5.1. Mise en contexte***

Le rôle des récepteurs de l'immunité adaptative dans la régulation de la réponse immunitaire innée est devenu un sujet d'étude incontournable. Comme nous l'avons décrit ci-haut, la coopération entre le CMH de class II, le CD40 et les différents membres de la famille des TLRs a un grand impact sur la différenciation des CPAs et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, selon Liu, X. et al., les souris qui n'expriment pas le CMH de class II étaient protégées contre la sepsie induite par une injection d'une souche d'*E. coli* (0111:B4) [202]. Par ailleurs, l'absence de CMH de classe II diminuait la production de TNF, IL-6 et d'INF- $\beta$  suite à une stimulation des macrophages par du LPS. Cette étude a permis de mieux comprendre la régulation de la signalisation induite par les TLRs. Par ailleurs, cette étude a aussi permis de dévoiler l'importance du CD40 dans cette régulation. Ainsi, il a été démontré que la régulation de la signalisation induite par les TLRs nécessitait l'activation du BTK. Or, l'interaction BTK/CMH de classe II requiert la présence du CD40.

Par conséquent, une analyse détaillée du mécanisme impliqué dans la formation de ce db-CD40 homodimère et de l'implication de ce db-CD40 homodimère dans l'interaction BTK/CMH de classe II nous permettra de mieux lutter contre les maladies auto-immunes et agir contre la dérégulation de la réponse immunitaire innée.

## ***5.2. L'homodimérisation du CD40 augmente l'induction du CD23 par le TLR4***

Les TLRs sont activés sélectivement par différents types de PAMPs. Ils peuvent fonctionner comme homodimères, mais pourraient avoir besoin de s'associer avec des molécules accessoires pour permettre une reconnaissance et une signalisation optimale. Le cas de TLR4 a été particulièrement bien étudié à cet égard, et on sait que ce récepteur doit s'associer à un facteur sécrété le MD-2, pour atteindre la membrane plasmique et interagir avec le LPS [131, 203, 204]. Des expériences complémentaires ont permis d'établir que TLR4 était un composant essentiel du complexe récepteur au LPS [205, 206]. Certains TLRs peuvent former des hétérodimères, ce qui leur permet d'élargir le spectre des molécules reconnues.

Le rôle du TLR4 est bien connu pour son rôle dans l'activation des cellules B mature. De plus, il a été démontré que le TLR4 joue un rôle important durant le développement de ces cellules [67, 152, 207]. L'addition du LPS sur des cellules B augmente considérablement le pourcentage des cellules B CD23+ [207]. Sachant que le CD40 peut aussi induire le CD23 [69, 121], nous voulions savoir l'effet de la présence d'un CD40WT et/ou muté sur l'induction du CD23 par le TLR4. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules A20 transfectées avec le hCD40-WT, le hCD40-C238A ou le vecteur, comme contrôle. Ainsi, nous avons stimulé les cellules transfectées qui ont conservé le même niveau d'expression du TLR4 murin et du CD40 murin endogènes avec du LPS pendant 24h et 48h (**Figure 1A, B**). Nos résultats préliminaires montrent qu'en présence d'un CD40 dimérique, le TLR4 induit fortement l'expression du CD23 à la surface des cellules B, ce phénomène se produit après 24h de stimulation et cette tendance se poursuit après même après 48h. Afin de démontrer que cette augmentation de l'expression du CD23 était spécifique à l'homodimérisation du CD40, nous avons voulu déterminer si la mutation au niveau de la cystéine 238 n'affectait pas aussi l'expression du CD40 murin suite à une stimulation par le LPS. Or, nous avons pu démontrer que la stimulation par le LPS augmentait le niveau d'expression du CD40 murin de la même manière dans les cellules transfectées avec le hCD40-WT ou le hCD40-C238A (**Figure 1C**). Ainsi, l'homodimérisation du CD40 semble jouer un rôle dans l'induction de l'expression du CD23 suite à une stimulation du TLR4 par le LPS.

### ***5.3. La mutation de la proline au niveau 227 du CD40 affecte l'induction de l'expression du CD23.***

L'étude du mécanisme utilisé par le db-CD40 homodimère pour réguler les voies de signalisation induite par le TLR4 est nécessaire afin de mieux comprendre cette coopération entre le TLR4 et le CD40. Ainsi, nous avons utilisé une mutation au niveau de la proline 227 du CD40 qui semble affecter l'induction du CD23 suite à une stimulation du CD40 [69]. En effet, selon Geha, R.S. et al., cette proline 227 semble être requise pour l'association du JAK3 au CD40. Ceci a pour effet d'induire l'activation du STAT3 ce qui mène à l'induction de l'expression du CD23 suite à une stimulation par le CD40. L'utilisation de cette mutation (P227A) nous permettra de démontrer si cette association du CD40 avec le JAK3 est aussi importante dans la régulation des voies de signalisation induite par le TLR4. Par conséquent, nous avons stimulé avec du LPS des cellules A20 transfectées avec le hCD40-WT ou le hCD40-P227A ayant un niveau d'expression similaire (**Figure 2A**). Comme nous l'avons observé pour le hCD40-C238A, la mutation au niveau de la proline 227 affecte aussi l'induction de l'expression du CD23 après une stimulation de 24h et de 48h avec le LPS (**Figure 2B**). Comme la mutation de la proline 227 et la mutation de la cystéine 238 ont eu un effet semblable sur l'induction de l'expression du CD23, il fallait voir si le hCD40-P227A affectait aussi l'homodimérisation du CD40. Par conséquent, nous avons utilisé le diamide, un pro-oxydant, pour induire la formation du db-CD40 homodimère. Contrairement au hCD40-C238A, le hCD40-P227A a été capable de former un dimère comme le hCD40-WT (**Figure 3**). Ceci semble suggérer que l'association du JAK3 avec le CD40 et l'activation du STAT3 sont aussi importantes pour l'induction de l'expression du CD23 par le TLR4.

### ***5.4. La voie PI-3 kinase est nécessaire pour la régulation de l'expression du CD23.***

Nos résultats antérieurs ont démontré l'importance du db-CD40 homodimère dans l'induction de l'activation du PI3-Kinase [59]. Par conséquent, on a voulu déterminer si

l'activation du PI3-Kinase est aussi importante pour l'induction de l'expression du CD23 suite à une induction par le LPS. Tout d'abord, nous avons démontré que le pré-traitement des cellules A20 hCD40-WT avec l'inhibiteur du PI3-Kinase, le LY294002, affectait l'induction de l'expression du CD80 suite à une stimulation par le LPS ou un anticorps monoclonal, le G28-5 (anti-CD40) (**Figure 4A**). À l'instar de l'effet sur l'induction de l'expression du CD80, le LY294002 a aussi affecté l'induction de l'expression du CD23 suite à une stimulation par le G38-5 ou le LPS durant 24h (**Figure 4B**). Par contre, l'inhibition des MAP kinase, U0126 (ERK) et SB203580 (P38), semble affecter l'induction de l'expression du CD23 uniquement.

Tous ces résultats suggèrent que la mutation du CD40 au niveau de la cystéine 238 affecte le signal induit par le TLR4 dans la maturation et la différenciation des cellules B.

#### **Légendes des figures:**

#### **Figure 1: La cystéine C238 est nécessaire pour l'induction de l'expression du CD23 par le LPS.**

(A) L'expression du CD40 humain transfecté, du CD40 murin endogène et du TLR4 murin endogène sur les cellules A20 transfectées par le hCD40-WT, hCD40-C238A ou le plasmide vide (vector). (B) Les cellules A20 exprimant le hCD40-WT, hCD40-C238A ou le plasmide vide (vector) ont été stimulées avec l'anti-CD40 (G28-5), le LPS ou le PMA pour 24h et 48h. Par la suite, le niveau d'expression du CD23 a été déterminé par FACs calibur. Les histogrammes représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) du CD23. Les cellules non-stimulées ont été utilisées comme contrôle négatif. (C) Le LPS, suite à une stimulation de 24h, a induit le même niveau d'expression du CD40 murin à la surface des cellules A20 hCD40-WT et hCD40-C238A. L'histogramme représente la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) du CD40 murin.

**Figure 2: La mutation au niveau de la proline 227 abolie l'induction de l'expression du CD23.**

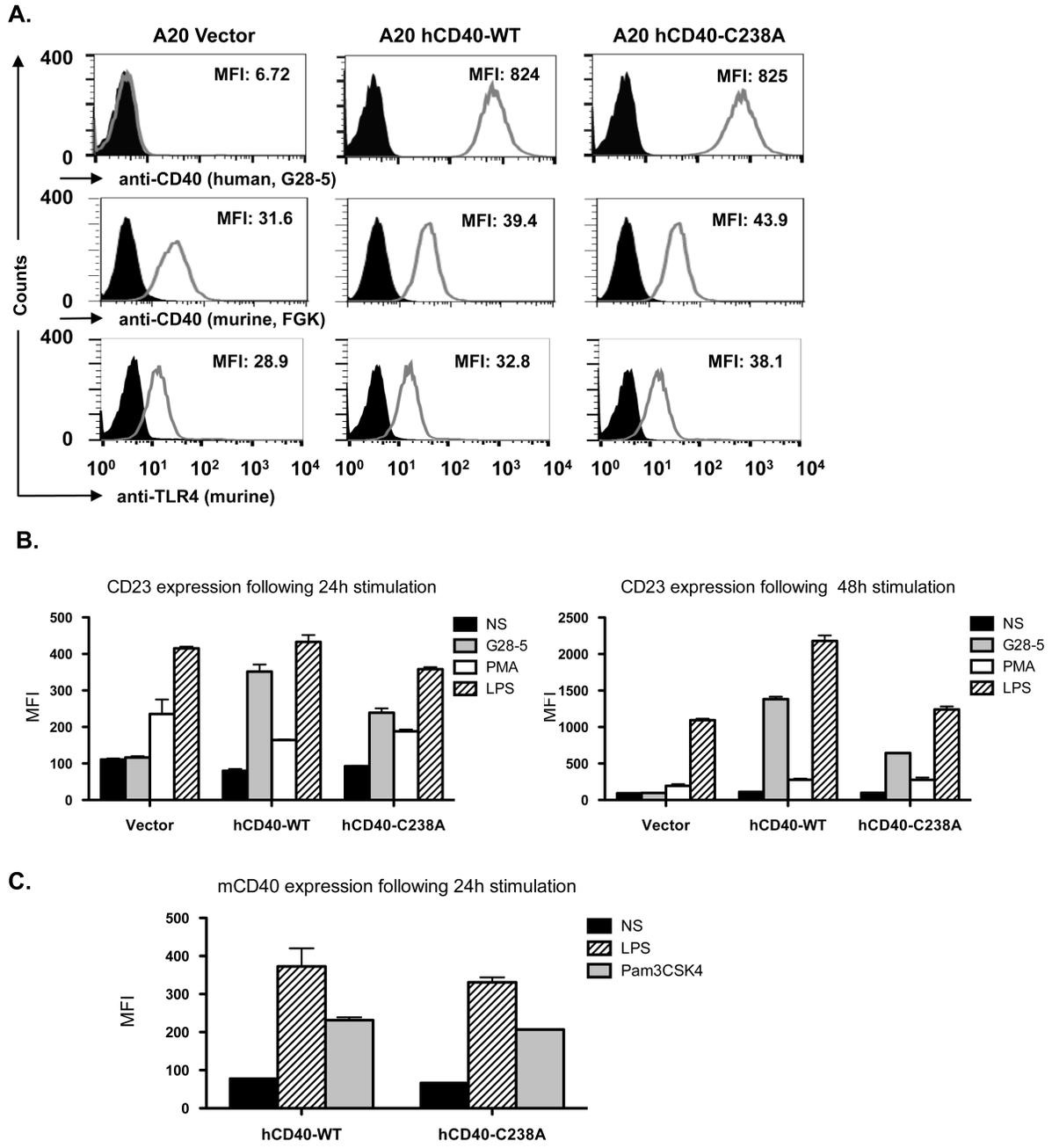
(A) Un niveau d'expression similaire du hCD40 sur les A20 transfectées avec le hCD40-WT, hCD40-C238A ou le hCD40-P227A a été observé par le FACs calibre. (B) Les cellules A20 exprimant le hCD40-WT, hCD40-C238A ou hCD40-P227A ont été stimulées avec l'anti-CD40 (G28-5), le LPS ou le PMA pour 24h et 48h. Par la suite, le niveau d'expression du CD23 a été déterminé par FACs calibre. Les histogrammes représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) du CD23.

**Figure 3: La mutation au niveau de la proline 227 n'empêche pas la formation du CD40 homodimère.**

Les cellules A20 transfectées avec le hCD40-WT, le hCD40-C238A, le hCD40-P227A ou le plasmide vide (Vect) ont été stimulées avec 1mM de diamide (Dia), un pro-oxydant, ou avec le DMSO (NT) comme contrôle négatif. Par la suite, les cellules ont été lysées et migrées sur un gel non-réducteur. La formation du CD40 dimère a été observée suite à une révélation avec l'anti-CD40 (G28-5).

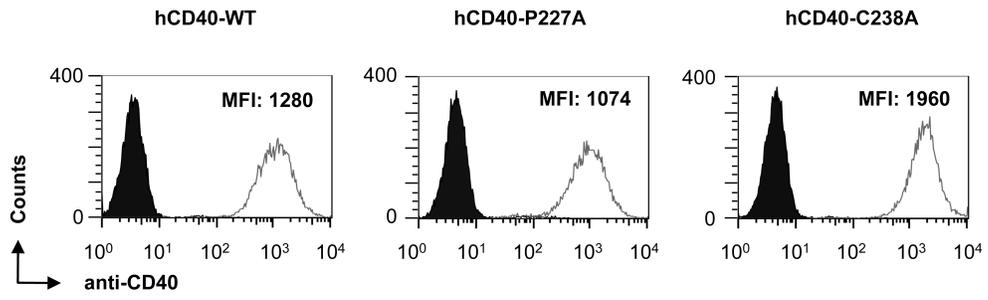
**Figure 4: L'activation du PI3-Kinase est nécessaire pour l'expression du CD23 induite par le CD40 et le TLR4.**

Pour déterminer l'implication des différentes voies de signalisations dans l'expression du CD23, les A20 hCD40-WT ont été prétraitées avec l'inhibiteur du PI3-Kinase (LY294002, 50  $\mu$ M), l'inhibiteur du p38 (SB203580, 20  $\mu$ M) ou l'inhibiteur d'ERK (U0126, 20  $\mu$ M) pendant 1h. Ensuite, le G28-5 (1  $\mu$ g/ml) et le LPS (50  $\mu$ g/ml) ont été rajoutés pour une stimulation de 24h. Le niveau d'expression du CD80 (A) et du CD23 (B) a été étudié comme décrit ci-dessus. Les histogrammes représentent la moyenne d'un duplicata de l'intensité de fluorescence (MFI) des différents marqueurs. Les expériences ont été répétées deux fois. Statistiques (\* P < 0,05; \*\* P < 0, 01; P < 0,0001).

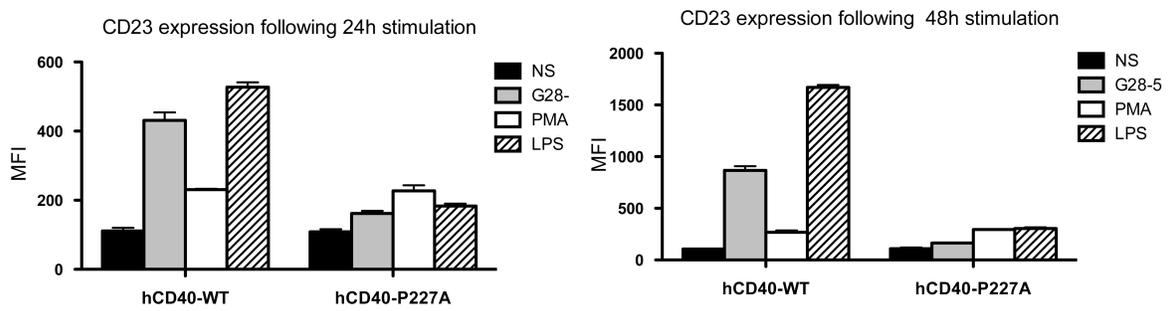


**Figure 1**

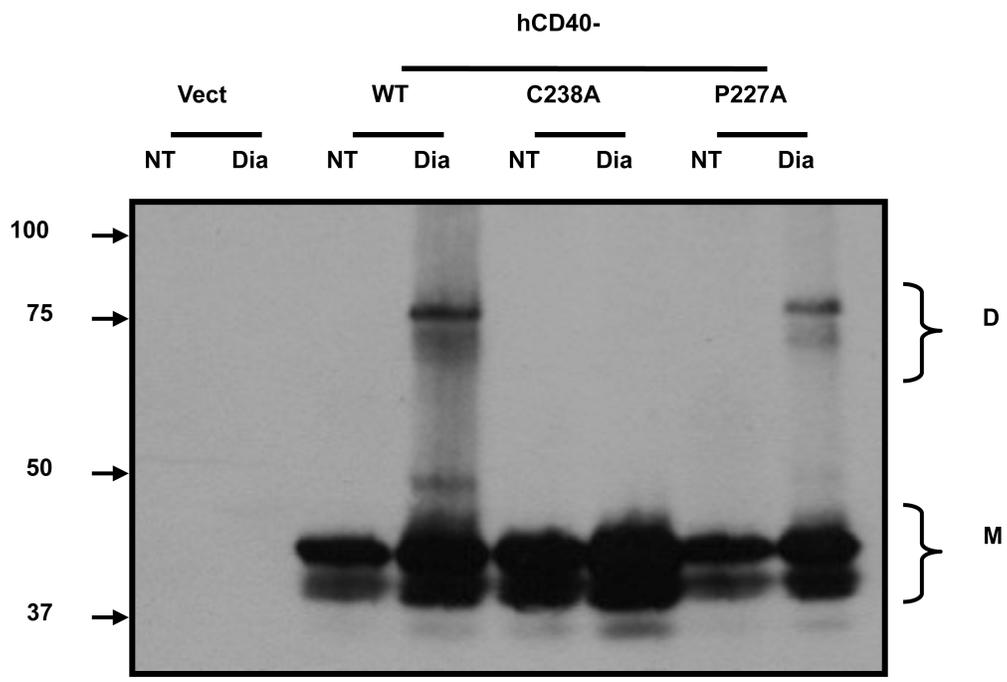
**A.**



**B.**

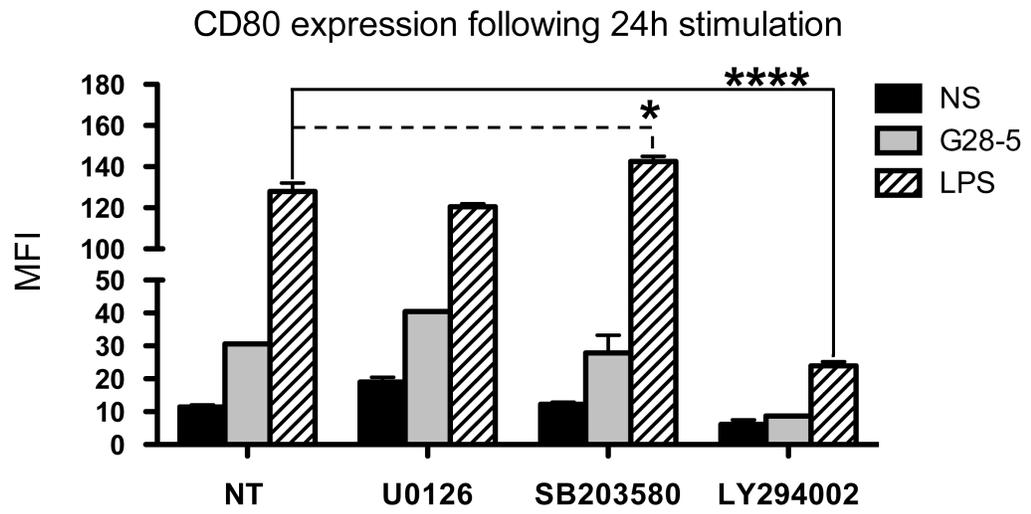


**Figure 2**

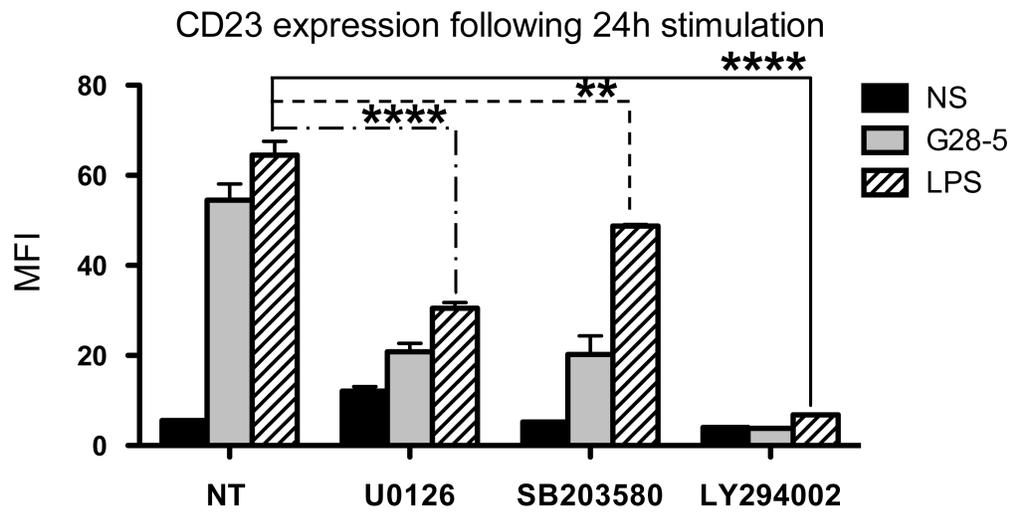


**Figure 3**

**A.**



**B.**

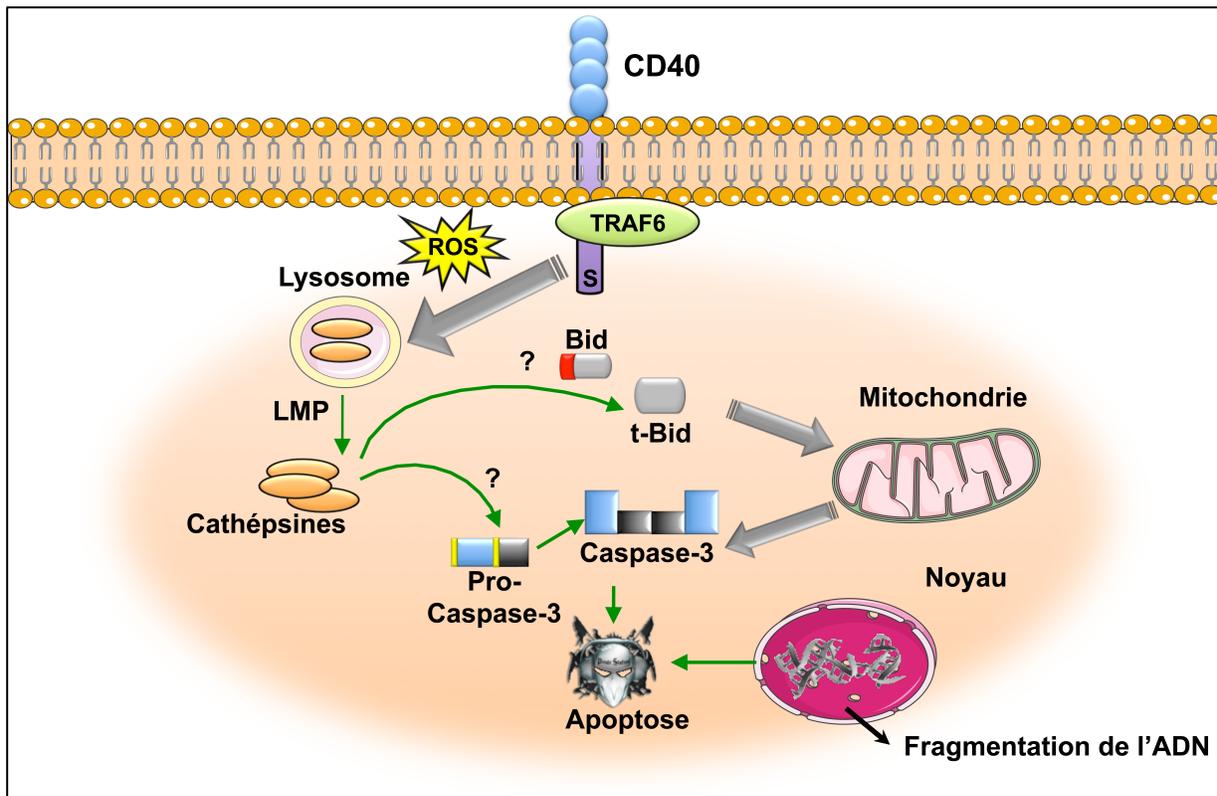


**Figure 4**

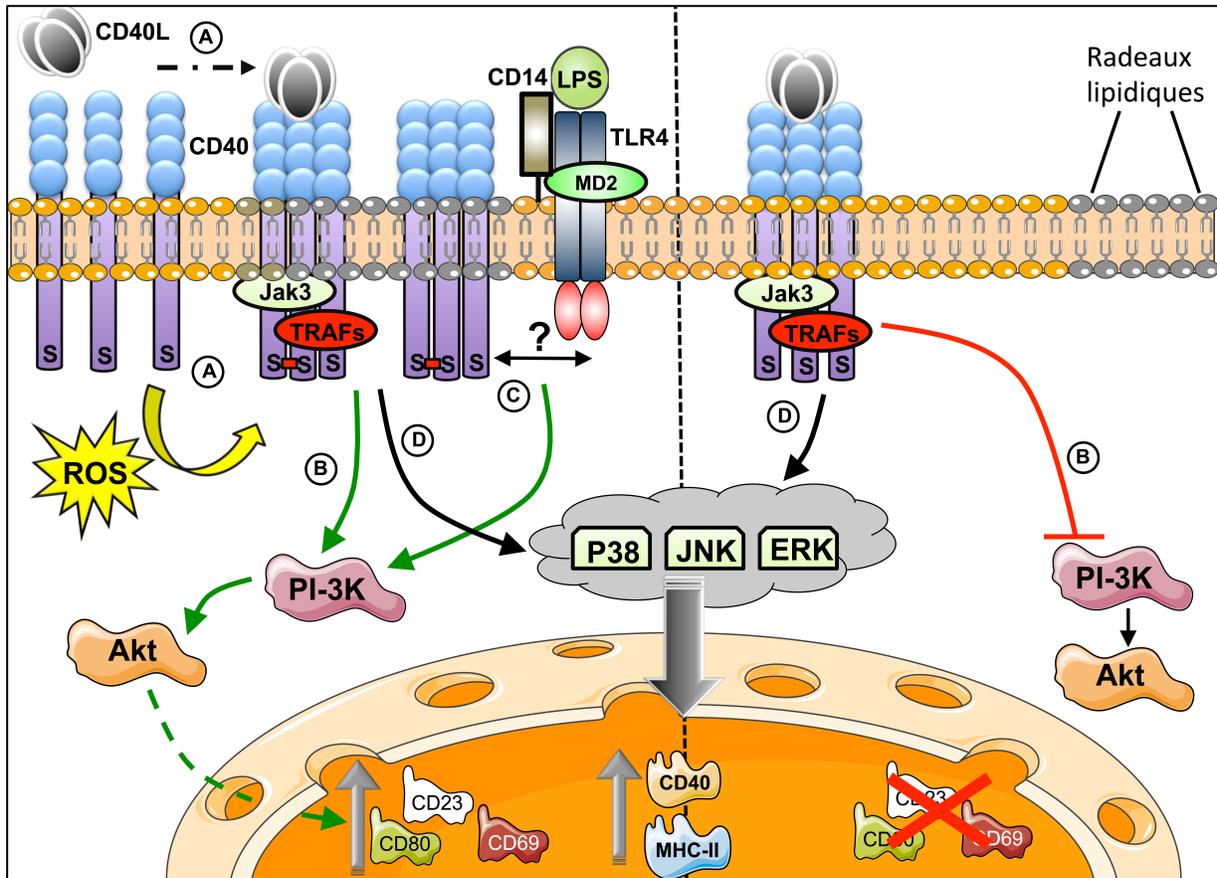
## **Discussion**

Le rôle du CD40 dans la réponse biologique est complexe. Comme on a pu le voir au cours des chapitres précédents, le CD40 peut intervenir dans la réponse immunitaire innée et adaptative tout en ayant un effet antitumoral au niveau des cellules cancéreuses. Ainsi, les résultats obtenus nous ont permis de montrer que la mort cellulaire induite par le CD40 résulte de la perméabilisation du lysosome suivi de la diffusion de la cathepsine B dans le cytoplasme. De plus, l'induction de la mort cellulaire par le CD40 requiert la présence du ROS (**Discussion, fig. 1**). Par ailleurs, cette mort cellulaire programmée induite par le CD40 est indépendante du TRAF2 et TRAF3 mais nécessite son interaction avec le TRAF6 (**Discussion, fig. 1**). Nous avons aussi démontré que le CD40 sous forme monomérique avait un plus grand potentiel d'induction de mort cellulaire que le CD40 homodimérique. Par conséquent pour pouvoir optimiser le rendement du CD40 dans tout traitement, il était nécessaire de déterminer le mécanisme de formation du CD40 homodimérique et son implication dans la réponse biologique. Ainsi, dans notre deuxième chapitre, nous avons analysé la translocation du CD40 dans les RLs, région dans laquelle se forme l'homodimère. Ainsi, nous avons démontré que la translocation du CD40 dans les RLs se faisait indépendamment de l'induction du PI-3K, des kinases de la famille SRC et le p38 MAPK. Par ailleurs, il s'est avéré que la région transmembranaire du CD40 était nécessaire pour la translocation du CD40 dans les RLs. De plus, le remplacement dans la région transmembranaire du CD40 afin de bloquer sa migration vers les RLs, nous a permis d'observer une réduction de l'activité de l'AKT ainsi qu'une abolition de l'expression du CD80 (**Discussion, fig. 2**). Dans le troisième chapitre, en s'appuyant sur ce que nous avons publié précédemment et nos récentes observations, nous avons démontré, d'une manière directe, que les RLs étaient nécessaires pour la homodimérisation du CD40. De plus, nous avons observé la présence d'un stress oxydatif favoriserait l'homodimérisation du CD40 au niveau de la cystéine intracellulaire indépendamment de la présence de son ligand naturel. De plus, nous avons démontré que l'homodimérisation du CD40 était indépendante de son association avec les TRAFs. Par ailleurs, nous avons démontré de manière directe, grâce à la mutation de la cystéine intracellulaire du CD40, que la phosphorylation de l'AKT nécessite l'homodimérisation du CD40 (**Discussion, fig. 2**). De plus, nos résultats suggèrent que l'homodimérisation du CD40 serait impliquée dans l'amplification de l'activation des cellules B par l'augmentation des récepteurs CD69, CD23 et le CD80 (**Discussion, fig. 2**). Nous avons

aussi démontré que l'induction du CD23 par le CD40 nécessiterait l'activation des voies JAK/STAT et/ou de la voie PI3-Kinase. Fait intéressant, nous avons observé que la mutation du CD40 au niveau de la cystéine 238 affecte le signal induit via le TLR4 dans la maturation et la différenciation des cellules B (**Discussion, fig. 2**).



**Figure 1: L'induction de la mort cellulaire par le CD40 nécessite la présence du TRAF6.** La présence du CD40 sous forme monomérique est suffisante pour l'induction de la mort cellulaire. À la suite de l'engagement du CD40 par un anticorps agoniste, il y a un recrutement du TRAF6 à la région intracellulaire du CD40. Cette association permettra la perméabilisation du lysosome conduisant à la libération des cathepsines (la cathepsine B, plus spécifiquement) pour ainsi induire la mort cellulaire par apoptose.



**Figure 2: L'importance de la translocation du CD40 et de son homodimérisation dans la réponse biologique.**

A) À la Suite d'une association du CD40 avec son ligand (CD40L), il y a une translocation vers les radeaux lipidiques où il y aura une homodimérisation du CD40 par le biais de la formation d'un pont disulfure (S-S), grâce à la présence du ROS. B) La translocation dans les radeaux lipidiques et l'homodimérisation du CD40 est nécessaire pour la phosphorylation de l'Akt ainsi que pour l'induction de l'expression du CD23, du CD69 et du CD80. C) Le CD40 homodimère est aussi nécessaire pour l'augmentation de la réponse induite par le TLR4. Cependant, l'interaction du CD40 homodimère et le TLR4 reste à être déterminée. D) La phosphorylation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (ERK, P38 et JNK) est indépendante de la formation du CD40 homodimère. De plus, le CD40 monomérique est suffisant pour l'induction de l'expression du CMH de classe II et du CD40 lui-même.

La compréhension du mécanisme d'induction de la mort cellulaire via le CD40 est essentielle vu la multiplication des traitements antitumoraux ainsi que l'émergence de plusieurs traitements impliquant le CD40. En effet, plusieurs études ont contribué à élucider ce phénomène depuis la première observation où le CD40 pouvait induire indépendamment la mort cellulaire [188]. Or, cette étude se révèle un peu complexe, car le mécanisme d'induction de la mort cellulaire par le CD40 varie d'un type cellulaire à un autre [189, 194, 208]. De plus,

cette induction de la mort cellulaire peut avoir un effet thérapeutique, comme elle peut avoir un effet nocif. Il a été démontré que le CD40 pouvait contribuer à l'inflammation hépatique par l'induction de la mort dans les hépatocytes [209].

En continuité avec nos études antérieures [189], nous avons tenté d'approfondir le mécanisme de l'induction de la mort cellulaire via le CD40. En se faisant, nous avons observé que le ROS était un élément important dans l'induction de la mort, car l'utilisation d'un capteur de ROS, N-acetyl-L-cystéine (NAC), a significativement réduit l'induction de la mort cellulaire. Ceci a déjà été abordé par Hess et al., qui ont réduit la cytotoxicité induite par le CD40 lorsqu'ils ont utilisé un autre capteur de ROS, le *butylated hydroxyanisole* (BHA) [188]. L'utilisation des ROS comme intermédiaire dans l'induction de la mort cellulaire par le CD40 semble être récurrente dans les différents types cellulaires puisque nous avons pu le constater dans nos propres modèles cellulaires, les cellules Raji et les cellules HEK 293 (**Ch. 2, Fig. 1**). Par ailleurs, dans la littérature, il a été démontré que les ROS ont été utilisés comme intermédiaires dans les fibroblastes et les hépatocytes pour l'induction de la mort [188, 209]. Dans notre modèle, que nous avons étudié antérieurement, nous avons démontré que la mort cellulaire induite par le G28-5 (anti-CD40) était indépendante de l'activation des caspases. Or, il a été démontré qu'une mort cellulaire programmée pouvait passer outre l'activation des caspases, en utilisant divers mécanismes [210-212]. Comme nous l'avons vu en introduction, les cathepsines représentent une voie d'induction de la mort cellulaire programmée qui peut utiliser ou non les caspases [212]. En effet, il a été démontré que les cathepsines B pouvaient induire une mort cellulaire dépendante ou indépendante de l'activation des caspases [164, 213]. Nos résultats suggèrent que l'induction de la mort cellulaire par le CD40 nécessiterait la libération des cathepsines du lysosomes, plus particulièrement, la cathepsine B (**Ch. 2, Fig. 1D**). L'apport de la cathepsine B et la déstabilisation lysosomale dans l'induction de la mort ont été observés dans les cellules B (CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) du CG provenant des amygdales [214]. Cette étude a démontré que l'apoptose des cellules B du CG pouvait être totalement indépendante de toute activation de caspases [214]. Ainsi, ils ont démontré qu'on pouvait induire la mort par le biais de la déstabilisation du lysosome et la libération de la cathepsine B suite à une incubation avec l'O-méthyl-L-serine dodecylamide hydrochloride (MSDH) qui s'accumule dans le lysosome pour ainsi le déstabiliser [214]. Par conséquent, l'inhibition de la caspase 8 (caspase

effectrice), par l'IETD, n'a pas permis d'empêcher l'induction de la mort par la voie lysosomale [214]. Or, cette étude a aussi démontré que l'induction du CD40 pouvait inhiber la perméabilisation du lysosome [214]. Cette observation vient renforcer l'idée que le rôle du CD40 dans la mort cellulaire varie selon les différents types cellulaires dans lesquels on induit la mort cellulaire. Comme nous l'avons décrit un ci-dessus, dans notre système, la mort cellulaire induite par le CD40 était caspase indépendante ([189]) tandis que cette mort était dépendante des caspase 3 et 9 dans les cellules urothéliales tumorales [194]. Par ailleurs, il a récemment été démontré que le CD40 pouvait sensibiliser les cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC) à la mort cellulaire par l'anti-CD20 monoclonal de type II (GA101) [163]. Donc, l'induction du CD40 sur les LLC, par co-culture à l'aide de cellules transfectées avec le CD40L, augmente le nombre de lysosomes et par conséquent la cathepsine B dans les LLC [163]. Ceci a pour conséquence de sensibiliser les LLC à la mort cellulaire via le lysosome par le GA101 [163]. Il est fort intéressant de noter que le même groupe a démontré que le CD40 était aussi capable de sensibiliser les LLC à la mort via le anti-CD20 monoclonal (chimérique) de type I (Rituximab) suite à mécanisme impliquant l'augmentation des ROS [215]. Comme on peut le voir, ces récentes études semblent corroborer nos propres observations du point de vue que le CD40 pourrait induire la mort cellulaire par des mécanismes impliquant les ROS, le lysosome ainsi que la cathepsine B.

La mort cellulaire induite par le CD40 se ferait de manière indépendante des récepteurs de la mort, soit les récepteurs de TNF et de FAS [188]. Cependant, le CD40 partage quelque similitude avec l'induction de la mort via le CMH de Classe II ainsi que celle induite par le CD20. De plus, le CD40 peut sensibiliser les cellules à la mort induite par le CD20. Par ailleurs, il a été démontré que le CD40 pouvait s'associer au CD20 et au CMH de Classe II [216, 217]. Ainsi, ceci pourrait suggérer une collaboration étroite entre les deux récepteurs et le CD40 pour l'induction de la mort cellulaire. Or, la transfection, dans les HEK 293 qui sont CD20<sup>-/-</sup> et CMH de Classe II <sup>-/-</sup>, de la forme mutée du CD40 ne possédant pas la partie cytoplasmique (hCD40-Δ) ou tronquée au niveau des sites de liaison des TRAFs (hCD40-ΔTRAFs), nous a permis de démontrer que la présence du CD40 était suffisante pour l'induction de la mort et que cette induction nécessiterait l'activation des voies signalétiques nécessitant l'association des TRAFs puisque la mort cellulaire a été abolie ou réduite en

présence de ces deux mutants (**Ch. 2, Fig. 2 et 5**). Nous avons utilisé différentes mutations affectant les différents sites d'interaction spécifique des TRAFs sur le CD40 afin de voir laquelle serait nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire par le CD40. Ces mutations nous ont permis d'observer l'implication du TRAF6 dans cette mort induite par le CD40 (**Ch. 2, Fig. 6**). Normalement, le TRAF6 est plus souvent associé à la survie cellulaire [191]. De plus, il a été démontré que le TRAF6 serait nécessaire lors du sauvetage des cellules B, A20, par le CD40 de la mort induite par le récepteur de FAS, suite à l'activation de la voie PI3 kinase/Akt [218]. Il a aussi été démontré que le TRAF6 avait un rôle redondant avec le TRAF2 qui joue un rôle majeur dans la prolifération et la survie induite par le CD40 [219]. Mais, il a été démontré récemment que le TRAF6 avait un rôle mitigé et pouvait aussi induire la mort cellulaire. En effet, il a été suggéré que le TRAF6 serait nécessaire pour l'induction de l'autophagie par le CD40 [220]. De plus, il a été démontré que le TRAF6 pouvait interagir avec le domaine DED du pro-Caspase 8, ce qui a pour effet d'activer le Caspase 8 et d'induire l'apoptose [221]. Le TRAF6 pourrait jouer un rôle primordial dans les traitements antitumoraux, car il a un impact sur plusieurs paliers différents que ce soit du point de vue de la survie et de la mort cellulaire ou même du point de vue la réponse immunitaire innée et adaptative [165].

Il a été aussi intéressant de démontrer que la forme monomérique du CD40 était suffisante pour l'induction de la mort cellulaire (**Ch. 2, Fig. 4**). Comme nous l'avons démontré antérieurement, le remplacement de l'unique cystéine présente dans la partie cytoplasmique du CD40 par une alanine empêcherait toute forme d'homodimérisation [222]. En plus d'être suffisante, la forme monomérique du CD40 pourrait en effet augmenter le niveau de mort cellulaire induite par le CD40. Ceci semble corroborer nos résultats concernant les voies de signalisation induite par le CD40 homodimérique. En effet, nous avons démontré précédemment, d'une manière indirecte et directe (section des résultats), que le db-CD40 dimère serait important pour l'activation de la voie PI3-kinase/Akt [59]. La voie PI3-kinase/Akt est normalement associée avec l'induction de la survie cellulaire [218]. De plus, il a été démontré que l'inhibition du PI3-kinase avec l'inhibiteur LY294002 favoriserait la libération de la cathepsine B ainsi que son activation et l'induction de la mort cellulaire dans les cellules endothéliales suite à un traitement par le TNF [164].

En somme, l'induction de la mort cellulaire par le CD40 dans les cellules endothéliales nécessiterait la présence de ROS, cathepsine B et une association du TRAF6 au CD40. De plus, le CD40 sous forme monomérique semble amplifier l'induction de la mort cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, l'induction de la mort par le CD40 semble une très bonne cible thérapeutique que ce soit pour les traitements antitumoraux et les traitements contre les maladies auto-immunes où la déplétion des cellules B semble bénéfique. Il faudra élaborer le mécanisme par lequel le CD40 induit l'activation de la cathepsine B et de déterminer l'implication de l'association du TRAF6 au CD40 à ce mécanisme. Il faudra utiliser un petit ARN interférent contre le TRAF6 pour déterminer le rôle du TRAF6 dans l'induction de la mort par le CD40. Ceci est important, car il a été découvert que le TRAF6 pouvait s'associer indirectement avec le CD40 via le TRAF2 [64, 65]. Ainsi, du même coup, on pourrait mieux étudier le rôle de ces deux types de liaison du TRAF6 avec le CD40 dans la signalisation. Par ailleurs, la collaboration et la synergie entre le CD20 et le CD40 pour l'induction de la mort sont présentement à l'étude dans notre laboratoire afin de pouvoir augmenter le potentiel du Rituximab dans la déplétion des cellules B chez les patients atteints de l'arthrite rhumatoïde.

L'impact de la dimérisation du CD40 sur les fonctions biologiques ne cesse d'être démontré par notre équipe que ce soit par l'induction de la voie PI3-kinase/Akt, l'augmentation du niveau de CD86 ou même gérer l'induction de la mort cellulaire, commentée ci-haut [59, 222]. Mais, des questions persistent soit quel est le mécanisme qui gère la formation du CD40 homodimère et quel est l'impact de cette dimérisation sur la réponse immunitaire. Grâce à une approche plus directe par le biais de la mutagenèse au niveau du CD40, nous avons voulu confirmer premièrement les résultats obtenus de manière indirecte, voir par le biais d'inhibiteurs chimiques, et deuxièmement démontrer le rôle du CD40 dimère dans la réponse immunitaire ainsi que son importance dans l'interaction de CD40 avec les différents acteurs de l'immunité.

Or en tout premier lieu, nous avons déjà proposé que la formation du *db*-CD40 homodimère se produise dans les RLs puisque nous avons observé une translocation du hCD40-C238A,

incapable de former de dimère, dans la région insoluble, avec le triton, de la membrane cytoplasmique [222]. Par ailleurs, ceci semble probable, car Vidalain, P.O. et al., on démontré l'existence du CD40 constitutivement association aux RLs dans les cellules dendritiques [223]. De plus, nous avons démontré dans le chapitre précédent que ce phénomène était aussi observé dans les cellules B<sub>jab</sub> avec la présence constitutive du CD40 dans les RLs. Par conséquent, il était tout à fait normal de voir que la signalisation induite par le CD40 n'était pas nécessaire pour sa translocation vers les RLs (**Ch. 3, Fig. 1A**). En effet, la forme tronquée du CD40, hCD40-Δ, migre vers les RLs suite à une stimulation avec le CD154 membranaire (**Ch. 3, Fig. 1B**). Ces constatations nous montrent l'importance que la région transmembranaire du CD40 pourrait avoir dans la translocation de ce dernier vers les RLs. Il a tout d'abord été démontré qu'une forme chimérique du CD40 possédant la région transmembranaire du CD45, incapable de migrer vers les RLs, était incapable de se regrouper en une plateforme sur la surface de la cellule [224]. La prochaine étape serait de pouvoir utiliser un modèle de cellules vivantes pour étudier cette migration du CD40 vers les RLs. Ainsi, la technique du FRET (Fluorescence resonance energy transfer) nous servirait à analyser le rapprochement du CD40 dans les cellules vivantes par microscopie. De plus, cette association du CD40 avec les RLs semble relevée d'une modification post-traductionnelle comme la palmitoylation qui est importante pour le transport, la stabilisation et l'agrégation des protéines [166]. Il serait intéressant de faire une analyse protéomique du CD40 afin de pouvoir déterminer les résidus impliqués dans les modifications post-traductionnelles subies par le CD40 pour mieux cerner ce mécanisme d'agrégation et de translocation vers les RLs. Cependant, cette palmitoylation devra nécessairement être faite sur une cystéine extracellulaire du CD40, car comme nous l'avons vu ci-haut, la région cytoplasmique du CD40 n'est pas nécessaire pour la translocation vers les RLs et l'unique cystéine dans cette région cytoplasmique est déjà utilisée pour la formation de dimère.

Les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans la signalisation transmembranaire. Il suffit de penser à l'important rôle qu'elle joue dans la formation de la synapse immunologique [225]. Une étude a démontré que la région cytoplasmique du CD40, lorsqu'elle est sous forme trimérique et modifiée par myristoylation et palmitoylation, était capable de s'associer avec les RLs. De plus, sous cette forme, la partie cytoplasmique, ainsi associée aux RLs, pouvait

induire l'activation du NFκB dans les cellules HEK 293, sans la présence du CD154 [226]. Pareillement, il a aussi été démontré que la présence du CD40 dans les RLs sous forme de signalosome pouvait induire constitutivement l'activation du NFκB dans les cellules B de lymphome non hodgkinien [86]. De plus, le CD40 peut induire la translocation d'autre récepteur dans les RLs comme le BCR [227]. Cette collaboration entre récepteurs a aussi été démontrée lorsqu'on a observé que la colocalisation du CMH de Classe II avec les TLR 2/4 dans les RLs augmentait la réponse induite par les TLR 2/4 [228]. Du point de vue de la signalisation, il a été démontré que l'interaction du CD40 avec certains membres des TRAFs se faisait dans les RLs [223]. Grâce à la séquestration du CD40 hors du RLs, à l'aide du hCD40/CD45, nous avons démontré que les RLs étaient important pour l'activation de l'Akt ainsi que l'induction du CD80 à la surface des cellules A20 (**Ch. 3, Fig. 3**). Or, nous avons démontré que l'activation de l'Akt passait par la translocation du CD40 dans les RLs ainsi que la dimérisation du CD40. Fait intéressant, il a été démontré que l'activation de l'Akt se faisait plus rapidement dans les RLs [171]. De plus, il a été démontré qu'une forme constitutivement activée et dirigée vers les RLs de l'Akt pour la maturation, notamment l'augmentation du CD80 à la surface, et la survie des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse [229]. Cette nécessité des RLs dans la signalisation du CD40 suite à son association avec son ligand, CD154, est bidirectionnelle. En effet, notre équipe a démontré que la translocation du CD154 dans les RLs était requise pour l'activation de l'Akt, du p38 ainsi que la production d'IL-2 par les cellules jurkat E6.1 transfectée avec une forme chimérique du CD154 incapable de migrer vers les RLs [172]. L'utilisation de nos deux formes mutées du CD40 et du CD154 incapable de migrer vers le RLs sera importante puisqu'on pourra démontrer l'effet réciproque de ses mutants sur les cellules opposées. Ainsi, on pourra confirmer ou infirmer les résultats de Grassmé, H. et al., qui ont démontré que l'agrégation du CD154 dans les RLs était un préalable pour la translocation du CD40 dans les RLs [230]. Sachant le rôle des RLs dans la mise en place d'une plate forme nécessaire pour la dimérisation du CD40 ainsi que sa signalisation, il faut maintenant déterminer comment cette dimérisation se fait dans les RLs.

Nos études ont démontré que la translocation vers les RLs était un prérequis pour la dimérisation. De plus, nous avons démontré, grâce au NAC, que les ROS semblent jouer un rôle dans l'oxydation du groupe thiol présent dans la cystéine 238 [222]. Vu cette faible

diminution du dimère suite au traitement du NAC, nous avons voulu prendre une autre approche. Ainsi, en utilisant le diamide, un pro-oxydant, nous avons observé une dimérisation du CD40, sans l'utilisation d'anticorps ou de CD154, lorsqu'une forte concentration du diamide a été utilisée (**Ch. 4, Fig. 1A**). De plus, nous avons observé que le traitement des cellules par le diamide suivi par l'anticorps, G28-5, avait augmenté la quantité de dimère par rapport au diamide tout seul (**Ch. 4, Fig. 1B**). Cela a été confirmé aussi par l'utilisation du hCD40-C238A qui a bloqué la formation du dimère malgré la présence du diamide (**Ch. 4, Fig. 1B**). Ainsi, ceci nous a permis de déduire que le diamide induisait bien la formation du dimère et que le ROS était nécessaire pour l'oxydation du groupe thiol. En addition, nos expériences avec le diamide nous suggèrent, hors de tout doute, que la cystéine impliquée dans la dimérisation du CD40, pour la formation du pont disulfure, est bien celle de la région cytoplasmique et non pas les autres dans la région extracellulaire. L'initiation de la production de ROS pourrait venir de l'activation du CD40, car nous avons observé que le CD40 était capable de générer du ROS comme d'autres équipes d'ailleurs [91, 231]. Nos résultats suggèrent que cette production de ROS, par le CD40, est un précurseur à la formation du dimère, car le hCD40-C238A monomérique induit la production de ROS (**Ch. 4, Fig. 3A**). La voie utilisée par le CD40 pour la production du ROS reste à déterminer. Cette production pourrait utiliser deux différentes familles d'enzyme soit les NADPH oxydases ou le 5-lipoxygénase comme il a été déjà démontré [62, 231]. Afin de démontrer quelles enzymes sont impliquées dans la production du ROS initiée par le CD40, il existe des petits ARN interférents contre les membres de la famille des NADPH oxydases et des inhibiteurs chimiques spécifiques au 5-lipoxygénase qui pourront être utilisés [231, 232]. Par ailleurs, il serait judicieux de voir le rôle que pourrait jouer le RAC1 dans cette production du ROS par le CD40 puisqu'il semble que le RAC1 est impliqué dans la production du ROS par les deux familles (NADPH oxydases et 5-lipoxygénase) [231].

La forme adoptée par le CD40 à la surface de la cellule est jusqu'à présent largement débattue. Il y a présentement deux modèles proposés : soit un homotrimère pré-assemblé à la surface qui se lie avec son ligand trimérique, soit plusieurs homodimères qui se lient avec le ligand trimérique [82]. Étant membre de la grande famille des TNF récepteurs, il a été émis que le CD40 adopte une forme trimérique pré-assemblée à la surface [16]. Ainsi, ce PLAD dans la

région extracellulaire du CD40 serait nécessaire pour la liaison du ligand et l'initiation de la signalisation [16, 82]. Cependant, une étude est venue bousculer ce modèle, car il démontre que le PLAD n'est pas nécessaire dans la signalisation du CD40 [233]. Cette étude est plus axée sur l'effet de la signalisation du CD40 et l'effet du PLAD sur cette dernière que sur la structure adoptée par le CD40 à la surface. Il est désormais acquis que la partie cytoplasmique du CD40, sans l'apport de la partie extracellulaire, est capable d'induire la signalisation lorsqu'elle est dirigée vers les RLs [226]. Par ailleurs, il a été démontré qu'une trimérisation de la région cytoplasmique uniquement était capable d'induire l'activation du NF $\kappa$ B d'une manière plus efficace qu'une forme dimérique de la région cytoplasmique [234]. Or, une équipe a récemment réussi à faire une étude cristallographique du complexe CD40/CD154 [35]. Leur modèle suggère que le CD154 trimérique s'associerait avec le CD40 dimérique. Quoique cette étude soit importante, elle est incomplète, car dans leur modèle le CD40 est amputé de son domaine cytoplasmique [35]. Malgré tout, ce modèle est similaire à un des deux modèles proposés pour le récepteur du TNF (TNFR1) où un TNFR dimérique se lierait avec son ligand sous forme homotrimérique [235]. Il sera important de comparer la structure cristallographique du CD40 et celle de la forme mutée du CD40, hCD40-C238A, en combinaison avec le CD154 homotrimère afin de déterminer le modèle le plus plausible pour l'association du CD40 avec le CD154. Mais en attendant cette étude cristallographique, nous pouvons spéculer, à partir de nos résultats, des récentes études sur l'agrégation du CD40 et du fait que du CD40 homodimères peut être constitutivement présent à la surface des cellules B ([25]), que plusieurs CD40 homodimériques se lieraient avec un CD154 homotrimérique. Ainsi, l'agrégation de plusieurs complexes de ce genre nous donnerait le rassemblement d'un CD40 homotrimérique.

La dimérisation du CD40 semble jouer un rôle important dans la réponse immunitaire. À titre d'exemple, nous avons observé que la présence de CD40 homodimère sur les cellules présentatrices d'antigènes est essentielle pour la production d'IL-2 par les cellules T [222]. Par ailleurs, de manière indirecte, nous avons démontré que CD40 dimère est nécessaire pour l'induction du CD86 et la production d'IL-8 [59, 236]. De plus, nos résultats ont démontré, à l'aide des mutants générés, que l'expression de CD80, CD23 et CD69 était réduite quand le CD40 était incapable de former un dimère (**Ch. 4, Fig. 4**). Par ailleurs, on pourrait extrapoler

l'importance du CD40 homodimère dans les cellules B primaires. En effet, Ahonen et al. ont démontré, à l'aide de souris transgéniques exprimant le hCD40, avec différentes mutations empêchant l'association spécifique de certains TRAFs, que l'induction des molécules co-stimulatrices (CD80, CD86, CD95 et CD54) et la production initiale d'Ig par le CD40 se faisaient indépendamment de la présence des TRAFs durant l'initiation de la différenciation des cellules B [105]. De plus, Haswell et al., ont démontré que l'engagement du CD40 sur les splénocytes murines par une forme dodécamérique du CD154 induisait plus fortement le niveau d'expression des molécules co-stimulatrices (CD86, ICAM-1) par rapport au CD154 trimérique [237]. Ainsi, on peut suggérer que la forte agrégation du CD40 serait nécessaire pour l'induction de la réponse induite par le CD40. Par conséquent, la diminution observée du niveau d'expression du CD23, CD80 et CD69 lorsqu'on est en présence du hCD40-C238A semble démontrer que la dimérisation du CD40 est importante pour l'activation des cellules B.

Le rôle du CD40 dans l'expression du CD23 a été bien documenté. Il a tout d'abord été démontré qu'une troncation dans la partie cytoplasmique à la hauteur du site liaison du TRAF2 affectait la production du CD23 [121]. Or, dans ce modèle, la cystéine 238 faisait aussi partie des aa tronquées [121]. Nos résultats démontrent que la cystéine 238 semble jouer un rôle déterminant dans la production du CD23. Il a déjà été démontré que l'induction du CD23 par le CD40 nécessiterait l'activation du STAT3 [69]. Cette même étude a démontré, à l'aide d'une mutation au niveau de la proline 227 du CD40, que l'activation du STAT3 était induite suite à l'association du JAK3 au CD40 [69]. Ainsi, nous avons observé une certaine similitude dans l'induction du CD23 entre le hCD40-P227A et le hCD40-C238A (**Ch. 4, Fig. 5**). Hanassian, S.H. et al., ont suggéré que l'induction du CD23 par le CD40 nécessiterait l'activation du STAT3 [69]. La similarité présumée entre les mutations hCD40-C238A et hCD40-P227A rend l'étude de la dimérisation du CD40 pertinente dans la caractérisation du rôle du CD40 dans les maladies auto-immunes. En effet, il a été démontré que la mutation hCD40-P227A découle d'un polymorphisme du CD40 (rs11086998) qui est surreprésenté dans des populations mexicaines et sud-américaines atteintes du lupus [73]. De plus, la mutation P227A a été associée avec un gain de fonction (une augmentation de la sécrétion d'anticorps et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ )) comme il a été mentionné précédemment [73].

Ainsi, on a voulu déterminer si le hCD40-P227A était incapable de former un dimère comme

le hCD40-C238A. Or, le hCD40-P227A était toujours capable de former un dimère tout comme les autres formes mutées du CD40 incapable de s'associer avec les membres des TRAFs (**Ch. 5, Fig. 3**). Donc, il se pourrait que les polymorphismes du CD40 qu'on retrouve dans les maladies auto-immunes soient toujours capables de former un CD40 homodimère comme cela a été observé dans le hCD40-P227A (rs11086998). Il serait intéressant d'étudier le polymorphisme du CD40 (rs4810485) qu'on retrouve dans les patients atteints d'AR pour démontrer si ce polymorphisme du CD40 serait toujours capable de former un dimère. Le fait que le hCD40-P227A soit toujours capable de former un homodimère laisse présager que d'autres voies sont aussi impliquées dans l'induction du CD23. Nos résultats suggèrent que l'activation de la voie PI3K/Akt par le CD40 serait aussi nécessaire pour l'induction du CD23 puisque l'inhibiteur LY294002 a aboli l'induction du CD23 par le CD40 (**Ch. 4, Fig. 6**). Or, ceci va un peu à l'encontre de ce qui a été démontré dans la littérature où on a observé que l'activation de la voie PI3K ne serait pas requise pour l'induction du CD23 durant le développement des cellules B [238]. Plusieurs voies semblent être impliquées dans l'expression du CD23. En effet, l'induction du CD23 par le RBC, dans les cellules B matures, est modulée par le facteur de transcription FOXO1 [239]. De plus, il a été démontré que le CD40 serait capable d'induire l'induction du CD23 par le biais du TRAF5 [122]. Récemment, il a été démontré que cette induction du CD23 par le CD40 pouvait aussi passer par l'activation du NFκB [240]. De plus, le CD40 peut agir avec des interleukines comme IL-4 pour induire la production du CD23 [241]. Ainsi, le mécanisme d'induction du CD23 par le CD40 est fort complexe et gagne à se faire connaître. Le fait que la stimulation du CD40-C238A affecte l'induction du CD23 nous permettra de mieux étudier les voies de signalisation impliquées dans cette induction. Ceci nous permettra de mieux comprendre le rôle du CD40 dans les maladies auto-immunes, car il a été suggéré que le blocage du CD23 dans les monocytes empêchait l'activation de ces dernières et prévenait la destruction des os chez les modèles de rats atteints d'arthrite [242]. Par ailleurs, les cellules B de patients atteints d'arthrite rhumatoïde étaient caractérisées par une surexpression de CD23 à la surface qui a pu être réduite par le blocage de l'interaction CD40/CD40L [243].

L'utilisation de l'inhibiteur du PI3K, LY294002, nous a permis d'observer que la voie PI3K/Akt semble aussi être utilisée par le TLR4 pour l'induction du CD23 (**Ch. 5, Fig. 4B**).

Ceci tend à suggérer que le CD40 et le TLR4 partagent la même voie de signalisation pour l'induction du CD23. Plus intéressant encore, nous avons démontré que la transfection du hCD40-C238A, dans les cellules A20, affectait l'induction du CD23 par le TLR4 suite à une stimulation avec le LPS (**Ch. 5, Fig. 1B**). Il a été démontré récemment que le CD40 était un accessoire important pour le CMH de classe II qui jouerait un rôle majeur dans l'activation de l'immunité innée via le TLR4 [149]. Ainsi, dans cette étude, il a été suggéré que le CMH de classe II agirait comme une molécule adaptatrice dans la signalisation du TLR4 pour l'induction d'IL-6, TNF et l'interféron  $\beta$  (INF- $\beta$ ) [149, 244]. Plus intéressant encore, cette étude démontre aussi l'implication du CD40 dans le rôle accompli par le CMH classe II. L'apport du CD40 viendrait de l'activation du BTK qui est requis dans l'induction d'IL-6, TNF et INF- $\beta$  [149]. Cette étude a démontré l'importance du CD40 puisque les macrophages CD40<sup>-/-</sup> ne pouvaient plus activer le BTK suite à une stimulation par le LPS et par conséquent était incapable de renforcer la signalisation du TLR4 en se liant au MyD88 et TRIF [149]. Nos résultats suggèreraient une coopération similaire entre le TLR4 et le CD40 du point de vue de l'activation des cellules B. Encore plus important, notre étude suggère que cette coopération entre le TLR4 et le CD40 passe par le biais de la dimérisation du CD40. Afin de mieux cerner l'apport du CD40 dans la signalisation des TLRs, il faudrait étudier le rôle du CD40 dimère dans l'activation du BTK ainsi que l'apport du CD40 dimère dans l'induction des cytokines pro-inflammatoires. De plus, notre étude sur la coopération entre le CD40 homodimère et les TLRs devra être poussée plus loin afin de mieux comprendre le mécanisme qui régit cette coopération. En effet, il faudrait déterminer si l'induction du CD23 par le TLR4 dans des cellules B CD40<sup>-/-</sup> sera affectée. De plus, il semblerait que la localisation de cette interaction serait importante. En effet, Liu et al., ont démontré que l'apport du CD40 dans la signalisation du TLR4 se ferait au niveau intracellulaire ce qui est assez intrigant vu la présence du CD40 à la surface des cellules [149]. Dans notre cas, il faudrait déterminer s'il y aurait une association du CD40 avec les TLRs à la surface, une colocalisation du CD40 avec les TLRs dans les RLs ou dans l'endosome. De plus, on devrait déterminer si cette association serait affectée par la perte de la dimérisation du CD40. S'il s'avère que le CD40 monomérique dans les macrophages peut avoir le même effet sur la stimulation des TLRs que la déficience du CD40, la portée thérapeutique serait immense puisqu'on n'aurait pas besoin de méthode invasive pour

éradiquer le CD40 ou le BTK. Il suffirait entre autres de bloquer la dimérisation du CD40, à l'aide d'antioxydants par exemple, pour aider à régulariser la réponse immunitaire innée induite par les TLRs. De plus, l'agoniste du TLR4, le LPS, a deux effets paradoxaux sur l'expression du CD23 à la surface de la surface. Or, le travail de Jackson L. et al., ([245]) démontre que la stimulation du TLR4 par le LPS induisait le clivage du CD23 par la métalloprotéinase de la matrice (MMP9) dans les cellules B murins et humaines tandis que l'étude de Hayashi, E. A. et al., ([207]) démontre que la stimulation du TLR4 par le LPS induisait l'expression du CD23 à la surface de la cellule B murins. De ces deux études, on peut déduire, dans un premier temps, que la stimulation du TLR4 joue un rôle dans la maturation des cellules B par l'induction du CD23 entre autres [207]. Puis, dans un deuxième temps, ce même TLR4 joue un rôle dans le clivage du CD23 sur les cellules B matures afin de former du CD23 soluble dans le but de réguler la production d'IgE [245]. Par conséquent, il serait intéressant de démontrer si le CD40 pourrait aussi jouer un rôle dans le clivage du CD23 suite à une stimulation au LPS en comparant l'effet de la présence du CD40 dimérique par rapport à celle du CD40 monomérique. Afin de bien cerner le rôle du LPS dans les cellules B humaines, il faudra étudier l'effet du LPS sur les différentes populations des cellules B. En effet, les cellules B humaines répondent très peu au LPS en comparaison avec les cellules B murines ([246]) puisque le niveau du TLR4 dans les cellules B humaines varie selon la population, le stade d'activation et de différenciation des cellules [246, 247]. Il a été démontré, dans une récente étude, qu'il y avait une augmentation de la différenciation après une stimulation par le LPS des cellules B humaines activées par le CD40 [247]. De plus, cette stimulation par le LPS augmentait la sécrétion d'IL-6 dans les cellules B humaines activées par le CD40 [247]. Par conséquent, il serait intéressant d'observer l'impact du CD40 homodimère dans cette augmentation de la différenciation et la production d'IL-6 des cellules B humaines activées par le CD40 puis stimulées par le LPS. De plus, il faudra aussi évaluer l'impact de cette interaction du CD40 homodimère avec le TLR4 dans différents types cellulaires (les macrophages et les CD4 humaines par exemple) afin de bien comprendre le rôle de ce tandem (CD40/TLR4) dans la réponse immunitaire humaine.

Finalement, notre laboratoire a démontré que le CD40 homodimères seraient important pour l'augmentation du nouveau d'expression de molécules co-stimulatrices telles que le CD80,

CD86, CD69, CD23. Ces observations pourraient être pertinentes dans la caractérisation du rôle du CD40 homodimère dans la réponse immunitaire. En effet, l'utilisation d'un anti-CD40 monoclonal agoniste, le CP-870,893, permettrait l'activation des cellules B humaines provenant du sang périphérique (PBMC) en induisant l'augmentation du niveau d'expression du CD86, CMH de classe II et I ainsi que l'augmentation de la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-10 [248]. Par ailleurs, une co-stimulation du CD40 (CP-870,893) et du TLR-9 (CpG ODN) amplifierait l'activation des cellules B humaines [248]. Il serait intéressant de démontrer si le CP-870,893 pouvait induire la dimérisation du CD40 [248]. Par ailleurs, il a récemment été démontré que le traitement de cellules B humaines provenant des PBMCs avec une dioxine (La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou TCDD) diminuerait l'activation de la voie PI3K/Akt ainsi que l'induction du niveau d'expression du CD80, CD86, CD69 à la suite d'une stimulation par le CD154 [249]. Or, il faudrait voir si le TCDD pouvait bloquer la dimérisation du CD40.

## **Conclusion**

Comme il a été suggéré dans la discussion, il y aura beaucoup d'expériences à faire afin de dégager le potentiel de la dimérisation du CD40 dans la réponse immunitaire innée et humorale. Outre les expériences *in vitro* réalisées et les expériences à approfondir discutées dans la section précédente, nous avons aussi essayé de générer un modèle de souris transgénique dans lequel on retrouverait un CD40 murin muté au niveau de la cystéine intracellulaire afin de pouvoir mesurer l'impact de la dimérisation du CD40 dans une étude *in vivo*. Nous avons pu isoler des souris transgéniques possédant l'ARNm du CD40-C238A murin. Cependant, nous n'avons pu détecter une production de la protéine. Ceci nous laisse présager que les souris transgéniques sélectionnées avaient un défaut post-traductionnel de la protéine qui peut mener à sa dégradation. Pour avoir un modèle de souris transgénique possédant le CD40-C238A murin, nous pourrions utiliser la méthode du *knock-in* par le biais de laquelle on introduirait le CD40-C238A murin dans des souris CD40<sup>-/-</sup>.

Un modèle transgénique sera fort utile pour étudier le développement des cellules B, des cellules dendritiques et des macrophages. De plus, nous pourrions aussi étudier l'effet du CD40 homodimérique sur la commutation isotypique. Dans la littérature citée précédemment, il a été démontré que l'éradication du CD40 dans les macrophages affectait la production d'IL-6, INF- $\beta$  et le TNF. Par conséquent, nous pourrions utiliser notre modèle transgénique pour voir l'effet du CD40 dimère sur leur production. Deux récentes études sur l'arthrite rhumatoïde ont démontré que l'utilisation du ARNi du CD40 ou un peptide inhibiteur du Rac1 pourrait avoir un effet bénéfique [162, 250]. En premier lieu, nous allons démontrer si le CD40-C238 murin aurait des effets similaires à ces deux études suite à un modèle d'arthrite induit par le collagène. Ainsi, nous allons vérifier si le CD40-C238A peut inhiber la production d'IL-2, de TNF- $\alpha$ , d'IL-17 et d'INF- $\gamma$  ainsi que l'augmentation de la population des cellules T régulatrices (Treg) et la réduction des symptômes de l'arthrite telle que l'inflammation des pattes de souris transgéniques CD40-C238 murin. En deuxième lieu, si les effets sont similaires, on pourrait voir si l'utilisation du peptide inhibiteur du Rac1 bloque la formation constitutive de CD40 homodimère puisque le Rac1 est un élément important de la production des ROS.

L'interaction du CD40 avec les différents récepteurs joue un rôle important dans la réponse immunitaire. Puisque nous avons démontré que le CD40 peut être impliqué dans la réponse induite par le TLR4, nous pouvons utiliser un modèle de souris TLR4-/- pour voir l'impact réel du CD40 homodimère sur la signalisation du TLR4. De plus, nous pourrions aussi étudier le rôle du CD40 homodimère dans la protection des cellules B immature contre la mort induite par le RCB. Bref, un modèle transgénique murin du CD40-C238A nous offrira une pléthore de nouvelles opportunités pour une étude approfondie du CD40 homodimère dans l'interaction du CD40 avec différents récepteurs, dans la réponse immunitaire, dans les maladies auto-immunes et même dans les maladies cardio-vasculaires.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère un rôle important du CD40 homodimère dans l'activation des cellules B ainsi qu'une nouvelle fonction du CD40 homodimère dans la réponse immunitaire innée induite via le TLR4. De plus, nous avons essayé de démontrer que le CD40 monomérique pourrait induire un gain de fonction dans l'induction de la mort cellulaire des cellules tumorales par le CD40 et pourrait aussi diminuer l'induction de la réponse immunitaire pro-inflammatoire. Ceci pourrait avoir une importante portée thérapeutique, en combinaison avec des traitements déjà disponibles, pour le traitement de tumeurs et des maladies auto-immunes. Ainsi, le CD40 monomérique pourrait amener un avantage thérapeutique énorme et moins invasif. En effet, au lieu d'éradiquer le CD40, on pourrait utiliser des mutants du CD40L qui lierait uniquement le CD40 monomère. Par conséquent, on serait en présence d'un traitement spécifique et momentané. Nos résultats ne font qu'effleurer le rôle du db-CD40 homodimères dans la réponse immunitaire et la polyvalence du CD40 nous imploré de persévérer afin de maximiser le potentiel du CD40 dans les divers traitements.

## Bibliographie

1. 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.
2. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
3. Hollenbaugh, D., et al., *The role of CD40 and its ligand in the regulation of the immune response*. Immunol Rev, 1994. **138**: p. 23-37.
4. Uckun, F.M., et al., *Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2449-2456.
5. Carlring, J., et al., *CD154-CD40 interactions in the control of murine B cell hematopoiesis*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(5): p. 697-706.
6. Grandien, A., A. Bras, and C. Martinez, *Acquisition of CD40 expression during murine B-cell differentiation*. Scand J Immunol, 1996. **43**(1): p. 47-55.
7. Galy, A.H. and H. Spits, *CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells*. Journal of immunology 1992. **149**(3): p. 775-782.
8. Schönbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
9. Hart, D.N. and J.L. McKenzie, *Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells*. J Exp Med, 1988. **168**(1): p. 157-70.
10. Schriever, F., et al., *Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype*. J Exp Med, 1989. **169**(6): p. 2043-58.
11. Wagner, D.H., Jr., et al., *Increased expression of CD40 on thymocytes and peripheral T cells in autoimmunity: a mechanism for acquiring changes in the peripheral T cell receptor repertoire*. Int J Mol Med, 1999. **4**(3): p. 231-42.
12. Vaitaitis, G.M. and D.H. Wagner, Jr., *High distribution of CD40 and TRAF2 in Th40 T cell rafts leads to preferential survival of this auto-aggressive population in autoimmunity*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2076.
13. Munroe, M.E., *Functional roles for T cell CD40 in infection and autoimmune disease: the role of CD40 in lymphocyte homeostasis*. Seminars in immunology, 2009. **21**(5): p. 283-288.
14. Wagner, D.H., Jr., et al., *Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3782-7.
15. Vaitaitis, G.M. and D.H. Wagner, *CD40 glycoforms and TNF-receptors 1 and 2 in the formation of CD40 receptor(s) in autoimmunity*. Molecular immunology, 2010. **47**(14): p. 2303-2313.
16. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-2354.
17. Gruss, H.J., J. Duyster, and F. Herrmann, *Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease*. Ann Oncol, 1996. **7 Suppl 4**: p. 19-26.
18. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 184-95.

19. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. Trends in biochemical sciences, 1998. **23**(2): p. 74-79.
20. 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.
21. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(9): p. 745-756.
22. Tone, M., et al., *Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(4): p. 1751-1756.
23. Moses, A.V., et al., *HIV-1 induction of CD40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1242-9.
24. Haxhinasto, S.A., B.S. Hostager, and G.A. Bishop, *Cutting edge: molecular mechanisms of synergy between CD40 and the B cell antigen receptor: role for TNF receptor-associated factor 2 in receptor interaction*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1145-9.
25. Braesch-Andersen, S., et al., *Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40*. Journal of immunology, 1989. **142**(2): p. 562-567.
26. Lanzi, G., et al., *Different molecular behavior of CD40 mutants causing hyper-IgM syndrome*. Blood, 2010. **116**(26): p. 5867-5874.
27. van Kooten, C., et al., *B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 787-92.
28. Contin, C., et al., *Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(35): p. 32801-32809.
29. Grammer, A.C. and P.E. Lipsky, *CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms*. Advances in immunology, 2000. **76**: p. 61-178.
30. Lane, P., et al., *Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1209-13.
31. 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.
32. Ludewig, B., et al., *Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(12): p. 3137-43.
33. Pietravalle, F., et al., *Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 725-8.
34. Wykes, M., et al., *Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 548-59.
35. An, H.-J., et al., *Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation*. Journal of Biological Chemistry, 2011.
36. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.

37. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. *Circulation*, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
38. Léveillé, C., et al., *CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(8): p. 5143-51.
39. Williams, K.T., et al., *C4b binding protein binds to CD154 preventing CD40 mediated cholangiocyte apoptosis: a novel link between complement and epithelial cell survival*. *PLoS ONE*, 2007. **2**(1): p. e159.
40. Lindahl, G., U. Sjobring, and E. Johnsson, *Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 44-51.
41. Clark, E.A. and A. Craxton, *A CD40 bridge between innate and adaptive immunity*. *Immunity*, 2003. **18**(6): p. 724-5.
42. Brodeur, S.R., et al., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. *Immunity*, 2003. **18**(6): p. 837-48.
43. 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.
44. Chen, T. and X. Cao, *Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(6): p. 1541-4.
45. Pido-Lopez, J., et al., *Stimulation of cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up-regulates APOBEC3G expression in CD4(+) T cells and dendritic cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1671-9.
46. Nolan, A., et al., *Cd40 but not CD154 knockout mice have reduced inflammatory response in polymicrobial sepsis: a potential role for Escherichia coli heat shock protein 70 in CD40-mediated inflammation in vivo*. *Shock*, 2004. **22**(6): p. 538-42.
47. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function*. *Nature Reviews Immunology*, 2004. **4**(10): p. 775-786.
48. Bradley, J.R. and J.S. Pober, *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)*. *Oncogene*, 2001. **20**(44): p. 6482-91.
49. Kobayashi, N., et al., *Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis*. *EMBO J*, 2001. **20**(6): p. 1271-80.
50. Zapata, J.M. and J.C. Reed, *TRAF1: lord without a RING*. *Sci STKE*, 2002. **2002**(133): p. pe27.
51. Xu, L.G., L.Y. Li, and H.B. Shu, *TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17278-82.
52. Zotti, T., P. Vito, and R. Stilo, *The seventh ring: exploring TRAF7 functions*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(3): p. 1280-4.
53. Bouwmeester, T., et al., *A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(2): p. 97-105.
54. Ritterhoff, S., et al., *The WD40-repeat protein Han11 functions as a scaffold protein to control HIPK2 and MEKK1 kinase functions*. *EMBO J*, 2010. **29**(22): p. 3750-61.
55. Pullen, S.S., et al., *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization*. *Biochemistry*, 1999. **38**(31): p. 10168-10177.
56. Lee, H.H., et al., *Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1421-6.

57. Xie, P., et al., *Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5388-400.
58. Munroe, M.E. and G.A. Bishop, *A costimulatory function for T cell CD40*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 671-82.
59. 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*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(9): p. 7799-7806.
60. Hauer, J., et al., *TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(8): p. 2874-2879.
61. Manning, E., et al., *Cellular responses to murine CD40 in a mouse B cell line may be TRAF dependent or independent*. European journal of immunology, 2002. **32**(1): p. 39-49.
62. Ha, Y.J. and J.R. Lee, *Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*. Journal of immunology 2004. **172**(1): p. 231-239.
63. Nakano, H., et al., *Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(17): p. 9803-9808.
64. Rowland, S.L., et al., *A novel mechanism for TNFR-associated factor 6-dependent CD40 signaling*. Journal of immunology 2007. **179**(7): p. 4645-4653.
65. Davies, C.C., et al., *TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(22): p. 9806-9819.
66. Moore, C.R. and G.A. Bishop, *Differential regulation of CD40-mediated TNF receptor-associated factor degradation in B lymphocytes*. Journal of immunology 2005. **175**(6): p. 3780-3789.
67. Vivarelli, M.S., et al., *RIP links TLR4 to Akt and is essential for cell survival in response to LPS stimulation*. The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(3): p. 399-404.
68. Ghoreschi, K., A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Janus kinases in immune cell signaling*. Immunological reviews, 2009. **228**(1): p. 273-287.
69. 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. 379-387.
70. 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.
71. Gulbins, E., et al., *Activation of the Ras signaling pathway by the CD40 receptor*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2844-50.
72. Knox, P.G., et al., *The death domain kinase RIP1 links the immunoregulatory CD40 receptor to apoptotic signaling in carcinomas*. J Cell Biol, 2011. **192**(3): p. 391-9.
73. Peters, A.L., et al., *A novel polymorphism of the human CD40 receptor with enhanced function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1863-1871.

74. Peters, A.L. and G.A. Bishop, *Differential TRAF3 utilization by a variant human CD40 receptor with enhanced signaling*. Journal of immunology 2010. **185**(11): p. 6555-6562.
75. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunological reviews, 2009. **229**(1): p. 152-172.
76. Fotin-Mleczek, M., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(1): p. 677-685.
77. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
78. Ihle, J.N., *STATs: signal transducers and activators of transcription*. Cell, 1996. **84**(3): p. 331-4.
79. Ahmed-Choudhury, J., et al., *CD40 mediated human cholangiocyte apoptosis requires JAK2 dependent activation of STAT3 in addition to activation of JNK1/2 and ERK1/2*. Cellular signalling, 2006. **18**(4): p. 456-468.
80. Chan, F.K.-M., *Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling*. Cytokine, 2007. **37**(2): p. 101-107.
81. Siegel, R.M., et al., *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-7.
82. Chan, F.K., *Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling*. Cytokine, 2007. **37**(2): p. 101-7.
83. Jin, S., et al., *Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(4): p. 1043-83.
84. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
85. Werneburg, B.G., et al., *Molecular characterization of CD40 signaling intermediates*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43334-42.
86. Pham, L.V., et al., *A CD40 Signalingosome 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.
87. Kaykas, A., K. Worringer, and B. Sugden, *CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2641-54.
88. Vidalain, P.O., et al., *CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts*. Embo J, 2000. **19**(13): p. 3304-13.
89. Vilhardt, F. and B. van Deurs, *The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly*. EMBO J, 2004. **23**(4): p. 739-48.
90. Ha, Y.J. and J.R. Lee, *Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 231-9.
91. Lee, J.R., *Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine treatment*. Mol Cell Biochem, 2003. **252**(1-2): p. 1-7.
92. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.

93. Reth, M., *Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1129-34.
94. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
95. Braesch-Andersen, S., et al., *Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 562-7.
96. Baker, M.P., et al., *Prolonged phenotypic, functional, and molecular change in group I Burkitt lymphoma cells on short-term exposure to CD40 ligand*. Blood, 1998. **92**(8): p. 2830-43.
97. 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.
98. Girouard, J., et al., *Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 773-80.
99. 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.
100. Xu, Z., et al., *Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 517-31.
101. Loren D Erickson, L.A.V.M.C.J.W.M.W.B.G.D.R.J.N., *B cell immunopoiesis: visualizing the impact of CD40 engagement on the course of T cell-independent immune responses in an Ig transgenic system*. European journal of immunology, 2000. **30**(11): p. 3121.
102. Notarangelo, L.D., et al., *CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 511-6.
103. Jabara, H., et al., *The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 265-76.
104. Jabara, H.H., et al., *TRAF2 and TRAF3 independently mediate Ig class switching driven by CD40*. International Immunology, 2009. **21**(4): p. 477-488.
105. Ahonen, C., et al., *The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 451-6.
106. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
107. Friedl, P., A.T. den Boer, and M. Gunzer, *Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 532-45.
108. Boisvert, J., S. Edmondson, and M.F. Krummel, *Immunological synapse formation licenses CD40-CD40L accumulations at T-APC contact sites*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3647-52.
109. Barcia, C., et al., *CD20, CD3, and CD40 ligand microclusters segregate three-dimensionally in vivo at B-cell-T-cell immunological synapses after viral immunity in primate brain*. J Virol, 2008. **82**(20): p. 9978-93.
110. Riol-Blanco, L., et al., *Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 753-60.

111. Clatza, A., et al., *CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6478-87.
112. Chambers, C.A., *The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited*. Trends Immunol, 2001. **22**(4): p. 217-23.
113. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
114. Pentcheva-Hoang, T., et al., *B7-1 and B7-2 Selectively Recruit CTLA-4 and CD28 to the Immunological Synapse*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 401-413.
115. Acharya, M., et al., *CD23/FcepsilonRII: molecular multi-tasking*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): p. 12-23.
116. Ewart, M.A., B.W. Ozanne, and W. Cushley, *The CD23a and CD23b proximal promoters display different sensitivities to exogenous stimuli in B lymphocytes*. Genes Immun, 2002. **3**(3): p. 158-64.
117. Visan, I., et al., *Pax-5 is a key regulator of the B cell-restricted expression of the CD23a isoform*. Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1163-73.
118. Gibb, D.R., et al., *ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo*. Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(3): p. 623-635.
119. Gordon, J., *CD23 and B cell activation*. Clin Exp Allergy, 1992. **22**(2): p. 199-204.
120. McCloskey, N., et al., *Soluble CD23 monomers inhibit and oligomers stimulate IGE synthesis in human B cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24083-91.
121. Hostager, B.S., et al., *Different CD40-mediated signaling events require distinct CD40 structural features*. 1996. **157**(3): p. 1047-1053.
122. 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.
123. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
124. Vazquez, B.N., et al., *CD69 gene is differentially regulated in T and B cells by evolutionarily conserved promoter-distal elements*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6513-21.
125. Kretschmer, B., et al., *Activated T cells induce rapid CD83 expression on B cells by engagement of CD40*. Immunol Lett, 2011. **136**(2): p. 221-7.
126. Ferrero, I., et al., *Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1598-609.
127. Mizuno, T. and T.L. Rothstein, *B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement enhances BCR-induced ERK activation*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3369-76.
128. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 136-40.
129. Shiow, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit SIP1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 540-4.
130. Shinoda, K., et al., *Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(19): p. 7409-14.
131. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2001. **1**(2): p. 135-45.

132. Bekeredjian-Ding, I. and G. Jigo, *Toll-like receptors--sentries in the B-cell response*. Immunology, 2009. **128**(3): p. 311-23.
133. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(7): p. 499-511.
134. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
135. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 497-504.
136. Poltorak, A., et al., *Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2163-7.
137. Piccinini, A.M. and K.S. Midwood, *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**.
138. Taylor, K.R., et al., *Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18265-75.
139. Swantek, J.L., et al., *IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4301-6.
140. Liew, F.Y., et al., *Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(6): p. 446-58.
141. Palm, N.W. and R. Medzhitov, *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
142. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
143. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
144. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
145. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(9): p. 710.
146. Subauste, C.S., *CD40 and the immune response to parasitic infections*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 273-82.
147. Andrade, R.M., et al., *CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2366-77.
148. Rub, A., et al., *Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 273-80.
149. Liu, X., et al., *Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 416-24.
150. Ma, D.Y. and E.A. Clark, *The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 265-72.
151. Thaïss, C.A., et al., *Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 31.

152. Boeglin, E., et al., *Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells*. PLoS ONE, 2011. **6**(10): p. e25542.
153. Zarnegar, B., et al., *Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF-kappaB activation pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8108-13.
154. Lutgens, E., et al., *Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile*. J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 391-404.
155. Chatzigeorgiou, A., et al., *CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease*. Biofactors, 2009. **35**(6): p. 474-83.
156. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W.M. Mourad, *CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies*. Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 165-72.
157. Lievens, D., et al., *The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 206-14.
158. Prasad, K.S., et al., *Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12367-71.
159. Inwald, D.P., et al., *CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation*. Circ Res, 2003. **92**(9): p. 1041-8.
160. Peters, A.L., L.L. Stunz, and G.A. Bishop, *CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 293-300.
161. Zheng, X., et al., *Treatment of autoimmune arthritis using RNA interference-modulated dendritic cells*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6457-64.
162. Zheng, X., et al., *RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. R13.
163. Jak, M., et al., *CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101*. Blood, 2011. **118**(19): p. 5178-88.
164. Madge, L.A., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 21295-306.
165. Liu, H., et al., *TNF receptor-associated factor 6 in advanced non-small cell lung cancer: clinical and prognostic implications*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(11): p. 1853-63.
166. Linder, M.E. and R.J. Deschenes, *Palmitoylation: policing protein stability and traffic*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 74-84.
167. Peters, A.L., et al., *A novel polymorphism of the human CD40 receptor with enhanced function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1863-71.
168. Peters, A.L. and G.A. Bishop, *Differential TRAF3 utilization by a variant human CD40 receptor with enhanced signaling*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6555-62.
169. Vazgiourakis, V.M., et al., *A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(12): p. 2184-90.
170. Dykstra, M., et al., *Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 457-81.

171. Gao, X. and J. Zhang, *Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(10): p. 4366-73.
172. Benslimane, N., et al., *Requirement of transmembrane domain for CD154 association to lipid rafts and subsequent biological events*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43070.
173. Revy, P., et al., *Activation of the Janus kinase 3-STAT5a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 787-93.
174. Bouillon, M., et al., *Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(9): p. 7099-107.
175. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(5): p. 416-23.
176. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. *Oncogene*, 1998. **17**(25): p. 3261-70.
177. Dominici, S., et al., *Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of gamma-glutamyl transpeptidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and S-thiolation*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(5-6): p. 623-35.
178. Moriarty-Craige, S.E. and D.P. Jones, *Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 2004. **24**: p. 481-509.
179. Malavade, S., et al., *Cholera in ecuador: current relevance of past lessons learnt*. *J Glob Infect Dis*, 2011. **3**(2): p. 189-94.
180. Naik, E., et al., *Destruction of tumor vasculature and abated tumor growth upon VEGF blockade is driven by proapoptotic protein Bim in endothelial cells*. *J Exp Med*, 2011. **208**(7): p. 1351-8.
181. Naik, E. and V.M. Dixit, *Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production*. *J Exp Med*, 2011. **208**(3): p. 417-20.
182. Macchi, P., et al., *Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID)*. *Nature*, 1995. **377**(6544): p. 65-8.
183. Russell, S.M., et al., *Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development*. *Science*, 1995. **270**(5237): p. 797-800.
184. Pratt, M.R., et al., *Direct measurement of cathepsin B activity in the cytosol of apoptotic cells by an activity-based probe*. *Chem Biol*, 2009. **16**(9): p. 1001-12.
185. He, J., et al., *Lysosome is a primary organelle in B cell receptor-mediated apoptosis: an indispensable role of Syk in lysosomal function*. *Genes Cells*, 2005. **10**(1): p. 23-35.
186. Heller, R.A., et al., *The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity*. *Cell*, 1992. **70**(1): p. 47-56.
187. Grell, M., et al., *Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF*. *EMBO J*, 1999. **18**(11): p. 3034-43.
188. Hess, S. and H. Engelmann, *A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells*. *The Journal of experimental medicine*, 1996. **183**(1): p. 159-167.
189. Léveillé, 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.
190. Gauld, S.B., et al., *Differential roles for extracellularly regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in B cell antigen receptor-induced apoptosis and CD40-mediated rescue of WEHI-231 immature B cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(8): p. 3855-64.

191. 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*. Journal of immunology 2010. **184**(2): p. 1111-1120.
192. Eliopoulos, A.G. and L.S. Young, *The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 360-7.
193. Szocinski, J.L., et al., *Activation-induced cell death of aggressive histology lymphomas by CD40 stimulation: induction of bax*. Blood, 2002. **100**(1): p. 217-23.
194. Georgopoulos, N.T., et al., *A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation*. Cell death and differentiation, 2006. **13**(10): p. 1789-1801.
195. Hollmann, C.A., et al., *Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase predisposes diffuse large B-cell lymphoma cell lines to CD40-mediated cell death*. Cancer Research, 2006. **66**(7): p. 3550-3557.
196. Bhogal, R.H., et al., *Activation of CD40 with platelet derived CD154 promotes reactive oxygen species dependent death of human hepatocytes during hypoxia and reoxygenation*. PLoS ONE, 2012. **7**(1): p. e30867.
197. Law, C.-L. and I.S. Grewal, *Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges*. Advances in experimental medicine and biology, 2009. **647**: p. 8-36.
198. Lewis, T.S., et al., *Distinct Apoptotic Signaling Characteristics of the Anti-CD40 Monoclonal Antibody Dacetuzumab and Rituximab Produce Enhanced Antitumor Activity in Non-Hodgkin Lymphoma*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2011. **17**(14): p. 4672-4681.
199. Gladue, R.P., et al., *The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2011. **60**(7): p. 1009-1017.
200. Cheever, M.A., *Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 357-68.
201. Bereznaya, N.M. and V.F. Chekhun, *Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy*. Exp Oncol, 2007. **29**(1): p. 2-12.
202. Liu, X., et al., *Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk*. Nature Immunology, 2011. **12**(5): p. 416-424.
203. Miyake, K., et al., *Essential role of MD-2 in B-cell responses to lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 distribution*. J Endotoxin Res, 2002. **8**(6): p. 449-52.
204. Frleta, D., R.J. Noelle, and W.F. Wade, *CD40-mediated up-regulation of Toll-like receptor 4-MD2 complex on the surface of murine dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1064-73.
205. Hornef, M.W., et al., *Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1225-35.
206. Wang, R., J. Stephens, and M.J. Lacy, *Characterization of monoclonal antibody HTA125 with specificity for human TLR4*. Hybrid Hybridomics, 2003. **22**(6): p. 357-65.

207. Hayashi, E.A., et al., *TLR4 promotes B cell maturation: independence and cooperation with B lymphocyte-activating factor*. Journal of immunology 2010. **184**(9): p. 4662-4672.
208. Georgopoulos, N.T., et al., *CD40-mediated death and cytokine secretion in colorectal cancer: a potential target for inflammatory tumour cell killing*. International journal of cancer Journal international du cancer, 2007. **121**(6): p. 1373-1381.
209. Bhogal, R.H., et al., *Activation of CD40 with platelet derived CD154 promotes reactive oxygen species dependent death of human hepatocytes during hypoxia and reoxygenation*. PloS one, 2012. **7**(1): p. e30867.
210. Leist, M. and M. Jäätelä, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nature reviews Molecular cell biology, 2001. **2**(8): p. 589-598.
211. Jäätelä, M., *Programmed cell death: many ways for cells to die decently*. Annals of medicine, 2002. **34**(6): p. 480-488.
212. Mathiasen, I.S. and M. Jäätelä, *Triggering caspase-independent cell death to combat cancer*. Trends in molecular medicine, 2002. **8**(5): p. 212-220.
213. Li, J.H. and J.S. Pober, *The cathepsin B death pathway contributes to TNF plus IFN-gamma-mediated human endothelial injury*. Journal of immunology 2005. **175**(3): p. 1858-1866.
214. van Nierop, K., et al., *Lysosomal destabilization contributes to apoptosis of germinal center B-lymphocytes*. The journal of histochemistry and cytochemistry, 2006. **54**(12): p. 1425-1435.
215. Jak, M., et al., *CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death*. Leukemia 2011. **25**(6): p. 968-978.
216. Léveillé, C., R. Al-Daccak, and W. Mourad, *CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines*. European journal of immunology, 1999. **29**(1): p. 65-74.
217. Léveillé, C., et al., *CD40 associates with the MHC class II molecules on human B cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3516-26.
218. Benson, R.J., B.S. Hostager, and G.A. Bishop, *Rapid CD40-mediated rescue from CD95-induced apoptosis requires TNFR-associated factor-6 and PI3K*. European journal of immunology, 2006. **36**(9): p. 2535-2543.
219. Hostager, B.S., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45382-90.
220. Subauste, C.S., R.M. Andrade, and M. Wessendarp, *CD40-TRAF6 and autophagy-dependent anti-microbial activity in macrophages*. Autophagy, 2007. **3**(3): p. 245-8.
221. He, L., et al., *TRAF6 regulates cell fate decisions by inducing caspase 8-dependent apoptosis and the activation of NF-kappaB*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(16): p. 11235-11249.
222. 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.
223. Vidalain, P.O., et al., *CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts*. The EMBO journal, 2000. **19**(13): p. 3304-3313.
224. Bock, J. and E. Gulbins, *The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts*. FEBS letters, 2003. **534**(1-3): p. 169-174.

225. Dykstra, M., et al., *Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling*. Annual review of immunology, 2003. **21**: p. 457-481.
226. Kaykas, A., K. Worringer, and B. Sugden, *CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex*. The EMBO journal, 2001. **20**(11): p. 2641-2654.
227. Malapati, S. and S.K. Pierce, *The influence of CD40 on the association of the B cell antigen receptor with lipid rafts in mature and immature cells*. European journal of immunology, 2001. **31**(12): p. 3789-3797.
228. Frei, R., et al., *MHC class II molecules enhance Toll-like receptor mediated innate immune responses*. PloS one, 2010. **5**(1): p. e8808.
229. Park, D., et al., *An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy*. Nature biotechnology, 2006. **24**(12): p. 1581-1590.
230. Grassmé, H., et al., *Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30289-99.
231. Ha, Y.J., H.J. Seul, and J.R. Lee, *Ligation of CD40 receptor in human B lymphocytes triggers the 5-lipoxygenase pathway to produce reactive oxygen species and activate p38 MAPK*. Experimental & molecular medicine, 2011. **43**(2): p. 101-110.
232. Fink, K., et al., *Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF-kappaB in airway epithelial cells*. Journal of immunology 2008. **180**(10): p. 6911-6922.
233. Ellmark, P., C. Furebring, and C.A.K. Borrebaeck, *Pre-assembly of the extracellular domains of CD40 is not necessary for rescue of mouse B cells from anti-immunoglobulin M-induced apoptosis*. Immunology, 2003. **108**(4): p. 452-457.
234. Werneburg, B.G., et al., *Molecular characterization of CD40 signaling intermediates*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(46): p. 43334-43342.
235. Ozsoy, H.Z., et al., *Oxidative stress promotes ligand-independent and enhanced ligand-dependent tumor necrosis factor receptor signaling*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(34): p. 23419-23428.
236. Girouard, J., et al., *Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression*. Molecular immunology, 2005. **42**(7): p. 773-780.
237. Haswell, L.E., M.J. Glennie, and A. Al-Shamkhani, *Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3094-100.
238. Ramadani, F., et al., *The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development*. Sci Signal, 2010. **3**(134): p. ra60.
239. Srinivasan, L., et al., *PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival*. Cell, 2009. **139**(3): p. 573-586.
240. Jabara, H.H., et al., *Ligation of CD46 to CD40 inhibits CD40 signaling in B cells*. International Immunology, 2011. **23**(3): p. 215-221.
241. Tinnell, S.B., et al., *STAT6, NF-kappaB and C/EBP in CD23 expression and IgE production*. Int Immunol, 1998. **10**(10): p. 1529-38.
242. Rambert, J., et al., *Molecular blocking of CD23 supports its role in the pathogenesis of arthritis*. PloS one, 2009. **4**(3): p. e4834.
243. De Miguel, S., et al., *Mechanisms of CD23 hyperexpression on B cells from patients with rheumatoid arthritis*. The Journal of rheumatology, 2001. **28**(6): p. 1222-1228.

244. Hassan, G.S. and W. Mourad, *An unexpected role for MHC class II*. Nature Immunology, 2011. **12**(5): p. 375-376.
245. Jackson, L., C.T. Cady, and J.C. Cambier, *TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23*. Journal of immunology 2009. **183**(4): p. 2585-2592.
246. Chiron, D., et al., *Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2205-13.
247. Dumont, N., et al., *Increased secretion of hyperimmune antibodies following lipopolysaccharide stimulation of CD40-activated human B cells in vitro*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 588-95.
248. Carpenter, E.L., et al., *Activation of human B cells by the agonist CD40 antibody CP-870,893 and augmentation with simultaneous toll-like receptor 9 stimulation*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 93.
249. Lu, H., et al., *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated disruption of the CD40 ligand-induced activation of primary human B cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2011. **255**(3): p. 251-60.
250. Abreu, J.R., et al., *A Rac1 inhibitory peptide suppresses antibody production and paw swelling in the murine collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis*. Arthritis research & therapy, 2010. **12**(1): p. R2.

