

Université de Montréal

Le rôle du clivage enzymatique du CD154 membranaire dans la régularisation de la réponse
immune.

Par

Suzanne SALTİ

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine.

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)

en microbiologie, infectiologie et immunologie.

Décembre 2021

© Suzanne Salti, 2021

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine.

Cette thèse intitulée

**Le rôle du clivage enzymatique du CD154 membranaire dans la régularisation de la réponse
immune.**

Présentée par

Suzanne Salti

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Etienne Gagnon

Président-rapporteur

Walid Mourad

Directeur de recherche

Marie-Claude Bourgeois-Daigneault

Membre du jury

Mr. Eric Boilard

Examineur externe (pour une thèse)

Résumé

Le CD154 est une glycoprotéine transmembranaire de type II, appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) et s'exprime d'une façon transitoire à la surface des lymphocytes T activés et des plaquettes. Notre laboratoire a démontré que la forme membranaire devient soluble suite à un clivage enzymatique par les métalloprotéinases (ADAM-10 et ADAM-17). De plus, il a été montré que le CD154 soluble (sCD154) peut aussi être relâché du milieu intracellulaire sans qu'il soit exprimé à la surface cellulaire suite à un clivage enzymatique intracellulaire entre les résidus acide Glutamique 112 (E112) et Méthionine 113 (M113). Les deux formes du CD154, soluble et membranaire, possèdent une structure trimérique nécessaire pour son activité biologique.

Son récepteur principal, le CD40, est une glycoprotéine de type I appartenant à la famille des récepteurs des TNFs. Il est exprimé constitutivement à la surface des cellules B, des cellules dendritiques, des macrophages, des basophiles, des plaquettes, ainsi qu'à la surface de certaines cellules non hématopoïétiques telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules du muscle lisse vasculaire. Outre le CD40, quatre autres récepteurs appartenant à la famille des intégrines, ont été identifiés: l' α IIb β 3, l' α 5 β 1, l' α M β 2, l' α v β 3 et l' α 4 β 1. Les études de notre laboratoire ont démontré que l'interaction du CD154 avec ses récepteurs induit une activation bidirectionnelle, cependant, on a observé que le clivage du CD154 de la membrane cellulaire reste une propriété privilège au CD40.

Le travail illustré dans cette thèse consiste à étudier l'inhibition du clivage enzymatique du CD154 et son effet dans la régulation de la réponse immune. Les résultats générés ci-dessous montrent que le CD154 résistant au clivage est un stimulant plus important que sa forme clivable. En effet, la double mutation des résidus E112 et M113 du CD154 abolit sa libération spontanée du milieu intracellulaire ainsi que son clivage de la membrane médié par le CD40 sans affecter sa liaison à ce dernier. Ce mutant s'est avéré capable d'induire une réponse apoptotique plus importante des cellules B, des réponses prolifératives plus prononcées et déclenche la différenciation des cellules B humaines d'une manière plus significative que le CD154-WT. De

plus, notre étude met en évidence le développement et la caractérisation d'un anticorps monoclonal (mAb), le Clone 8, capable d'inhiber la libération/le clivage du CD154 à partir des cellules et ainsi de le maintenir à la surface cellulaire et d'augmenter sa puissance en tant qu'activateur des réponses induites par le CD40. Le Clone 8 est capable de lier le CD154 murin et d'inhiber son clivage de la surface cellulaire de la même façon que celle étudiée dans les cellules humaines.

Ces travaux vont permettre le passage de cet anticorps bloquant le clivage du CD154 au stade des essais cliniques afin de mettre en place un nouveau traitement efficace pour les maladies auto-immunes et le cancer.

Mots-clés : CD154, CD40, clivage, ADAM, anticorps monoclonal (mAb), Clone 8, réponses immunes.

Abstract

CD154 is a type II transmembrane glycoprotein belonging to the tumor necrosis factor superfamily (TNF), that is transiently expressed on the surface of activated T cells and platelets. We have demonstrated that this membrane form becomes soluble following an enzymatic cleavage by metalloproteinases (ADAM-10 and ADAM-17). CD154 also exists in a soluble form originating from a direct release of an intracellular processing without being expressed on the cell surface. This fragment is the result of an intracellular enzymatic cleavage between the residues Glutamic acid at position 112 (E112) and Methionine at position 113 (M113). Both soluble and membrane-bound forms of CD154 occur as non-covalently-linked homotrimers a property conveying to CD154 its biological activity.

Its main receptor, CD40, is a type I glycoprotein belonging to the TNF receptor family. It is constitutively expressed on the surface of immune and non-immune cells including B cells, dendritic cells, macrophages, basophils, endothelial cells, fibroblasts, and vascular smooth muscle cells. CD154 was also shown to bind other receptors: α IIb β 3, α 5 β 1, α M β 2, α v β 3 and α 4 β 1 integrin. We have shown that the interaction of CD154 with its receptors induces bidirectional activation, however, only CD40 was capable of inducing the cleavage of CD154 from T cell surface.

Our results here consist in studying the inhibition of the enzymatic cleavage of CD154 and its effect in the regulation of the immune response. Our data show that the cleavage resistant CD154 is a more potent stimulant than its cleavable form. Indeed, the double mutation of residues E112 and M113 of CD154 abolishes its spontaneous release from the intracellular milieu as well as its cleavage from the membrane. This mutant was found to be able to induce a stronger apoptotic response from B cells, induce more pronounced proliferative responses and trigger human B cell differentiation in a more significant way than CD154-WT. In addition, our study highlights the development and characterization of a monoclonal antibody (mAb), Clone 8, capable of inhibiting the release/cleavage of CD154 from cells and thus maintain it on the cell surface and increase its potency as an activator of CD40-induced responses. Clone 8 binds murine CD154 and inhibit its cell surface cleavage in the same way that in human cells.

This study will allow the passage of this antibody blocking the cleavage of CD154 to the stage of clinical trials to develop a novel tool to treat diseases in which CD154 is implicated.

Keywords: CD154, CD40, cleavage, release, ADAM, monoclonal antibody (mAb), Clone 8, immune responses.

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	17
Remerciements.....	23
Chapitre 1 – Introduction.....	25
1. Le CD154.....	26
1.1. Régulation de l'expression de la protéine du CD154.....	28
1.2. Régulation de l'expression du gène du CD154.	28
2. Les récepteurs du CD154.	30
2.1. Le CD40.....	30
2.1.1. Régulation de l'expression du CD40.	31
2.1.1.1. Régulation de l'expression de la protéine du CD40.....	31
2.1.1.2. Régulation de l'expression du gène du CD40.	32
2.1.2. Les ligands du CD40.....	33
2.1.2.1. La protéine de liaison C4b.....	33
2.1.2.2. La protéine de choc thermique.....	33
2.2. Les intégrines.....	34
2.2.1. L'intégrine α IIb β 3.....	36
2.2.2. L'intégrine α 5 β 1.	37

2.2.3.	L'intégrine $\alpha M\beta 2$	37
2.2.4.	L'intégrine $\alpha V\beta 3$	38
2.2.5.	L'intégrine $\alpha 4\beta 1$	39
3.	Le rôle biologique de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs.....	39
3.1.	L'interaction du CD154 avec le CD40 (CD154/CD40).....	39
3.1.1.	Les protéines adaptatrices.....	40
3.1.2.	Implication de l'interaction CD154/CD40 dans l'immunité.....	43
3.1.3.	Implication de l'interaction CD154/CD40 dans la mort cellulaire.....	48
3.2.	L'interaction CD154/ $\alpha IIb\beta 3$	49
3.3.	L'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$	51
3.4.	L'interaction CD154/ $\alpha M\beta 2$	52
4.	Le rôle pathologique de l'interaction du CD154/CD40.....	53
5.	L'implication du CD154/CD40 dans les maladies auto-immunes.....	54
5.1.	Le lupus érythémateux disséminé.....	55
5.2.	L'arthrite rhumatoïde.....	57
5.3.	Thyroïdite auto-immune.....	59
5.4.	La sclérose en plaques.....	59
5.5.	Le diabète auto-immun.....	60
5.6.	Les maladies inflammatoires de l'intestin.....	61
6.	L'implication du CD154/CD40 dans les maladies inflammatoires.....	63
7.	L'implication du CD154/CD40 dans le rejet de greffe.....	64
8.	L'implication du CD154/CD40 dans le cancer.....	65
	Chapitre 2 –L'hypothèse et les objectifs du travail.....	77
	Chapitre 3 – L'inhibition du clivage du CD154 augmente ses fonctions immunitaires.....	79

1. Mise en contexte.....	79
2. Contribution des co-auteurs.	80
3. Résumé.....	80
Article 1: CD154 resistant to cleavage from intracellular milieu and cell surface induces more potent CD40-mediated responses.	82
Chapitre 4 – Un anticorps monoclonal ciblant le site de clivage du CD154 inhibe son clivage membranaire qu’il soit dépendant ou indépendant du CD40.....	119
1. Mise en contexte.....	119
2. Contribution des co-auteurs.	119
3. Résumé.....	120
Article 2: Monoclonal antibody targeting the CD154 cleavage site inhibits CD40-dependent and -independent cleavage of CD154 from cell surface	121
Chapitre 5 – Effet biologique du Clone 8 et cross-réactivité avec le CD154 de souris.....	149
1. Mise en Contexte	149
2. Matériels et méthodes.....	150
2.1. Les lignées cellulaires :	150
2.2. Anticorps et Réactifs:	150
2.3. Étudier la mort cellulaire.....	150
2.4. Cytométrie en Flux.	151
2.5. Immunoprécipitation et Western blot.....	151
2.6. Stimulation cellulaire pour évaluer le clivage de CD154	152
3. Résultats.....	153
3.1. L’inhibition du clivage du CD154 par le Clone 8 augmente l'apoptose dans les cellules B de lymphome CD40-positives.	153
3.2. Le Clone 8 reconnaît le CD154 de souris.....	155

3.3. Le Clone 8 inhibe la libération spontanée du sCD154 murin.....	157
Chapitre 6 – Discussion	159
Chapitre 7 – Conclusion et perspectives.....	167
Références bibliographiques.....	171

Liste des tableaux

Chapitre 1:

Tableau 1. – Les différentes fonctions biologiques du CD154 [28].46

Chapitre 4:

Tableau 1. – Table I: Specificities of the generated anti-human CD154 mAbs.146

Tableau 2. – Table II: Effect of the generated mAbs on the binding of CD154 to CD40.147

Tableau 3. – Table III: Substitution of E112 and M113 at the CD154 cleavage site abolishes the ability of clone 8 mAb to recognize the CD154 molecule.....148

Liste des figures

Chapitre 1 :

Figure 1. –	Régulation de l'expression du gène du CD154.	29
Figure 2. –	La liaison du CD154 au CD40 induit son homodimérisation.	32
Figure 3. –	Les différentes sous-populations des intégrines.	35
Figure 4. –	La signalisation du CD40 est dépendante de l'association à protéines adaptatrices.....	40
Figure 5. –	Les TNFR associated factors (TRAFs).	41
Figure 6. –	Les différentes fonctions immunitaires des interactions CD154/CD40.....	44
Figure 7. –	Effets résultant de l'interaction du CD154 avec le CD40 des cellules immunitaires et non immunitaires.....	48
Figure 8. –	L'interaction CD154/ α IIb β 3.....	50
Figure 9. –	L'Interaction CD154/ α 5 β 1.....	52
Figure 10. –	L'interaction CD154/ α M β 2.....	53
Figure 11. –	Rôle du CD154 dans le développement ou l'élimination du cancer.	69
Figure 12. –	Mécanismes d'action du CD154 membranaire.....	72

Chapitre3 :

Figure 1. CD154-EM is resistant to the spontaneous release from cells	111
Figure 2. CD154-EM and CD154-WT have similar binding affinity to CD40.....	112
Figure 3. CD154-EM is still capable of inducing MAPKs activation in a comparable way to CD154-WT	113
Figure 4. CD154-EM is resistant to CD40-induced cleavage from cell surface	114
Figure 5. ADAM10 and ADAM17 are responsible for the CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface and for its spontaneous release from the intracellular milieu.	115
Figure 6. CD154-EM is a more important inducer of apoptosis in CD40-positive lymphoma B cells than CD154-WT.	116

Figure 7. CD154-EM is a more important inducer of proliferation and Ig production in human B cells than CD154-WT.	117
--	-----

Chapitre 4:

Figure 1. Clone 8 mAb recognizes the Glutamic acid residue at position 112 (E112) and the Methionine at position 113 (M113) and inhibits the spontaneous release of sCD154.....	141
Figure 2. Clone 8 mAb inhibits membrane-cleavage of CD154 induced upon polyclonal activation of T cells.....	142
Figure 3. Clone 8 mAb does not inhibit the binding of 5C8 to CD154 and fails to recognize sCD154-compensating residues 113-261	143
Figure 4. Clone 8 mAb inhibits CD40-induced CD154 cleavage from cell surface	144
Figure 5. Clone 8 mAb inhibits membrane-cleavage of CD154 from SAg-stimulated T cells.	145

Chapitre 5 :

Figure 1.- L'inhibition du clivage du CD154 par le Clone 8 augmente l'apoptose des lymphocytes B CD40-positifs.	154
Figure 2.- Le clone 8 reconnaît le CD154 souris.....	156
Figure 3.- Le Clone 8 inhibe le clivage spontané du CD154 murin.....	158

Liste des sigles et abréviations

ADAM: A Disintegrin and metalloproteinase

AR: Arthrite rhumatoïde

C4BP: C4B binding protein

CD40L: CD40 Ligand

CHM-II: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CHOP : C/EBP-homologous protein

CIA : Induction de l'arthrite par le collagène

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CR3 : Complement receptor 3

D : Acide aspartique

D117 : Acide aspartique en position 117

DAG : Diacylglycerol

E112 : Acide glutamique en position 112

EAE : Encéphalomyélite allergique expérimentale

ERK : Extracellular regulated kinases

FAK : Focal adhesion kinase

FBS : Fetal bovine serum

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies granulo-monocytaire

Gp39 : Glycoprotéine 39

hCD154: CD154 humain

hCD40 : CD40 humain

HSP-70 : protéine de choc thermique

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire vasculaire-1

ILK : Integrin linked kinase

IP3: Inositol trisphosphate

JAK3: Janus kinase 3

JNK: Jun N terminal Kinases

LED: Lupus érythémateux disséminé

M113 : Méthionine en position 113

mAb : Anticorps monoclonal

Mac-1 : macrophage-1 antigène

MAPK: Protéines kinases activées par les mitogènes

mCD154: CD154 murin

mCD40: CD40 murin

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1 α

N151 : Asparagine en position 151

NF κ B: Facteur nucléaire Kappa B

NFAT: Nuclear Factor of activated T cells

NK: Natural killer

NOD : Diabétique non-obèse

PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase

PIP2: phosphatidylinositol bisphosphate

PKC: Protéine kinase C

PLC γ : Phospholipase C γ

PLC γ 2 : Phospholipase C Gamma 2

PSG : Pénicilline, Streptomycine et L-Glutamine

PTK: Protéine tyrosine kinase

Q166 : Glutamine en position 166

R203 : Arginine en position 203

RE : réticulum endoplasmique

RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

sCD154: CD154 Soluble

SP: Sclérose en plaques

TBAM: T-B activating protein

TCR: T cell receptor

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TNFR: Famille des récepteurs des TNF

TNFSF5: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5

TRAF : Facteurs associés au TNFR

Trap: TNF related activation protein

VCAM-1: Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1

W : Tryptophane

Y145 : Tyrosine en position 145

Je dédie ce mémoire à ceux qui m'ont dédié toute leur vie

À Mes chers et respectueux parents, AbdulSattar & KhaldiyeH.

À mes sœurs, Souhair et Saly.

À toi mon Mari, Rafic

Et à notre Bébé d'Amour, Lamar

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma sincère gratitude à mon directeur de thèse Dr. Walid Mourad, Ph.D, qui a cru en moi et qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. Grâce à lui, j'ai été capable d'avancer et de continuer jusqu'au bout. Sa confiance en moi, ses précieuses remarques, ses conseils permanents, ses suggestions et surtout ses implications ont été des éléments essentiels pour l'accomplissement de ce projet. Merci pour votre soutien continu tout au long de mes études. Dr Walid, veuillez trouver l'expression de mon profond respect et de ma haute considération.

Je tiens à remercier aussi Dr Ghada Hassan qui m'a offert son aide et ses conseils sans réserve. Merci d'avoir été présente à mes côtés, merci pour ton aide, ton soutien, tes conseils et tes encouragements.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ma thèse. À Mr. Etienne Gagnon, merci pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. À Mme Marie-Claude Bourgeois-Daigneault, Mr. Eric Boilard et à Mme Nathalie Labrecque, un grand merci pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent à tous les membres du laboratoire. Sans leur présence, leur soutien et leurs encouragements dans mes moments les plus difficiles il ne serait pas facile d'endurer et de finaliser ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à qui je dois tout : mes parents, Khaldieh et Abdul Sattar. Merci pour votre amour, vos prières, vos soutiens et vos sacrifices. Merci pour m'avoir instruit et préparé pour mon avenir. Je suis très reconnaissant envers mes sœurs, Souhair et Saly, qui de près comme de loin m'ont aidé à la réalisation de cette thèse et encouragé aux moments opportuns.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à mon cher époux, Rafic, pour son amour inconditionnel, sa compréhension, et son soutien tout au long de ces années. Notre couple a grandi récemment avec l'arrivée de notre bébé d'amour Lamar. Vous êtes ma source d'énergie, merci pour tout ce que vous m'apportez, merci d'être à mes côtés. Merci de faire mon bonheur.

Enfin, je ne terminerai pas mes remerciements sans exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel chaque fois que j'en avais besoin.

Chapitre 1 – Introduction

Notre environnement contient une vaste gamme de microbes pathogènes et de substances toxiques qui défient l'hôte par une très large sélection de mécanismes pathogènes. Pour faire face à ce danger un système de défense doit exister : c'est le système immunitaire. Ce dernier fait référence à un ensemble de cellules, de produits et de mécanismes effecteurs qui fonctionnent pour protéger, contrôler et généralement éliminer ces organismes et toxines étrangers. Ces mécanismes reposent sur la détection des caractéristiques structurales du corps étranger qui le distinguent des cellules hôtes. Une telle discrimination permet à l'hôte d'éliminer la menace sans endommager ses propres tissus. Il est essentiel donc que la réponse immunitaire soit capable d'éviter de déclencher ces mécanismes destructeurs contre les molécules du soi. Un échec à ce niveau est à la base du développement des maladies auto-immunes. Le système immunitaire possède deux lignes de défenses, l'immunité innée ou naturelle et l'immunité adaptative, acquise ou spécifique. L'immunité innée est une réponse non spécifique constituant la première ligne de défense et faisant intervenir les barrières physiques, les cellules phagocytaires et le système du complément alors que l'immunité adaptative manifeste une spécificité envers ses antigènes et repose principalement sur les lymphocytes T spécifiques de l'antigène et les cellules B qui se différencient en plasmocytes pour produire des anticorps. Le développement d'une mémoire immunologique pouvant éliminer rapidement un agent pathogène spécifique en cas d'infections ultérieures est l'une de ses fonctions principales.

Or, pour qu'elles puissent intervenir, les cellules T doivent être préalablement activées. Cette activation requière la présence de deux signaux. Le premier consiste en une présentation au récepteur des lymphocytes T (TCR) d'un fragment peptidique par l'intermédiaire des molécules complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le deuxième signal provient des molécules de costimulation et se manifeste suite à l'interaction du CD28 des cellules T avec les B7.1-B7.2 (CD80/CD86) des CPA. Suite au premier signal, l'expression du CD154 à la surface des cellules T va avoir lieu et celui-ci va pouvoir entrer en contact avec son récepteur principal le CD40, exprimé à la surface des CPA.

Cette interaction, CD154/CD40, va engendrer un signal d'activation bidirectionnel, autant via le CD154 que via le CD40.

1. Le CD154.

Le CD154 nommé aussi CD40 Ligand (CD40L), glycoprotéine 39 (Gp39), TNF-related activation protein (TRAP), Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5 (TNFSF5), ou encore T-B activating molecule (TBAM) a premièrement été découvert en 1992 [1-3]. Lederman S. et ses collègues ont généré un anticorps monoclonal murin, le 5C8, capable de se lier à une protéine présente à la surface des cellules T activées. L'ajout de cet anticorps a inhibé la fonction auxiliaire des cellules T en inhibant l'activation des cellules B par les cellules T activés [4]. Dans la même période Armitage et al. ont isolé le gène codant la protéine liant le CD40 murin (mCD40) et ont démontré que c'est une protéine qui possède la même configuration que celle des glycoprotéines transmembranaires de type II, possédant donc un domaine carboxyle extracellulaire [5]. De même, Noelle R. et al. ont démontré qu'une protéine recombinante du CD40 était capable de se lier à une protéine de 39 KDa exprimée à la surface des cellules T activées d'où provient l'appellation du gp39 [6] et que l'ajout du MR1 (un hybridome qui produit des anticorps monoclonaux capable de reconnaître spécifiquement une protéine présente à la surface des cellules T activées) ou d'un anti CD40 inhibe l'activation des cellules B [6].

Bien que des études initiales sur le CD154 ont proposé une protéine de 39 KDa [6], dans la plupart des types de cellules, cette molécule possède un poids moléculaire allant de 33 à 39 KDa, ayant un seul site de glycosylation [7, 8]. Le gène codant pour son expression est localisé dans la région q26.3-27.1 du chromosome X et il est constitué de 5 exons et 4 introns. Le CD154 humain (hCD154) est composé de 261 acides aminés (29 273 Daltons) dont 22 constituent la partie cytoplasmique, 24 le domaine transmembranaire et 215 la partie extracellulaire [7]. Alors que le CD154 murin (mCD154) est constitué de 260 acides aminés (29 239 Daltons) dont 22 cytoplasmiques, 24 transmembranaires et 214 extracellulaires. Le CD154 humain et murin partagent 78 à 80% d'homologie dans leurs séquences.

De plus, il a été démontré que le CD154 appartient à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) [9]. En effet, sa structure tridimensionnelle est trimérique et semblable à celle de

la lymphotoxine-alpha (LT- α) et du TNF- α , des membres de la famille des TNF [7], pourtant cette protéine ne possède que 20% d'homologie avec les autres membres de cette famille [10].

Malgré le fait que le CD154 est une protéine transmembranaire de type II, il est exprimé à la surface cellulaire sous une forme multimérique [11]. En effet, l'étude cristallographique du CD154, montre que ce dernier possède une structure homo-trimérique médiée par des liaisons non covalentes entre 2 Tyrosines, 2 Histidines et 1 Leucine [12]. Le CD154 a été initialement identifié à la surface des cellules T CD4⁺ activées [13], d'autres études ont montré une plus large expression. En effet, le CD154 est également exprimé sur les monocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes, les basophiles, les cellules B, les natural killer (NK), les macrophages, les mégacaryocytes et les plaquettes activées mais également au niveau des cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [14, 15].

Comme les autres membres de la famille des TNF, tel que TNF- α et Fas/APO-1 ligand, le CD154 existe aussi sous une forme soluble décrite avec un poids moléculaire de 18 KDa et 15 KDa [16]. En effet, en plus d'exprimer la forme membranaire du CD154, les lymphocytes T activées sécrètent aussi une forme soluble (sCD154). Des études ont montré que le CD154 peut aussi être relâché du milieu intracellulaire sans que ce dernier soit exprimé à la surface des cellules sous forme d'un fragment de 18 KDa [17]. Ce fragment est le résultat d'un clivage enzymatique intracellulaire entre les résidus acide Glutamique 112 (E112) et la Méthionine 113 (M113) [16]. Ultérieurement, il a été confirmé que le clivage du CD154 en sCD154 se faisait dans les microsomes suite à l'activation des cellules T [17]. De plus, notre laboratoire a démontré que la forme membranaire du CD154 devient soluble, à la suite de son interaction avec son récepteur principal le CD40, par un clivage enzymatique impliquant les métalloprotéinases : A Disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) et ADAM-17 [18]. Le sCD154 comporte toujours le domaine d'homologie des TNF, permettant ainsi sa liaison au CD40 et la prolifération des cellules B en présence d'IL-4 [12, 17]. De même au niveau des plaquettes, le CD154 est rapidement présenté à la surface après stimulation. Ce dernier une fois exprimé est rapidement clivé générant un fragment soluble et trimérique. Les études indiquent que plus de 95% du sCD154 circulant provient des plaquettes [19]. Une concentration élevée du sCD154 a été détectée dans le sérum

des patients atteints de différentes pathologies telles que l'athérosclérose, le syndrome coronarien aigu et les maladies auto-immunes, indiquant que le sCD154 peut contribuer à une variété de réponses inflammatoires systémiques [20-22]. En effet, plusieurs études ont démontré que l'interaction du CD154 avec le CD40 est impliquée dans le développement et la progression des maladies inflammatoires et auto-immunes. Dans ces maladies, les cellules T activées du sang périphérique, et le sCD154 libéré par les plaquettes et les cellules T activées, vont interagir avec les cellules exprimant le CD40, stimulant ainsi le complexe CD154/CD40 et amplifiant son rôle biologique [23]. Les deux formes du CD154, soluble et membranaire, possèdent donc une structure trimérique qui est absolument nécessaire pour leur activité biologique [16, 17, 24].

1.1. Régulation de l'expression de la protéine du CD154.

Les lymphocytes T expriment le CD154 à la surface cellulaire 5 minutes après l'activation. Cette expression elle est transitoire atteignant un maximum après 6h d'activation pour ensuite diminuer au cours des 12 à 24 h suivantes [14]. Cette activation est dépendante de la signalisation via le TCR (T cell Receptor) [25]. En effet, la reconnaissance spécifique du peptide antigénique présenté dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) par le TCR/CD3 des lymphocytes T CD4⁺ permet l'induction rapide de l'expression du CD154 à la surface cellulaire. Les signaux de costimulation (CD28/CD80 ou CD2/LFA-3) participent au maintien de l'expression du CD154 et à sa potentialisation. Les cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-1, l'IL-4 ou le TNF- α peuvent aussi réguler positivement l'expression du CD154 [26, 27].

1.2. Régulation de l'expression du gène du CD154.

L'induction du CD154 à la surface des cellules T est dépendante la voie Calmodulin/Calcineurin. En effet, suite à l'engagement antigénique, l'activation de la PLC γ 2 (Phospholipase C Gamma 2) va à son tour hydrolyser la phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2) générant l'IP3 (Inositol trisphosphate) et le DAG (Diacylglycerol). L'IP3 va se lier à son récepteur, IP3-Receptor, et va induire la libération du Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (RE) dans le milieu intracellulaire [28]. Cependant, l'activation des lymphocytes T nécessite une plus forte concentration en Ca²⁺. D'où la nécessité d'un afflux extracellulaire, via les canaux CRAC de la

membrane plasmique est essentiel [29]. Une telle augmentation est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes, parmi lesquels les gènes codant pour les facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells) dans les cellules T matures permettant ainsi sa translocation au noyau et sa liaison aux gènes codant le CD154 et permettant sa transcription. Quant à DAG, ce dernier va activer la protéine kinase C (PKC) qui à son tour induit l'activation du NF- κ B, un facteur de transcription du CD154 [30]. Les études ont montré qu'une expression prolongée du CD154 est associée avec la voie de signalisation de l'IL-15. En effet, la liaison de l'IL-15 à son récepteur induit une activation de Jak1 et Jak3 et une phosphorylation de STAT5. Ce dernier va se transloquer vers le noyau et va s'engager avec le promoteur du gène du CD154 induisant son expression [31] (Fig.1). De même, il a été démontré que l'IL-2 est aussi capable de maintenir une expression prolongée du CD154 à la surface des cellules T [26]. En effet, les auteurs ont démontré qu'une stimulation des cellules T avec l'IL-2 induisait une expression du CD154 pouvant aller jusqu'à 96 heures post stimulation et que ce CD154 est synthétisé *de novo*.

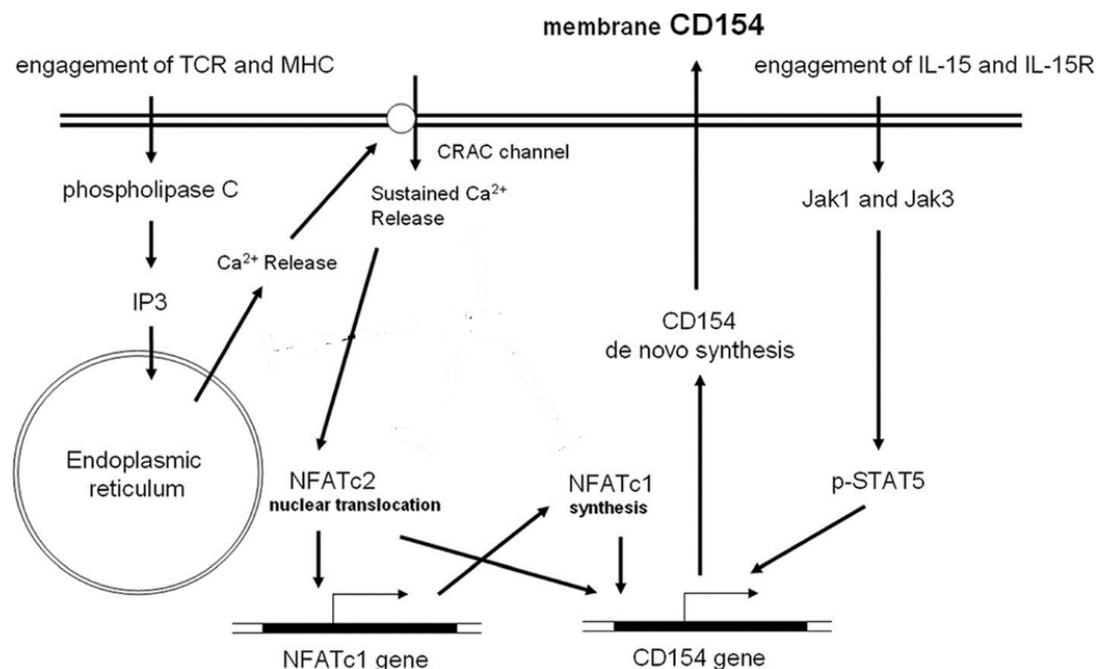


Figure 1. – Régulation de l'expression du gène du CD154.

L'expression du CD154 est induite suite à l'engagement du TCR et du CMH menant à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, et l'activation du facteur de transcription NFAT. Elle peut aussi être induite via l'engagement du récepteur à l'IL-15 et l'activation du Stat-5.(adapté de [31]). Avec autorisation du journal *Arthritis Research & Therapy*.

2. Les récepteurs du CD154.

Le CD40 est le premier récepteur caractérisé pour le CD154 [6]. Pendant près de 2 décennies, il a été considéré comme étant le seul récepteur du CD154; cependant, quatre autres récepteurs appartenant à la famille des intégrines, ont été identifiés: l' α IIb β 3 [19], l' α 5 β 1 [32], l' α M β 2 [33], l' α v β 3 [34] et l' α 4 β 1 [35]. Bien que le CD40 demeure le principal récepteur du CD154, ces nouveaux partenaires occupent des fonctions aussi importantes que le CD40 dans différentes conditions physiopathologiques.

2.1. Le CD40.

Le CD40, à l'origine appelé p50 ou Bp50, a été premièrement identifié en 1985 à la surface des lymphocytes B et des cellules cancéreuses de la vessie [36]. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type I, avec un poids moléculaire de 45-50 KDa, ayant deux sites de glycosylation. Le CD40 appartient à la famille des récepteurs des TNF (TNFR) [9]. Il a été identifié comme une molécule exprimée au cours des différents stades du développement et de la différenciation des cellules B [7]. Ces études ont révélé que le niveau d'expression de cette molécule variait avec le statut d'activation des cellules B, fluctuant avec la progression à travers le cycle cellulaire ainsi qu'avec la différenciation et la survie des lymphocytes [37].

Le gène codant du CD40 humain (hCD40), formé de 9 exons et 8 introns, est localisé entre la région q12 et q13.2 du chromosome 20 [7, 38]. Le hCD40 est constitué de 277 acides aminés répartis en trois régions : 62 acides aminés pour la partie cytoplasmique, 22 la partie transmembranaire et 193 la partie extracellulaire. Le CD40 murin (mCD40) est composé de 307 acides aminés dont 193 constituent le domaine extracellulaire, 22 transmembranaire et 90 intracellulaire. Le CD40 humain et murin partagent 62% d'homologie dans leurs séquences avec 100% d'homologie au niveau des 32 acides aminés du domaine C-terminal [7]. Comme tous les membres de la famille des TNFR, le CD40 abrite 22 cystéines dans son domaine extracellulaire, ces dernières sont conservées chez les deux espèces suggérant un repliement identique [7, 39]. Le CD40 interagit avec le CD154 via les résidus Tyrosine 145 (Y154) et l'Arginine 203 (R203) du CD154 [40].

2.1.1. Régulation de l'expression du CD40.

2.1.1.1. Régulation de l'expression de la protéine du CD40.

Le CD40 est exprimé constitutivement à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques ou non, telles que les lymphocytes B, les monocytes, les plaquettes, les cellules dendritiques, les basophiles, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les keratinocytes et les cellules du muscle lisse vasculaire [41]. Une amplification du niveau d'expression du CD40 est la résultante de différentes cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1), IL-3, l'interféron γ (IFN- γ), le TNF- α et le facteur de stimulation des colonies granulo-monocytaire (GM-CSF) [42]. Il est exprimé non seulement sous forme monomérique, mais aussi une faible proportion s'assemble pour former un dimère du CD40 [43]. Cette homodimérisation est médiée par un pont disulfure impliquant la seule cystéine présente dans son domaine intracellulaire et se trouvant en position 238. La formation de cet homodimère est associée aux radeaux lipidiques, qui sont des micro-domaines riches en lipides. En effet, l'utilisation de la méthyl-bêta-cyclodextrin, un agent perturbateur de l'intégrité des radeaux lipidiques, abolit cette homodimérisation [44]. De plus, le CD40 dimérique est nécessaire pour l'activation complète des cellules B et la régulation de l'expression du CD23, CD69 et CD80 [45].

Son interaction avec ses ligands augmente significativement son oligomérisation, un phénomène observé au niveau des lignées de cellules B ou de cellules transfectées par le CD40 [46] (Fig.2). La formation d'un CD40 dimérique est essentielle pour la phosphorylation des phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) et ainsi l'activation de l'Akt, pour l'augmentation de l'expression du CD86 et pour la production de l'IL-8 [44]. (Fig.2).

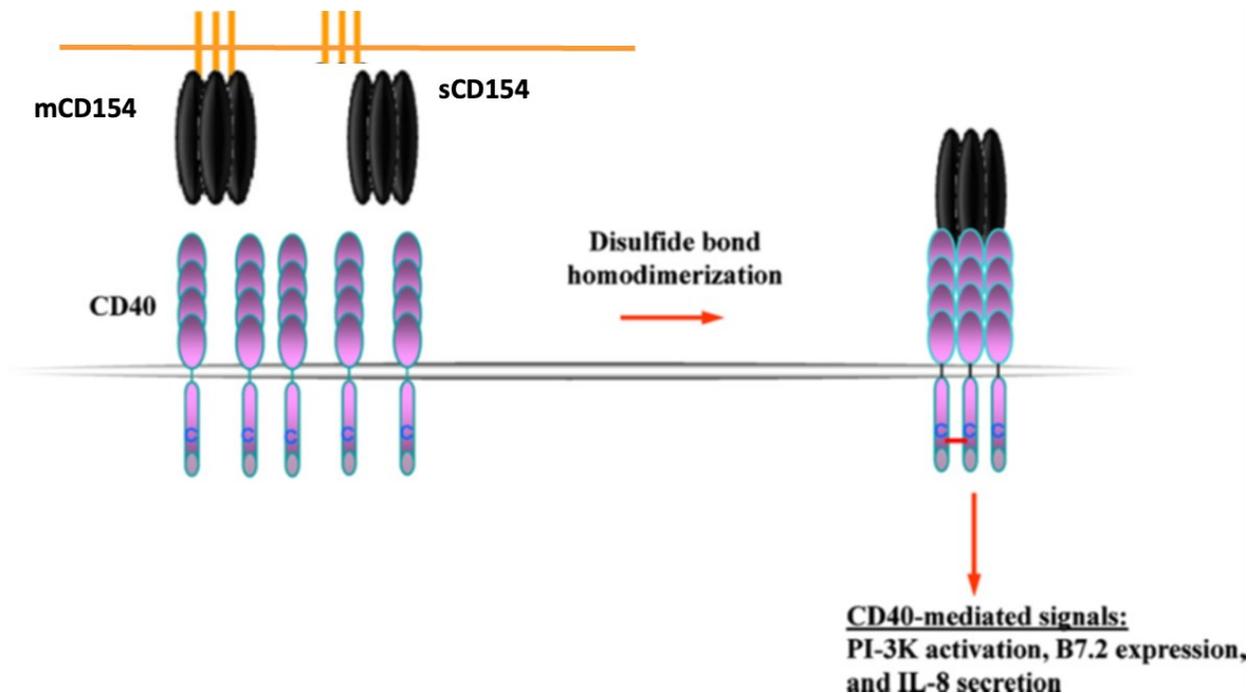


Figure 2. – La liaison du CD154 au CD40 induit son homodimérisation.

L'interaction du CD154 membranaire ou soluble trimérique avec le CD40 induit une homodimérisation de ce dernier et déclenche la formation de dimères médié par deux résidus C238. Une telle homodimérisation est essentielle pour l'activation du PI-3K et l'expression de B7-2 sur les cellules B [47]. Avec autorisation du journal *Immunobiology*.

2.1.1.2. Régulation de l'expression du gène du CD40.

Très peu d'études ont analysé les mécanismes sous-jacents activant le gène du CD40. Le promoteur du CD40 contient quatre sites NF- κ B, suggérant une influence du TNF- α sur ce gène [48]. Comme l'IFN- γ est connu pour induire l'expression du TNF- α dans certains types de cellules, il a été démontré que l'expression du gène du CD40 peut être induite par l'interféron- γ (IFN- γ) et implique l'activation des facteurs de transcription STAT-1 et NF- κ B [49]. De même Sp1 est un facteur de transcription clé dans l'expression basale du CD40 [50].

Des études ont montré que l'expression du CD40 induite par l'IFN- γ dans la microglie est inhibée par le TGF- β , et l'effet inhibiteur est médié par la déstabilisation de l'ARNm du CD40 [51]. L'IL-4 est également un puissant inhibiteur de l'expression du CD40 induite par l'IFN- γ . Cette inhibition est le résultat d'une inhibition de la transcription du gène CD40 [52].

2.1.2. Les ligands du CD40.

Outre le CD154, le CD40 se lie aussi à la protéine de liaison C4b (*C4b-binding protein* (C4BP)) [53] et à la protéine de choc thermique-70 ou *heat-shock protein* (HSP-70).

2.1.2.1. La protéine de liaison C4b

La protéine de liaison C4b, C4BP, est un composant régulateur de la voie classique du complément. Elle est synthétisée par les cellules hépatiques et les monocytes activés. Le foie est le site majeur de synthèse des C4BP solubles et membranaires [54]. C'est une protéine plasmatique, qui agit comme un inhibiteur majeur de la voie classique du complément [55]. Il agit comme cofacteur du facteur I dans l'inactivation protéolytique de C4b, empêche l'assemblage de la voie classique C3-convertase et accélère sa dégradation. Son expression est augmentée par les glucocorticoïdes et les cytokines inflammatoires (IFN- γ , IL-1, IL-6 et TNF- α).

Cette protéine se lie directement au CD40 des cellules B et son site de liaison est distinct de celui du CD154. Comme le CD154, le C4BP, suite à son interaction avec le CD40, provoque l'activation des lymphocytes B. En effet, il induit la prolifération, la régulation de l'expression de l'ICAM-1 et CD86 et l'induit la synthèse de l'IgE en présence d'IL-4 d'une manière dépendante de la voie NF κ B. Physiologiquement, cette interaction a lieu dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes secondaires ce qui suggère qu'il est impliqué dans le développement de l'immunité dépendante des lymphocytes B [53].

Le C4BP peut former des complexes stables de haut poids moléculaire avec le sCD154, qui malgré la liaison au CD40, induit la survie et inhibe l'apoptose médiée par le CD40 des cholangiocytes humains [54]. Cette inhibition est le résultat d'un défaut de l'activation du CD40 et des voies qui en découlent suite à son interaction avec le CD154 telles que NF κ B, AP-1 et STAT-3.

2.1.2.2. La protéine de choc thermique.

La protéine de choc thermique-70, HSP70, fait partie d'une famille de molécules chaperonnes, hautement conservées, qui jouent un rôle important dans la synthèse, le repliement et la translocation des protéines [56].

La HSP70 joue le rôle d'un adjuvant. En effet, le HSP70 microbien, et non le HSP70 humain, se lie au CD40 des cellules myéloïdes, entraînant la production de RANTES, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) et MIP-1 β [57]. Ces chimokines attirent donc les macrophages et les cellules dendritiques facilitant la présentation antigénique aux cellules effectrices T et B.

2.2. Les intégrines.

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires de type I appartenant à une superfamille de récepteurs d'adhésion cellulaire. Elles sont reconnues comme étant des molécules d'adhésion cellulaire et des récepteurs de fixation à la matrice extracellulaire. Il est désormais largement reconnu que les intégrines agissent comme de véritables récepteurs de signalisation intracellulaire et réponses cellulaires, y compris la migration, la prolifération et la différenciation [58]. Les intégrines reconnaissent principalement les constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine, le facteur von Willebrand, la vitronectine et la fibronectine. Elles sont des récepteurs hétérodimériques constitués de 2 sous-unités, α et β , associées de façon non covalente, ayant un poids moléculaire de 120-170 KDa et 90-100 KDa respectivement [59].

Chez l'humain 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont catégorisées constituant 24 différentes intégrines hétérodimériques [60]. La famille des intégrines peut être répartie en plusieurs sous familles en fonction de la ressemblance fonctionnelle et la spécificité aux ligands. On retrouve les intégrines à laminine, les intégrines à collagène, les intégrines leucocytaires et les intégrines reconnaissant les motifs RGD (Arginine/glycine/acide aspartique) [59] (Fig.3).

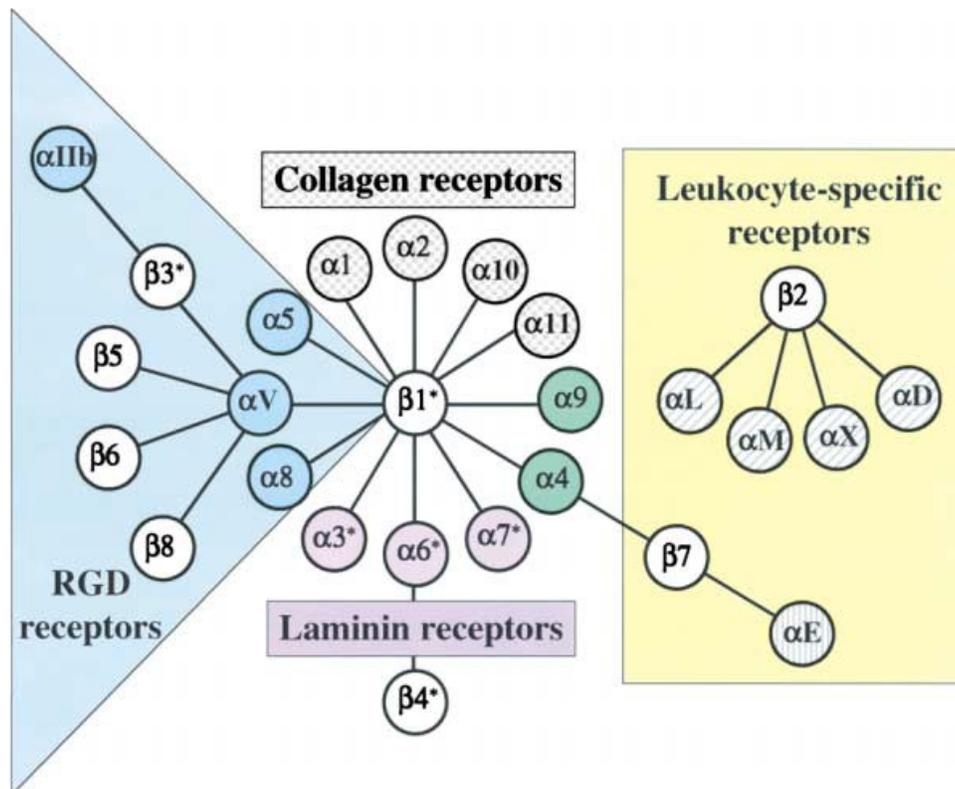


Figure 3. – Les différentes sous-populations des intégrines.

Cette figure représente les différentes associations entre les sous-unités α et β et le ligand correspondant pour chaque sous-population. (Modifiée de Hynes, R. O. et al., 2002 [59]). Avec autorisation du journal *Cell*.

Ces intégrines assurent une signalisation bidirectionnelle. En effet, le signal *outside-in*, va transmettre le message de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule permettant ainsi la réception des consignes de prolifération ou de survie dépendamment de son attachement à la matrice extracellulaire; le signal *inside-out*, donc de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur va permettre

le passage du message du milieu intracellulaire et va activer l'intégrine [61]. Les intégrines agissent donc, non seulement comme des liens structurels entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, mais également comme des sites de transduction du signal de la matrice extracellulaire vers les voies de signalisation intracellulaires. Et vu que leurs domaines cytoplasmiques sont dépourvus de toute activité enzymatique, le recrutement de protéines kinases spécialisées telles que *Focal adhesion kinase* (FAK), *integrin-linked kinase* (ILK), et Src kinase, est nécessaire pour activer les voies de signalisation de survie cellulaire plus en aval de ces protéines kinases cytoplasmiques (PI-3K, l'AKT et les MAPK) [62].

Les intégrines ne sont pas constitutivement activées; elles sont souvent exprimées à la surface cellulaire dans un état inactif sous forme d'une structure courbée ne se liant pas aux ligands [59].

Les intégrines sont impliquées dans des événements d'adhésion cellulaire qui contrôlent le développement, modulent la mort cellulaire programmée ou l'apoptose et conduisent à des pathologies telles que le cancer et la thrombose [58, 63].

2.2.1. L'intégrine α IIb β 3.

L'intégrine α IIb β 3, GPIIb/IIIa ou CD41/CD61 est une glycoprotéine exprimée exclusivement sur les plaquettes et mégacaryocytes. Sous sa forme active, elle se lie à plusieurs ligands contenant l'arginine-glycine-acide aspartique (RGD), tels que le fibrinogène, la vitronectine, le facteur de Von Willebrand [64]. En interagissant avec ses ligands naturels, l' α IIb β 3 est directement impliquée dans la fonction plaquettaire et la thrombose permettant ainsi l'agrégation et l'adhérence des plaquettes au niveau de la lumière du vaisseau sanguin. En effet, une perturbation de la synthèse et de la fonction des sous-unités α IIb et/ou β 3 conduisent à un trouble de saignement appelé Thrombasthénie de Glanzmann. Cette perturbation altère les fonctions plaquettaires [65].

En 2002, cette intégrine a été identifiée par André et al., comme étant un récepteur du CD154 [19]. Haydar et al. ont démontré que les formes actives et inactives de l' α IIb β 3 se lient au CD154 via son motif KGD (Lysine-glycine-acide aspartique) chez l'humain et RGD chez la souris

[40]. Cette liaison dépend principalement du résidu acide aspartique en position 117 (D117), une mutation à ce niveau abolit la capacité de lier l' α IIb β 3 [66].

2.2.2. L'intégrine α 5 β 1.

Comme l' α IIb β 3, l'intégrine α 5 β 1, également appelée récepteur de la fibronectine, lie sous sa forme active ses ligands classiques, la fibrinogène et la fibronectine, à travers leur séquence RGD [59]. Elle est exprimée à la surface d'une grande variété de cellules y compris les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T, ainsi qu'à la surface de cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. L' α 5 β 1 joue un rôle bien défini dans l'adhésion cellulaire, la migration et la formation de la matrice [67].

En 2007, l' α 5 β 1 s'est avérée agir comme un récepteur pour le CD154 dans le modèle de lignée monocyttaire U937 (CD40⁻/ α IIb β 3⁻) [32]. En effet, cette interaction est bloquée à la suite de l'administration du 5C8 un anticorps monoclonal dirigé contre le CD154, du P1D6 un anticorps monoclonal dirigé contre l' α 5 β 1, ou une forme recombinante de cette intégrine. Les auteurs ont montré que l'interaction du sCD154 avec l' α 5 β 1 conduit à l'activation de la cascade de signalisation, comme observé avec l'engagement du α IIb β 3. Contrairement à l' α IIb β 3, auquel le CD154 peut se lier à sa conformation active et inactive, l' α 5 β 1 n'est engagée par le CD154 que sous sa forme inactive. En effet, l'activation de cette intégrine par le Mn²⁺ ou par le dithiothreitol abolit sa capacité de lier le CD154 [32].

Leveillé et al. ont aussi démontré que le sCD154 peut lier simultanément le CD40 et l' α 5 β 1 [32]. Par conséquent le sCD154 peut servir de pont moléculaire entre le CD40 et l' α 5 β 1 exprimées au niveau de deux différents types cellulaires et peut aussi lier ces deux récepteurs en *cis*, c'est à dire lorsqu'ils sont exprimés à la surface de la même cellule [32]. En 2015, Alturahi et al. ont démontré que la liaison du CD154 à l' α 5 β 1 est médiée par les résidus Asparagine 151 (N151) et Glutamine 166 (Q166) du CD154 [40].

2.2.3. L'intégrine α M β 2.

L' α M β 2, aussi appelée *macrophage-1 antigen* (Mac-1), CD11b/CD18 ou *complement receptor 3* (CR3), est une intégrine leucocytaire exprimée à la surface des monocytes, des cellules

dendritiques, des macrophages, des neutrophiles et des NK [23, 68]. Elle est impliquée dans diverses réponses cellulaires, notamment la phagocytose, la destruction à médiation cellulaire, la chimiotaxie, l'activation cellulaire et joue un rôle central dans l'inflammation en induisant la transmigration et l'adhésion des leucocytes vers le site inflammatoire [69]. L' $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ sous sa forme active, se lie principalement au fibrinogène et au fragment du complément C3bi, mais lie également l'ICAM-1, le facteur de coagulation X et l'héparine. Par conséquent cette intégrine est impliquée dans l'immunité, l'inflammation et l'hémostase [70].

Cette intégrine a été identifiée comme étant un récepteur du CD154 en 2007 par *Zirlik Andreas* et ses collègues [33]. Contrairement à l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, seule la forme active de l' $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ se lie au CD154 [33]. En 2011, Wolf D et al. ont identifié l'implication du motif EQLKKSRTL de l' $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ dans sa liaison avec le CD154 [70]. En 2015 il a été démontré que les résidus Y145 et R203 du CD154 sont nécessaires à son interaction avec l'intégrine $\alpha\text{M}\beta\text{2}$, et que ces derniers sont partagés avec ceux impliqués dans la liaison du CD154 au CD40 [40].

2.2.4. L'intégrine $\alpha\text{V}\beta\text{3}$.

L' $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ également nommée récepteur à la vitronectine, se lie au fibrinogène, à la fibronectine, l'ostéopontine, la laminine, au facteur von Willebrand, la thrombospondine et la thrombine à travers leur séquence RGD [71]. Elle est exprimée à la surface de différents types de cellules tels que les cellules endothéliales, les monocytes, les plaquettes, les fibroblastes, les ostéoclastes, les plaquettes, les mégacaryocytes, les cellules musculaires lisses ainsi qu'à la surface de cellules tumorales. Cette intégrine est impliquée dans l'angiogenèse, l'hémostase, l'agrégation plaquettaire, l'adhésion cellulaire, la prolifération et le développement embryonnaire [72].

En 2019, Takada et al. ont démontré que l' $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, sous sa forme active, est capable de lier le sCD154 indépendamment des résidus KGD [73]. De plus, ils ont démontré que les sites de liaison de l' $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ et l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ se chevauchent.

Cette interaction pourrait être biologiquement très significative vu que l' $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ est largement exprimée dans les tissus vasculaires et lors d'un cancer. Des études supplémentaires devraient être mises en place afin de confirmer cette hypothèse.

2.2.5. L'intégrine $\alpha 4\beta 1$.

L' $\alpha 4\beta 1$ est également connu sous le nom Very late antigen-4 (VLA-4), largement exprimé à la surface des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et B, les Natural killer, les monocytes et les macrophages [74]. Cette intégrine se lie principalement à la fibronectine et à VCAM-1 [60]. L' $\alpha 4\beta 1$ est impliquée dans la migration des leucocytes vers le site inflammatoire [75].

Récemment cette intégrine a prouvé sa capacité de lier le CD154 indépendamment des résidus impliquant le $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ [35].

3. Le rôle biologique de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs.

3.1. L'interaction du CD154 avec le CD40 (CD154/CD40).

Suite à l'interaction du CD154, trimérique, avec le CD40, ce dernier s'oligomérisé et se transloque vers les radeaux lipidiques où il va s'homodimériser. L'homodimère du CD40 est médié par un pont disulfure entre deux Cystéines en position 238 [44]. Cette homodimérisation s'est avérée nécessaire pour le déclenchement des voies de signalisation médiées par le CD40 [44, 46]. Le domaine cytoplasmique du CD40 est dépourvu d'activité kinase intrinsèque [7]. Afin de transmettre un signal, le CD40 nécessite donc le recrutement de protéines adaptatrices telles que les facteurs associés au TNFR (TRAF) [76], les protéines tyrosine kinase (PTK) et le Janus kinase3 (Jak3) activant ainsi plusieurs cascades de signalisation comme celles du NF- κ B, PI-3K, JNK, et des MAPKs ainsi que la voie de la phospholipase C γ (PLC γ) [77] (Fig.4).

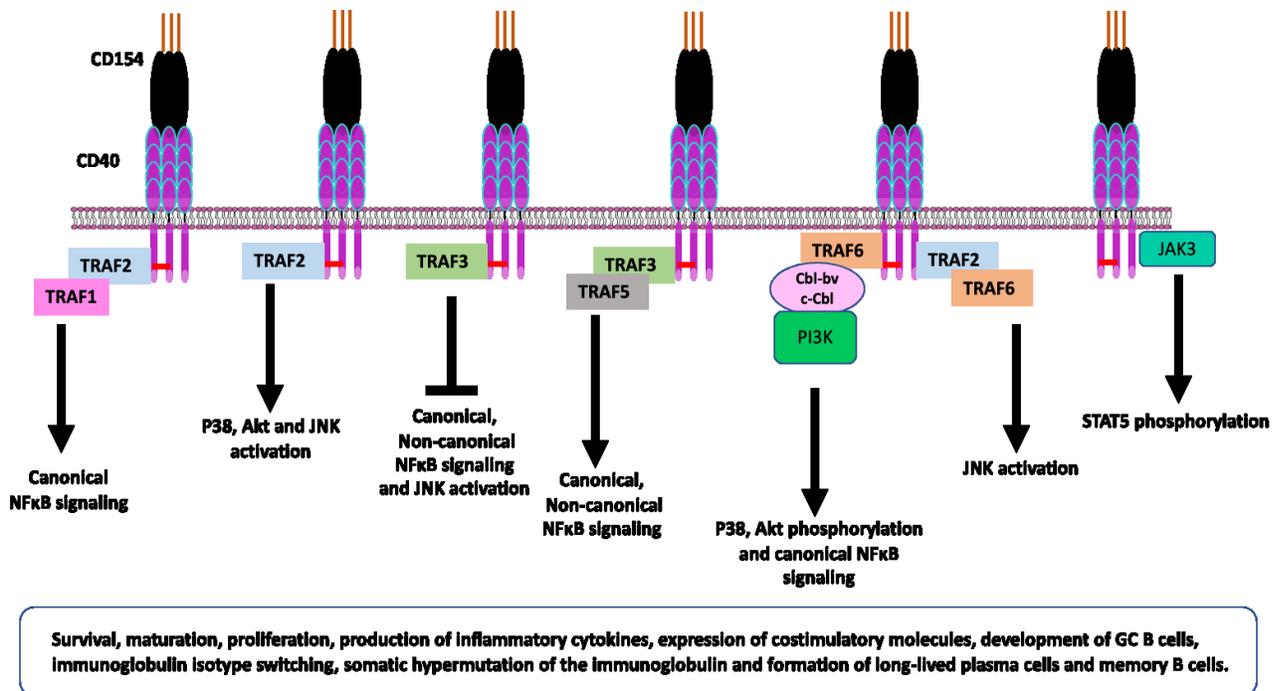


Figure 4. – La signalisation du CD40 est dépendante de l'association à protéines adaptatrices

Suite à l'engagement du CD40, les TRAF 1, 2, 3, 5 et 6, ou la PTK et JAK3 sont recrutés pour s'associer à sa partie cytoplasmique conduisant à l'activation de différentes voies de signalisation. La signalisation dépendante ou indépendante de la protéine TRAF régule différents processus cellulaires et immunitaires. Adaptée de [77]. Avec autorisation du journal *Immunological Reviews*.

3.1.1. Les protéines adaptatrices.

3.1.1.1. Les TNFR associated factors (TRAFs).

Les TRAF constituent une famille de protéines adaptatrices initialement identifiée chez l'homme et les rongeurs pouvant s'associer à différents membres de la famille des TNFR [78]. La famille des TRAF comprend sept membres, TRAF-1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, conduisant le signal à l'intérieur de la cellule suite à l'engagement des membres de la famille des TNFR avec leurs ligands [77]. Tous les TRAF ont une structure similaire et sont constitués d'un domaine N-terminal, un domaine C-terminal [79]. Le domaine carboxyle est hautement conservé leurs permettant d'interagir avec la partie cytoplasmique des récepteurs de surface ou d'autres molécules de signalisation tandis que le domaine N-terminal assure l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des TRAF [80]. A l'exception du TRAF-1, les TRAF sont aussi constitués d'un

domaine RING riche en cystéines et histidines, capables de coordonner la liaison des ions Zn^{2+} , avec des motifs en doigt de zinc adjacents assurant les interactions avec les kinases et les facteurs de transcription impliqués dans la propagation et la régulation des cascades de signalisation [81] (Fig.5). En 2004, la découverte de TRAF-7 a montré que ce dernier partage les mêmes caractéristiques structurales des autres membres de la famille mais possède en plus sept répétitions de tryptophane (W) et d'acide aspartique (D), constituant le domaine WD40 dans son domaine carboxyle (Fig.5). TRAF-7 interagit spécifiquement avec MEKK3 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3*), via WD40, et potentialise l'activation des facteurs de transcription AP1 et CHOP (*C/EBP-homologous protein*) induisant l'activation des voies JNK et p38 responsables de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaire et induit aussi l'apoptose par des voies dépendantes de la caspase [82, 83].

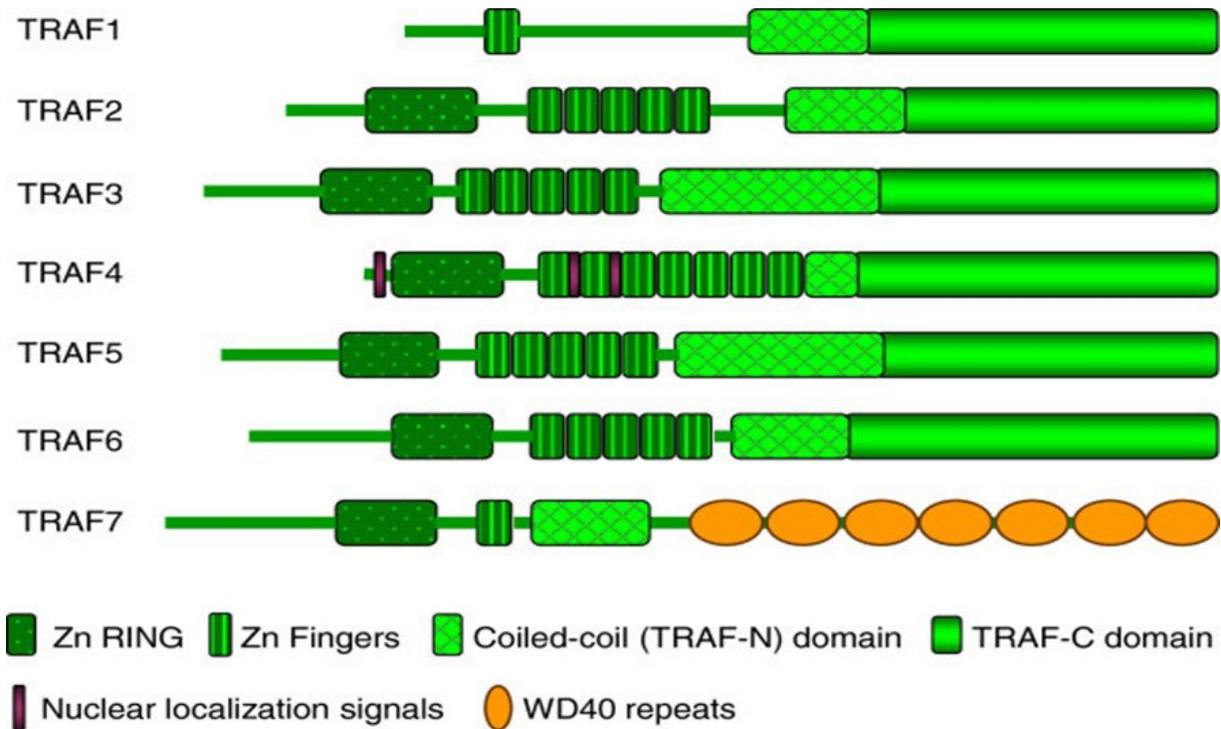


Figure 5. – Les TNFR associated factors (TRAFs).

Figure représentative de la structure des sept protéines TRAF. Les TRAFs sont constitués de différents domaines : le zinc RING (Zn RING), les doigts de zinc (Zn Fingers), le domaine à bobine enroulée (TRAF-N), le domaine TRAF-C, les signaux de localisation nucléaire et les répétitions WD40 [83]. Avec autorisation du *Journal of Molecular Signaling*

Suite à l'engagement avec le CD154, le CD40 recrute directement ou indirectement TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 et TRAF6 dans son domaine cytoplasmique [77]. Le recrutement du TRAF-1 au CD40 peut se faire directement ou indirectement via son association avec TRAF-2 [77]. TRAF-1 joue un rôle important dans la régulation de la signalisation des autres protéines TRAF, il empêche la dégradation de TRAF-2 [84, 85]. TRAF-2 joue un rôle positif dans la différenciation et la prolifération des cellules B [79, 86]. TRAF-3 régule négativement la signalisation du CD40 dans les cellules B [87]. TRAF-5 n'interagit pas directement avec le domaine cytoplasmique du CD40, il peut être recruté indirectement en tant qu'hétéro-oligomère avec le TRAF-3 [88]. TRAF-6, comme TRAF-1, est capable d'interagir directement avec le CD40, ou indirectement en s'associant à TRAF-2, et régule ainsi positivement la signalisation du CD40 [89].

L'activation du CD40, TRAF dépendante, entraîne le lancement de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire, y compris l'activation des voies NF- κ B, PI-3K et JNK, p38 et ERK MAPK [77]. Par conséquent, il est connu que TRAF-6 et TRAF-2 sont capables d'activer le NF- κ B induisant ainsi la survie cellulaire [85]. TRAF-3 est capable d'activer p38 et JNK [90]. Ce dernier peut également médier l'apoptose induite par les voies JNK/AP-1 [91]. TRAF-2 et TRAF-3 sont nécessaires pour la commutation de classe isotypique et la régulation positive du CD23, ICAM et CD86 [92].

Cependant, la signalisation du CD40 pourrait également être médiée par des voies indépendantes des TRAF. En effet, l'engagement du CD40, des cellules B, active les membres de la famille des protéines tyrosine kinase (PTK) et le Janus Kinase 3 (Jak3), qui sont constitutivement associés au CD40 [93, 94].

3.1.1.2. Les protéines tyrosine kinase (PTK) et Le Janus kinase3 (Jak3).

L'engagement du CD40 active les PTK Lyn et Syk ainsi que la PLC- γ C. Ces derniers jouent un rôle important dans l'agrégation médiée par le CD40, l'expression de la lymphotoxine- α (LT- α), et la commutation de classe d'immunoglobuline [93].

Le Jak3 est un membre de la famille des tyrosines kinases Janus kinase. Il est principalement exprimé dans les cellules immunitaires. Jak3 est impliqué dans la transduction du

signal intracellulaire médié par le récepteur des cytokines. En effet, il transduit un signal, en réponse à son activation, via la phosphorylation de la tyrosine par les récepteurs interleukines.

Jak3 s'est révélé capable de se lier directement à la région proximale du domaine cytoplasmique du CD40 [93]. Sa liaison au CD40 induit l'activation du facteur de transcription STAT-5 et sa translocation vers le noyau où il va induire la maturation des cellules dendritiques en induisant l'expression des cytokines inflammatoires telles que TNF- α , IFN- γ [77, 95]. Cependant au niveau des cellules B, et suite à la stimulation du CD40, ce phénomène n'est pas observé, la phosphorylation de Jak3 n'est pas induite [95]. Les signaux d'activation dans les cellules B humaines et les CPA diffèrent après la stimulation du CD40. De même, Jabara et al. ont démontré que Jak3 n'est pas essentiel pour l'induction de la prolifération des cellules B, la commutation de classe isotypique et la régulation positive de l'expression à la surface cellulaire des CD23, ICAM-1, CD80 et la lymphotoxine- α (LT- α), induite via le CD40 [96].

3.1.2. Implication de l'interaction CD154/CD40 dans l'immunité.

Le CD40 interagit avec le CD154, qui se trouve principalement sur les cellules T activées, jouant un rôle dans les réponses immunitaires humorales et cellulaires.

Le rôle critique de l'interaction CD154/CD40 dans l'immunité est devenu apparent et a acquis une pertinence clinique lorsque chez des patients souffrant du syndrome d'hyper-IgM lié au chromosome X, la réponse immunitaire humorale s'est trouvée gravement compromise. En effet, plusieurs mutations ponctuelles ou des délétions au niveau du gène codant pour le CD154 et/ou le CD40 sont à l'origine de ce désordre immunitaire, affectant ainsi cette interaction [97]. L'hyper-IgM se manifeste, au niveau des cellules B, par un défaut de commutation de classes isotypiques de l'IgM/IgD en IgG, IgA et IgE [98]. Les patients atteints sont donc susceptibles aux infections opportunistes et récurrentes, aux maladies auto-immunes ainsi qu'au cancer. La génération de souris *knock-out* CD40 et CD154 a révélé un phénotype comparable à celui des patients souffrant du syndrome d'hyper IgM [99, 100].

En effet, la liaison du CD154 au CD40 est à la base de l'interaction des lymphocytes T activés avec les lymphocytes B. Cette interaction est primordiale à la prolifération et la survie des cellules B, leurs différenciations, la formation de centres germinaux, la génération de cellules B mémoires et la commutation isotypique des immunoglobulines [101] (Fig.6 et Tableau.1). L'engagement du

CD40, exprimé à la surface des cellules B activées par l'antigène, par le CD154 des lymphocytes T activés est essentiel pour l'initiation et la progression de la réponse humorale T dépendante.

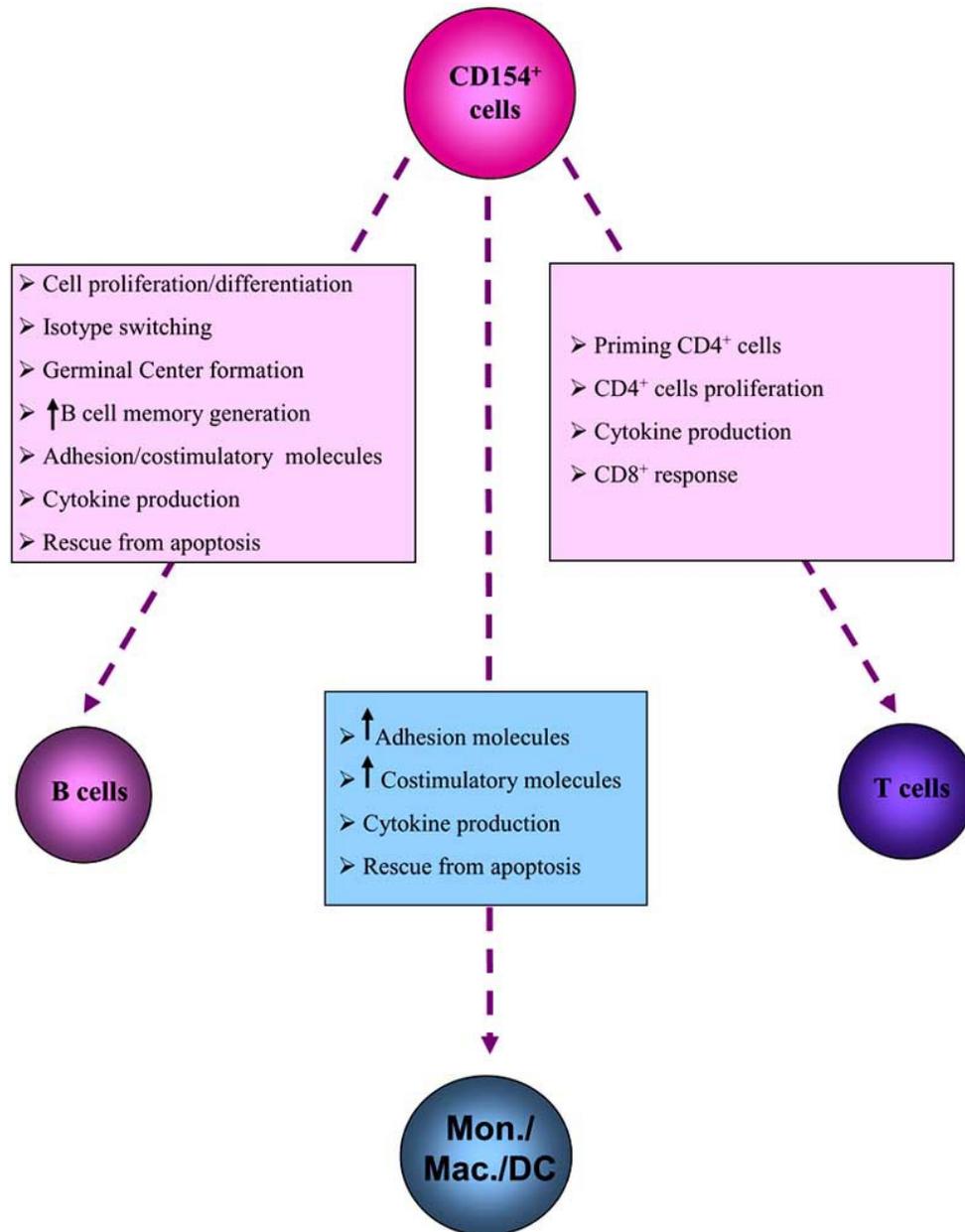


Figure 6. – Les différentes fonctions immunitaires des interactions CD154/CD40.

En plus de son rôle dans les réponses des lymphocytes B, le CD154 est impliqué dans des fonctions impliquant d'autres cellules immunitaires, principalement des monocytes et des lymphocytes T [41]. Avec autorisation du journal *Current Immunology Reviews*

Lors d'une infection par un pathogène, la collaboration cellulaire se manifeste. Effectivement, une interaction entre les cellules T CD4⁺ spécifiques à l'antigène et les cellules B ou les cellules présentatrices d'antigène (CPA), telles que les cellules dendritiques activées présentant des peptides dérivés de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de Classe II (CMH-II), se forme [77]. L'interaction CD154/CD40 est essentielle pour la maturation et la survie des cellules dendritiques. Or ceci nécessite une activation des cellules T naïves qui nécessite à son tour la signalisation spécifique à l'antigène via l'engagement du TCR et via les molécules de costimulation, comme le CD80/CD86 présent à la surface des CPA, qui interagit avec le CD28 des lymphocytes T. En effet, l'engagement du TCR va induire l'expression du CD154 sur les lymphocytes T, qui via des interactions directes peut augmenter les niveaux des molécules de costimulation telles que CD80/CD86 sur les lymphocytes B ou autres CPA. Cette interaction va induire donc l'activation des CPA et la production de l'IL-12 et IL-10 par les cellules dendritiques [41]. Par la suite, une amplification de l'activation des lymphocytes T, leurs expansion et différenciation en cellules effectrices spécifiques à l'antigène auront lieu [27] (Fig-6). Ces cellules T effectrices vont permettre donc aux CPA de s'activer et d'activer à leur tour les cellules T CD8⁺. L'interaction CD154/CD40 va induire un signal de prolifération et une production d'IL-2, modulant les fonctions des cellules T et leur polarisation en cellules Th-1 [102] (Fig.6).

Il a été donc établi que l'interaction CD154/CD40 participe aussi au développement des réponses immunitaires à médiation cellulaire par son implication dans l'activation et la maturation des cellules dendritiques et des monocytes/macrophages régulant l'expression des molécules d'adhésion et d'inflammation, des cytokines, chimiokines et des métalloprotéinases [103] (Fig.6). L'interaction CD154/CD40 régule l'activité costimulatrice des CPA, induisant au niveau des cellules B la régulation positive de l'expression du CD80 et CD86. Elle stimule aussi les cellules dendritiques en augmentant l'expression de CD86 et ICAM-1 à leurs surfaces et induit aussi la production de différentes cytokines telles que l'IL-8, TNF- α , MIP-1 α [99] (Fig.7-Tableau.1).

De plus, le CD154 et le CD40 sont exprimés à la surface de différentes cellules non immunitaires, d'où l'interaction CD154/CD40 résulte en une amplification des réponses inflammatoires par la production de cytokine proinflammatoire, des chimiokines et des molécules

d'adhésion [27]. Par exemple, l'engagement du CD40 des cellules endothéliales et des fibroblastes déclenche la production de nombreuses chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1), cytokines telles que l'IL-6, IL-12, TNF- α , augmente l'expression des molécules d'adhésion cellulaires (ICAM-1, VCAM-1) et induit la sécrétion des métalloprotéinases [104] (Fig.7- Tableau.1).

Tableau 1. – Les différentes fonctions biologiques du CD154 [27].

	Function	Cell type	Mediator
Humoral immunity	activation	B lymphocytes	CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHCII; cytokines: IL-6, IL-10, TNB- α , TGF- β
	Ig class switching	B lymphocytes	IgA, IgD (?), IgE, IgG, IgM
	Formation of germinal center and memory cells	B lymphocytes	cytokines: IL-2, IL-10; cytokine receptors
Cellular immunity	pro-inflammatory cytokines	B lymphocytes eosinophils monocytes dendritic cells epithelial cells fibroblasts keratinocytes endothelial cells smooth muscle cells	IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β
	chemokines	monocytes epithelial cells fibroblasts keratinocytes endothelial cells	IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1 ABCD-1: CCR7 (diminished CCR1/5)
	adhesion molecules	B lymphocytes endothelial cells fibroblasts	LFA-1, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, VLA-4
	matrix metalloproteinases	monocytes fibroblasts endothelial cells smooth muscle cells	interstitial collagenase 1 and 3 (MMP-1, MMP-13), gelatinase A and B (MMP-2, MMP-9), stromelysin 1 (MMP-3) and 3 (MMP-11)
	procoagulant activities	monocytes endothelial cells smooth muscle cells	tissue factor
	others	monocytes dendritic cells fibroblasts endothelial cells	Cox-2, nitric oxide

Ces observations suggèrent que l'interaction CD154/CD40 envoie des signaux autant via le récepteur CD40, que via son ligand, le CD154. Comme décrit ci-dessus, la signalisation CD154/CD40 n'est pas limitée aux lymphocytes B. Plusieurs études ont démontré que l'engagement du CD154 sur les cellules T fournit des signaux costimulateurs dans le

développement des réponses des cellules T auxiliaires. Donc, en plus de son rôle de ligand pour cinq récepteurs, le CD154 agit également comme une molécule de transduction de signal. En effet, la première évidence témoignant la possibilité du CD154 à transmettre un signal, a été décrite en 1995 par *Van Essen*. En effet, lors de cette étude faite chez des souris déficientes en CD40, une formation de centres germinatifs a eu lieu suite à une stimulation avec un CD40 soluble (sCD40) [105]. Une étude *in-vitro* a démontré que l'induction de l'expression de l'IL-4 via CD3 et/ou CD28 nécessite une costimulation des cellules T via le CD154 [106]. Par la suite, il a été démontré qu'une stimulation des cellules T avec un anticorps monoclonal dirigé contre le CD154, ou avec une forme recombinante du CD40, entraîne une activation des kinases JNK et p38 [107]. De plus, nous avons démontré que l'engagement du CD154 par le sCD40, induit son oligomérisation et sa relocalisation dans les radeaux lipidiques, active les voies PKC, mobilise le calcium et active les voies p38, Akt et ERK entraînant l'activation cellulaire et la libération de l'IL-2 [108, 109]. En 2013, nous avons montré que la stimulation avec le CD40 soluble conduit à une libération significative du sCD154. D'où, la signalisation via le CD154 seul est suffisante pour induire son clivage induit par ADAM-10 et ADAM-17 [18]. En plus, nous avons démontré que l'interaction du CD154 avec la forme soluble de ses autres récepteurs ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$ et $\alpha M\beta 2$) induit elle aussi l'activation de p38 et ERK [40].

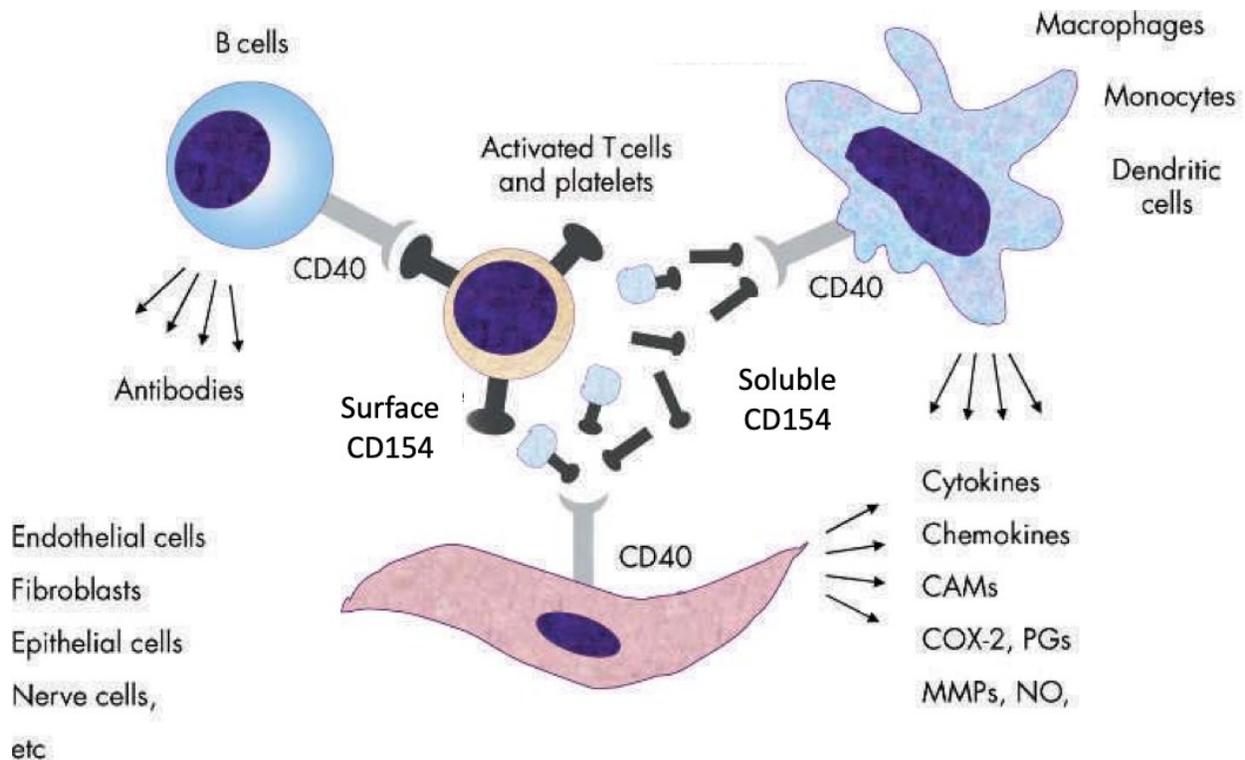


Figure 7. – Effets résultant de l'interaction du CD154 avec le CD40 des cellules immunitaires et non immunitaires.

L'engagement de CD40 des cellules B conduit à la production d'anticorps alors que son engagement sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques induit la production de cytokines, de chimiokines, de cyclooxygénases (COX), de prostaglandines (PG), de métalloprotéinases (MMP) et d'oxyde nitrique (NO). L'activation de cellules non immunitaires par le CD40 induit des effets similaires à ceux observés dans les cellules monocytaires [104]. Avec autorisation du journal *Gut*.

3.1.3. Implication de l'interaction CD154/CD40 dans la mort cellulaire.

Le CD40 en plus d'être exprimé à la surface des cellules immunitaires, il est aussi présent au niveau des cellules hématopoïétiques malignes, comme lors d'une leucémie lymphoïde chronique, d'un lymphome de Burkitt et lymphome non hodgkinien et au niveau d'un certain nombre de carcinomes, y compris ceux de l'ovaire, de la vessie, de l'oropharynx, du col de l'utérus et du sein [110]. L'engagement du CD40 par le CD154 fournit des signaux de survie et de prolifération dans les lymphocytes B favorisant leur différenciation en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines. Son engagement sur les cellules B immatures sauve les cellules de la mort,

tandis que sur les cellules B matures augmente la sensibilité à la mort médiée par Fas [111]. Cette mort est principalement observée au niveau des cellules Ramos activées et des cellules B transformées par le virus de l'Epstein-Barr (EBV) [112]. En revanche, au niveau des cellules cancéreuses le niveau d'engagement du CD40 influence la résultante physiologique; des faibles niveaux de CD40 favorisent la survie et la prolifération cellulaire tandis que des niveaux élevés induisent un arrêt de la croissance et l'apoptose [113].

L'interaction du CD40 avec la forme membranaire du CD154 induit l'apoptose des cellules malignes, alors que le sCD154 induit l'apoptose des cellules uniquement en présence d'inhibiteurs de la cascade des MAPK ou de la synthèse des protéines [114]. De plus, notre équipe a montré que la mort cellulaire déclenchée par le CD40 est médiée par la perméabilisation de la membrane lysosomale dépendante des espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à la libération de cathepsine B dans le cytosol [115].

Certains membres de la famille TRAF, une fois associés au CD40, interviennent dans l'activation d'importants régulateurs transcriptionnels, notamment le facteur nucléaire kappa B (NFκB) et les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). L'activation du NFκB est associée à la survie cellulaire, tandis que celle des MAPK peut aussi bien être impliquée dans la survie que dans l'apoptose [115]. Une activation de ERK (*extracellular regulated kinases*) est associée à la survie, tandis que l'activation de la JNK (*jun N-terminal kinases*) et p38 favorisent l'apoptose [116]. Il a été démontré que le CD154 induit la mort cellulaire suite à l'activation de TRAF-3 et la suppression de la signalisation TRAF-6. En effet, TRAF-3 active la voie JNK et la voie mitochondriale de l'apoptose alors que TRAF-6 active celle de survie Akt [117].

3.2. L'interaction CD154/αIIbβ3.

En 2002, André et al. ont démontré que le sCD154 est capable de lier l'αIIbβ3 des plaquettes activées, favorisant l'agrégation plaquettaire et induisant la stabilité du thrombus artériel [118]. L'interaction du CD154 avec l'αIIbβ3 activée est dépendante de la sous-unité β3, plus spécifiquement de la phosphorylation des résidus tyrosine présents dans son domaine cytoplasmique. En effet, l'utilisation de plaquettes provenant de souris hébergeant une chaîne β3 dans laquelle les deux tyrosines cytoplasmiques ont été mutées en phénylalanine, produisent des

agrégats de plaquettes instables. De plus, suite à la stimulation par la thrombine cette interaction est abolie au niveau des plaquettes provenant de souris déficientes en $\beta 3$ [119]. Le défaut de la thrombose observé chez des souris $CD154^{-/-}$, a été restauré suite à l'administration du sCD154, démontrant l'activité prothrombotique de cette protéine [19]. Suite à son interaction avec l' $\alpha IIb\beta 3$, il a été démontré que le CD154 est un agoniste plaquettaire capable de déclencher un signal *outside-in* activant les plaquettes et induisant l'expression de la p-sélectine et la sécrétion de microparticules plaquettaires [119] (Fig.8).

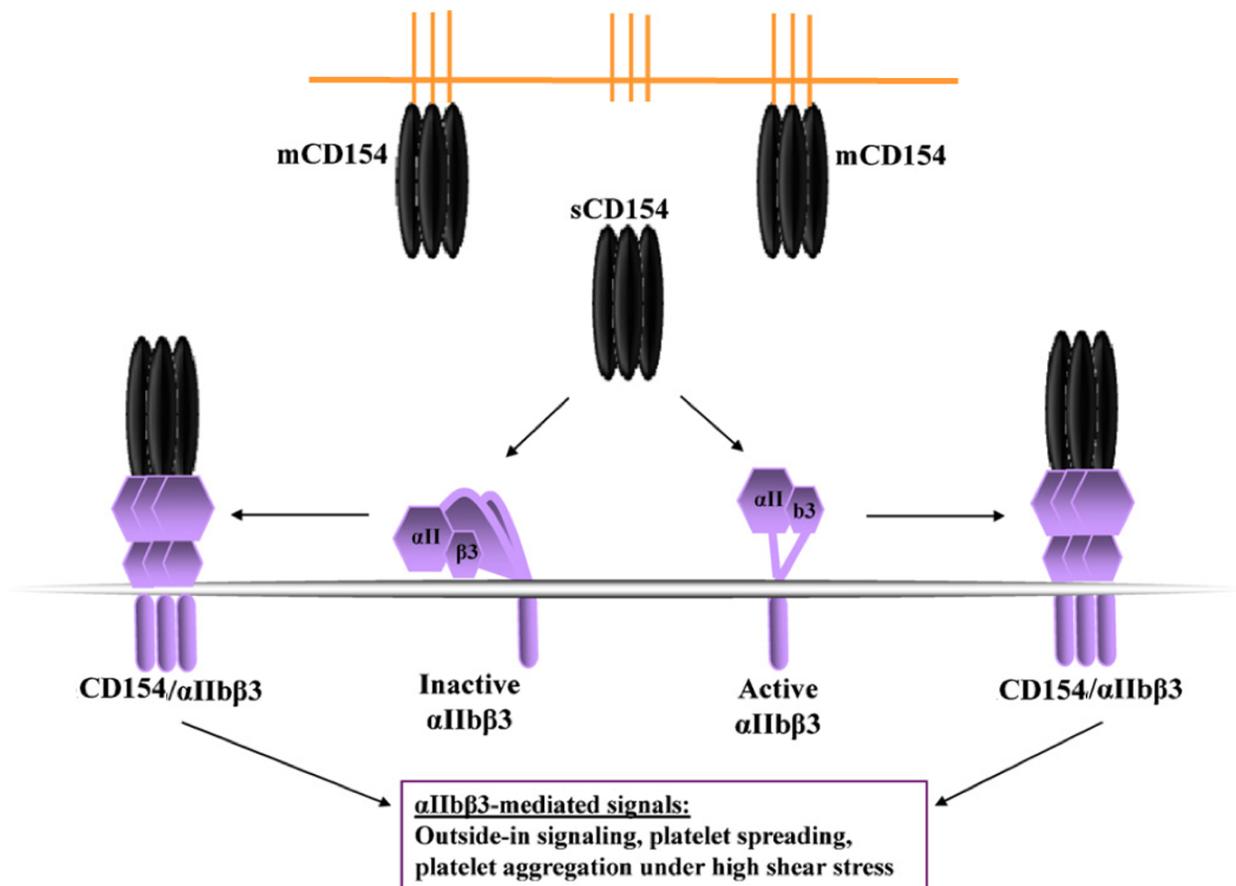


Figure 8. – L'interaction CD154/ $\alpha IIb\beta 3$.

Le CD154 trimérique soluble lie l' $\alpha IIb\beta 3$. Cette interaction implique à la fois les formes actives et inactives de cette intégrine, induisant l'activation et l'agrégation plaquettaire et stabilise le thrombus artériel [47]. Avec autorisation du journal *Immunobiology*.

3.3. L'interaction CD154/ α 5 β 1.

L'engagement de l' α 5 β 1 par le CD154 induit l'activation des voies de signalisation ERK et conduit à l'expression du gène de l'IL-8, suggérant que cette interaction joue un rôle dans l'inflammation [32] (Fig.9).

De plus, l'interaction CD154/ α 5 β 1 n'interfère pas avec le site de liaison du CD154 au CD40, d'où le CD154 peut se lier simultanément aux deux récepteurs [32, 66]. Ces résultats soulèvent donc la possibilité que le sCD154 puisse servir de pont moléculaire entre le CD40 et l' α 5 β 1 exprimés sur différents types cellulaires, ou puisse lier les deux récepteurs exprimés au niveau de la même cellule. L'engagement simultané du CD40 et de l' α 5 β 1, active les protéines kinases p38 et ERK et augmente la sécrétion des médiateurs inflammatoires [66].

L'interaction CD154/ α 5 β 1 joue un rôle important dans le développement de l'asthme et dans l'hyperréactivité bronchique induite par les allergènes. En effet, l'interaction du CD154 avec l' α 5 β 1 des fibroblastes bronchiques asthmatiques, induit une augmentation dans la production de l'IL-6 et maintient l'inflammation à ce niveau. Cette production est complètement abolie suite à l'administration d'anticorps bloquant dirigés contre le CD154 et non suite aux anticorps anti-CD40 [120].

Notre récente étude a montré que l'interaction du sCD154 avec l' α 5 β 1 des cellules T lymphoblastiques de leucémie aigüe, est associée à l'activation des voies de survie telles que les MAPK (p38 et ERK) et les PI-3K (Akt) [121]. Nous avons également démontré que le traitement de ces cellules avec le sCD154 inhibe la mort induite par Fas, dans un mécanisme impliquant l'activation de PI-3K et une diminution du clivage de la caspase-8 [121].

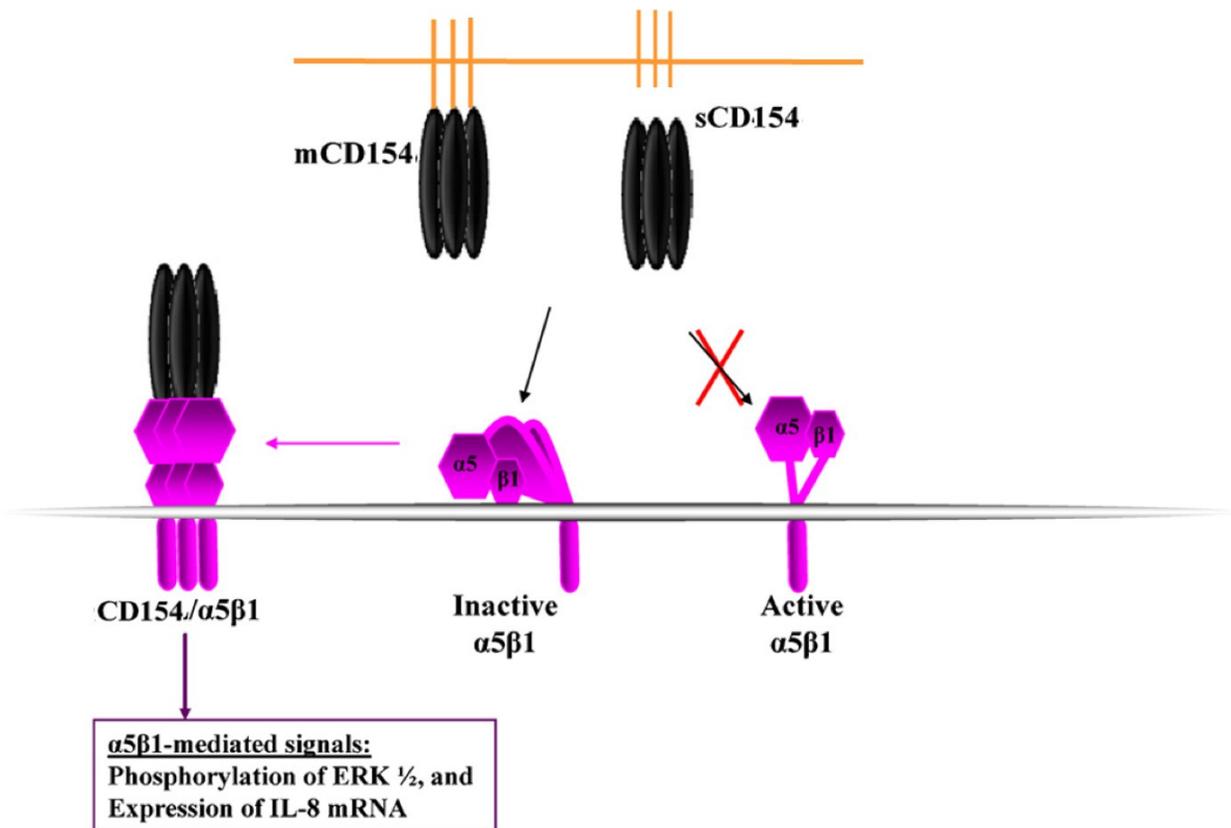


Figure 9. – L'Interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$.

Le CD154 interagit avec la forme inactive de l' $\alpha 5\beta 1$. Cette interaction induit l'activation de la voie ERK1/2 et l'expression du gène d'IL-8 [47]. Avec autorisation du journal *Immunobiology*.

3.4. L'interaction CD154/ $\alpha M\beta 2$.

L' $\alpha M\beta 2$ joue un rôle dans les réponses immunitaires et inflammatoires. En effet, Zirlik et al. ont démontré que l'interaction CD154/ $\alpha M\beta 2$ améliore l'adhésion et favorise la migration des leucocytes via leurs $\alpha M\beta 2$ vers le site inflammatoire et joue ainsi un rôle dans l'athérogenèse [33]. En effet, l'inhibition de cette interaction atténue fortement le recrutement leucocytaire et l'athérogenèse mais n'affecte pas la thrombose et l'immunité [70]. De plus, l'inhibition de l' $\alpha M\beta 2$ chez des modèles de souris athérosclérotiques atténue la formation de la plaque d'athérome [33, 122].

L'interaction CD154/ α M β 2 joue alors un rôle dans les maladies où le recrutement et l'infiltration des leucocytes, vers les sites des lésions, représentent des caractéristiques importantes (Fig.10).

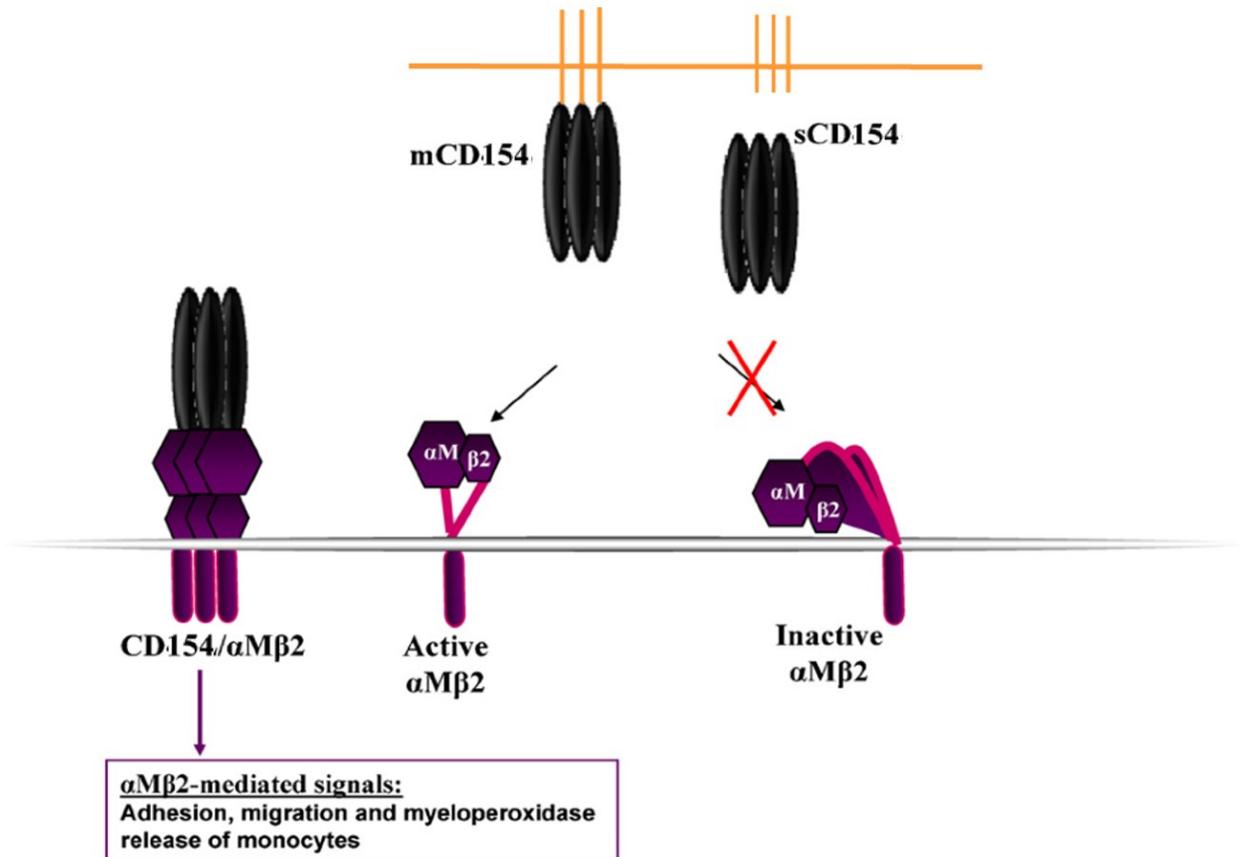


Figure 10. – L'interaction CD154/ α M β 2.

Le CD154 qu'il soit soluble ou membranaire lie uniquement la forme active de l' α M β 2. Cette interaction induit l'adhérence et la migration des monocytes au niveau de la plaque athérosclérotique [47]. Avec autorisation du journal *Immunobiology*.

4. Le rôle pathologique de l'interaction du CD154/CD40.

L'expression constitutive et inductible appropriée du CD40 est une condition nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire, alors qu'une expression aberrante est

impliquée dans les maladies infectieuses et non infectieuses ainsi que dans la pathogenèse de diverses maladies auto-immunes.

Dans des conditions inflammatoires, nous observons une surexpression du CD40, par les cellules mésenchymateuses, endothéliales et épithéliales ainsi qu'une augmentation de l'expression du CD154, principalement par les cellules lymphoïdes. L'engagement du CD40 avec le CD154 régule une gamme de processus moléculaires et cellulaires et initie la progression de l'immunité adaptative à médiation cellulaire et humorale. En effet, les cellules T activées du sang périphérique vont interagir avec le CD40 des cellules non immunes, menant à une activation persistante des voies du CD154 avec une inflammation prolongée due à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et à la production de chimiokines [123].

L'implication du CD154 et du CD40 dans le développement, la progression et le maintien des maladies auto-immunes est donc un processus complexe qui commence par le développement de la réponse immunitaire adaptative et mène à l'auto-immunité, l'inflammation chronique et même au cancer [27, 99].

5. L'implication du CD154/CD40 dans les maladies auto-immunes.

Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire se traduisant par une violation de la tolérance avec une incapacité à distinguer le soi du non soi. Il existe trois mécanismes d'action par lesquels l'axe CD154/CD40 contribue au développement des maladies auto-immunes. Ces derniers dépendent principalement de l'activation du CD40.

Le premier mécanisme est médié par une mauvaise sélection des lymphocytes T dans le thymus. En effet, l'activation du CD40 au cours de la sélection thymique des lymphocytes T pourrait favoriser l'échappement de cellules T auto-réactives. Cette sélection négative est régulée en partie par la présence d'un CD40. Une activation exagérée ou un défaut d'activation pourrait mener à l'échappement de ces cellules T auto-réactives, entraînant un échec de la tolérance centrale et le développement potentiel ultérieur de maladies auto-immunes.

Le deuxième mécanisme, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, l'interaction du CD154 avec le CD40 des CPA, va induire la surexpression du CD40 et mène à une interaction

accrue du CD154/CD40. Elle va favoriser l'activation des lymphocytes T auto-réactifs et induire la production de cytokine pro-inflammatoire par les CPA et d'auto-anticorps par les cellules B. Parmi les cytokines pro-inflammatoires sécrétées, IL-6 s'est avérée induire la différenciation des lymphocytes T en cellules Th17, qui en secrétant l'IL-17, induisent des lésions tissulaires.

Le troisième mécanisme résulte d'une expression anormale du CD40 dans les tissus où ses niveaux d'expression varient d'une expression faible ou inexistante à une forte expression. Dans ces conditions, les tissus eux-mêmes contribuent au déclenchement des maladies auto-immunes [123].

Par conséquent, l'augmentation de l'expression du CD40 et les interactions CD154/CD40 exagérées, contribuent au développement des maladies auto-immunes dans lesquelles l'activation des lymphocytes B et les lymphocytes T joue un rôle majeur. C'est le cas pour plusieurs maladies telles que le lupus érythémateux disséminé (LED), l'arthrite rhumatoïde (AR), la sclérose en plaques (SP), le diabète auto-immun, les maladies inflammatoires de l'intestin y compris la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse.

5.1. Le lupus érythémateux disséminé.

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune chronique, conduisant à des lésions d'organes multiples. Cette maladie est caractérisée par la production de divers auto-anticorps tels que les anticorps anti-ADN double brin [124].

Le LED est le résultat d'un défaut du système immunitaire, inné et adaptatif, caractérisé par une activation lymphocytaire dans laquelle les cellules B jouent un rôle important [125]. Ces lymphocytes B du sang périphérique vont exprimer des niveaux élevés de molécules de costimulation telles que CD80 et CD86 [126]. De plus, une surexpression du CD154 a été identifiée au niveau des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ des patients lupiques [127], ainsi qu'au niveau de leurs cellules B et monocytes [127-129]. Le CD154 présent à la surface des cellules B est fonctionnel vu sa capacité spontanée à produire des anticorps *in-vitro* [128]. En effet, un modèle de souris transgéniques génétiquement modifiées pour exprimer le CD154 à la surface des cellules B, produit spontanément des auto-anticorps tels que les anticorps anti-ADN et développe une glomérulonéphrite de type lupus, suggérant que l'expression ectopique du CD154 peut être

suffisante pour provoquer l'auto-immunité [130]. Il a été aussi prouvé que les monocytes de patients LED expriment fortement le CD154 [131].

Cette expression anormale n'est pas seulement limitée au CD154 membranaire, un taux élevé de sCD154 est également détectable dans le sérum de patients étant donné que le plasma des patients LED est capable d'activer les lymphocytes B *in-vitro*, et cette activation est inhibée suite à l'ajout d'un anti-CD154 [22]. De plus, les études ont montré que la concentration de sCD154 dans le sérum est corrélée à la gravité du LED [132].

L'interaction CD154/CD40 s'est avérée impliquée à différents niveaux du LED. En interagissant avec le CD40 à la surface des cellules B, le CD154 favorise l'activation des cellules B, la prolifération et la production d'auto-anticorps. Le CD154 est aussi impliqué dans la surexpression des molécules costimulatrices à la surface des cellules B telles que le CD86, qui est lui-même essentiel pour la production d'anticorps anti-ADN [133]. De plus, le CD154 induit la production de diverses chimiokines dans les cellules rénales endothéliales et tubulaires (E-selectine, ICAM-1 et VCAM-1), induisant ainsi le trafic de leucocytes vers les sites d'inflammation et augmentant les réponses inflammatoires locales [134]. Le CD154 s'est également révélé impliquer les plaquettes, son principal réservoir, dans la pathogenèse du LED. En effet, le CD154 active les cellules mésangiales en augmentant leur niveau d'expression en CD40 et stimule leur prolifération et la production de TGF- β , agent contribuant aux maladies rénales [135]. De plus, les cellules dendritiques plasmacytoïdes par leur production d'IFN de type I (IFN-I) va directement causer des lésions tissulaires et amplifier l'activation des cellules B et T auto-réactives [136].

Le blocage de l'interaction CD154/CD40 par des anticorps neutralisants, dans un modèle de souris LED, empêche le développement de la maladie, une fois administrés avant l'initiation de la maladie. Cependant, le traitement une fois la néphrite déjà développée, n'empêche pas la maladie mais ralentit sa progression. En effet, cette administration atténue la complication pathologique associée à cette maladie, l'insuffisance rénale et induit une diminution de la production d'anticorps anti-ADN [137-140]. Ces études fournissent plus de preuves du rôle critique du CD154 dans cette pathologie.

Plusieurs polymorphismes au niveau du gène codant le CD40, rs4810485 G/T rs4810495, rs1883832, et rs376545, ont été associés au Lupus, augmentant la sévérité de la maladie et les concentrations en sCD154 et en soluble CD40 [141]. Une étude sur une population chinoise a montré une association d'un polymorphisme au niveau du gène codant le CD154, rs1126535 T/C, et l'expression anormale du sCD154 lors du Lupus [142].

5.2. L'arthrite rhumatoïde.

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune inflammatoire chronique liée aux loci du CMH-II et se caractérise par l'infiltration des cellules T, des cellules B, des granulocytes et des macrophages au niveau de la synovie; par la néovascularisation; par la formation de pannus et par la dégradation progressive du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral [143]. En effet, l'infiltration de ces cellules induit la production locale de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 et Th17, des chimiokines et de métalloprotéinases. Les cellules de l'environnement synovial présentent un phénotype activé, synthétisent et libèrent des facteurs inflammatoires et contribuent directement à la destruction articulaire et à l'amplification du cycle inflammatoire [144]. Les études indiquent l'implication des lymphocytes T [145] et des lymphocytes B [146] dans l'initiation et la progression de l'AR.

Plusieurs études soutiennent l'implication de l'axe CD154/CD40. En effet, dans le cas de l'AR, le CD40 est fortement exprimé au niveau des fibroblastes et des cellules synoviales. Cette surexpression est le résultat d'un environnement pro-inflammatoire, due à la présence de cytokines telles que l'IFN- γ et TNF α [123, 144, 147].

De même, une surexpression du CD154 a été observée au niveau des cellules T du sang périphérique et des cellules T du liquide synovial [41]. Les taux sériques de sCD154 sont augmentés chez les patients atteints d'AR par rapport aux sujets sains [148]. L'interaction du CD154 avec le CD40 stimule la survie des cellules B, induit la production d'immunoglobulines et du facteur rhumatoïde, facteur clé dans l'AR et induit l'expression de l'IL-12 par les cellules dendritiques [149].

De plus, la plupart des monocytes du liquide synovial des patients atteints de l'AR exprime un haut niveau de CD40 qui, suite à son interaction avec le CD154, va induire la sécrétion de TNF-

α ainsi que la production de différentes cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) et chimiokines (*monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)), pouvant contribuer à l'inflammation observée [150]. Les macrophages activés par le CD154 participent à la pathogenèse de l'AR en induisant la production des métalloprotéinases détruisant ainsi le cartilage et les os [151].

L'interaction CD154/CD40 augmente l'expression des molécules d'adhésion sur les fibroblastes, comme l'E-sélectine, la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1), et la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et améliore ainsi l'infiltration des cellules immunitaires aux sites d'inflammation [152].

Donc, le CD154 active de nombreuses cellules d'importance critique dans la pathogenèse de l'AR, induisant des réponses telles que la libération de cytokines, la dégradation de la matrice et la production d'auto-anticorps et favorisant en tant que tel le développement de la maladie.

Les données provenant de modèles animaux soutiennent de manière convaincante le rôle de l'interaction CD154/CD40 dans la pathogenèse de cette maladie. Effectivement, le traitement de souris avec un antagoniste du CD154 avant l'induction de l'arthrite par le collagène (CIA), empêche le développement de la maladie tout en réduisant l'inflammation articulaire et l'érosion du cartilage et des os [153]. Cependant, l'administration d'anticorps agoniste du CD40, induit une sur-activation des cellules avec une production accrue d'IFN- γ par les cellules T, entraînant l'apparition précoce et plus grave de la maladie chez les souris immunisées par le collagène [154]. Toujours dans le même modèle murin de CIA, le *knockdown* du CD40 par l'introduction de siRNA entraîne une réduction de la gravité de la maladie. Cette réduction est observée à la fois avant et après l'immunisation par le collagène [155].

Un polymorphisme nucléotidique au niveau du gène du CD40, rs4810485, est associé à l'AR, affectant le niveau d'expression du CD40 à la surface des cellules B et des monocytes [156, 157]. De plus, plusieurs autres polymorphismes au niveau des protéines de signalisation du CD40 ont été identifiés [157].

5.3. Thyroïdite auto-immune.

La thyroïde est une glande endocrine contrôlant diverses voies métaboliques. Elle est souvent affectée par la maladie, 5% de la population mondiale souffre d'une forme de maladie thyroïdienne auto-immune [123]. La thyroïdite auto-immune se manifeste par la thyroïdite de Hashimoto, entraînant une hypothyroïdie et la maladie de Graves entraînant une hyperthyroïdie. Lors de cette maladie, des facteurs environnementaux et géniques vont agir de concert pour déclencher des réponses contre la thyroïde [158].

Le CD40, le CD80 et le CMH-II sont surexprimés au niveau des cellules épithéliales thyroïdiennes de cette maladie auto-immune [86]. De plus, le degré d'expression du CD40 est fortement corrélé avec le niveau d'infiltration des lymphocytes T [159]. Ensemble, ces derniers contribuent à la présentation antigénique et à la fourniture des signaux de costimulations. En effet, l'interaction du CD40, des cellules thyroïdiennes, avec le CD154 des cellules T va induire l'activation des cellules B et des cellules T cytotoxiques.

Il a été démontré que des niveaux d'expression membranaire élevés du CD40 au niveau des cellules de la glande thyroïde, pour la maladie de Graves, contribue à l'initiation de la maladie [123].

Contrairement à la thyroïdite de Hashimoto, où aucun polymorphisme n'a été identifié, un polymorphisme nucléotidique dans l'allèle C de la séquence Kozak du gène du CD40 a été observé pour la maladie de Graves, contribuant à la surexpression du CD40 au niveau des cellules B [160].

5.4. La sclérose en plaques.

La sclérose en plaques (SP) est une maladie auto-immune inflammatoire qui affecte le système nerveux central, composé du cerveau et de la moelle épinière, entraînant un amincissement ou une perte complète de la myéline. La résultante est une conduite défectueuse des signaux électriques via les neurones menant à un dysfonctionnement moteur et sensoriel [161].

Les cellules T (CD4⁺ et CD8⁺), les cellules B, les macrophages et les microglies activées infiltrent le système nerveux central et détruisent la myéline [162]. Des études sur des sections de cerveau de patients atteints de SP, ont montré que la plupart des cellules CD154⁺ présentes sont des cellules T CD4⁺ activées, et la plupart des cellules CD40⁺ sont soit des macrophages/microglies, soit des cellules B [123].

Lors de la SP, les réponses immunes sont du type Th-1, les cellules T produisent une concentration accrue en IFN- γ et qui suite à l'engagement de leur CD154 avec le CD40 des CPA induisent la sécrétion d'IL-12 et la surexpression des molécules de costimulation, CD80, CD86 [163]. Le CD154 surexprimé a été démontré comme étant impliqué dans la transmigration des cellules T ainsi que dans l'adhésion des leucocytes et leur extravasation dans l'espace sous-endothélial. De plus, suite à l'activation des cellules B CD40⁺ par le CD154, il y a production d'auto-anticorps dirigés contre la myéline [41].

Des études menées chez des souris développant une maladie inflammatoire démyélinisante du système nerveux central, appelée encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), ont montré une similarité entre les aspects cliniques et immunologiques de la SP. En effet, le CD154 est fortement exprimé lors de l'EAE, et cette maladie ne se développe pas chez les souris CD154 *Knockout*, transgéniques pour le récepteur de la myéline, en raison d'un manque d'interaction entre les cellules T et les CPA induisant un défaut dans l'activation des CPA et dans la production d'IFN- γ par les cellules T [164]. De plus, le traitement de ces souris EAE avec un anticorps antagoniste du CD154, lors de l'induction de la maladie, atténue les symptômes cliniques et la production des anticorps dirigés contre la myéline. Ce traitement s'est avéré toujours efficace même lorsque l'anti-CD154 est administré peu de temps après l'induction de l'EAE [165].

5.5. Le diabète auto-immun.

Le diabète auto-immun de type I, appelé aussi diabète sucré insulino-dépendant, est une maladie auto-immune caractérisée par une carence en insuline et une hyperglycémie. La carence en insuline est causée par une destruction immunitaire, par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ auto-

agressifs qui envahissent les îlots pancréatiques de Langerhans et détruisent les cellules bêta contenant de l'insuline [166].

Une grande partie de ce qui est actuellement connu sur le diabète de type I découle des études de modèles animaux. À cet égard, l'étude de la souris diabétique non obèse (NOD), qui imite de nombreuses caractéristiques du diabète de type I humain, a permis l'évaluation des causes potentielles de la pathogenèse de ce diabète [167]. La perturbation des interactions CD40/CD154 en utilisant des anticorps anti-CD154 antagonistes atténue le développement du diabète chez les souris NOD [168].

Les cellules T réactives aux antigènes dérivés des cellules bêta sont essentielles pour la pathogenèse du diabète de type I. En effet le transfert ou l'élimination des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ peuvent, respectivement précipiter ou prévenir le diabète [166]. De même, les études sur des souris NOD déficientes en cellules B ne développant pas le diabète ont montré le rôle important que jouent les cellules B dans la pathogenèse de la maladie [123].

Le CD40 est exprimé à la surface des cellules bêta et cette expression peut être régulée à la hausse suite à la présence d'un milieu pro-inflammatoire (IL1 β , IFN- γ , IL-8, IL-6, MCP-1 et TNF α). Ces cytokines/chimiokines sont produites suite à l'interaction du CD154 des cellules T avec le CD40 exprimé à la surface des cellules pancréatiques [169].

Ces patients diabétiques ont également montré des niveaux élevés de sCD154 ainsi qu'une expression du CD154 à la surface des plaquettes [103].

Les études ont démontré la présence de cellules T CD4⁺ CD40⁺ chez la souris NOD [170]. De plus, ces lymphocytes T, exprimant le CD40, ont été décrits chez des diabétiques humains de type 1, indiquant fortement un lien entre l'expression ectopique du CD40 et le phénotype auto-agressif [171].

5.6. Les maladies inflammatoires de l'intestin.

La maladie inflammatoire de l'intestin est une maladie chronique à médiation immunitaire affectant le tractus gastro-intestinal, se caractérisant par une inflammation récurrente du petit et

du gros intestin. La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont les deux grandes catégories de troubles inflammatoires intestinaux faisant partie de ces maladies inflammatoires [172].

La pathogenèse de ces maladies, principalement provoquées par des défauts de la barrière muqueuse, résulte d'une interaction complexe des facteurs génétiques, environnementaux, immunologiques et des composants du stress oxydatif [173]. Effectivement, l'infiltration de macrophages, de lymphocytes T et B dans l'épithélium intestinal perturbe sa fonction de barrière entraînant une diarrhée, des douleurs, des saignements rectaux et la malnutrition chez les individus qui y sont atteints [123].

Il a été reporté que l'activation de la voie CD154/CD40 est impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, la surexpression du CD40 est observée au niveau des monocytes, des cellules dendritiques, des cellules endothéliales et des cellules mésenchymateuses. Cette surexpression s'est révélée être directement proportionnelle à l'activité clinique des patients souffrant d'une colite ulcéreuse. De plus, les cellules T de la lamina propria expriment de forts niveaux du CD154, les plaquettes de la muqueuse intestinale expriment elles aussi des taux élevés du CD154 et des molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) [174]. La formation d'agrégats plaquettaires adhérant intimement à l'endothélium va initier la réponse inflammatoire. Ce contact physique entre les plaquettes et l'endothélium pourrait être responsable de l'apparition d'un état procoagulant, et potentiellement conduire aux événements thromboemboliques fréquemment observés chez ces patients [104]. L'interaction du CD154 avec le CD40 des cellules endothéliales va induire la production d'IL-8, responsable du recrutement des neutrophiles au site inflammatoire [174]. De plus, les taux sériques du sCD154 sont augmentés chez les patients souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin [175].

Dans des modèles de souris colitiques, il a été démontré que l'administration d'anticorps antagoniste du CD154, au moment de l'induction de la colite par l'acide trinitrobenzène sulfonique, prévient le développement de la maladie, l'infiltration des cellules T dans l'épithélium intestinal et diminue la production d'IFN- γ [176]. De même, une étude faite chez 18 patients souffrant d'une colite ulcéreuse, a montré que l'administration d'un anticorps antagoniste du

CD40 aboutit à une rémission de 22% des sujets et à une atténuation des symptômes cliniques dans 72% des cas [177].

6. L'implication du CD154/CD40 dans les maladies inflammatoires.

En plus d'être impliqué dans les maladies auto-immunes, le complexe CD154/CD40 s'est avéré être un médiateur des maladies inflammatoires comme c'est le cas pour l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une maladie vasculaire inflammatoire chronique. C'est une photologie des grandes artères, associée aux actions concomitantes des lipides et des voies inflammatoires immuno-régulées. Elle se développe généralement en réponse à l'activation de l'endothélium vasculaire et conduit à la formation d'une lésion ou plaque athérosclérotique dans la couche sous-endothéliale de la paroi vasculaire [178]. Cette lésion se caractérise par l'accumulation des cellules inflammatoires et immunitaires véhiculées par le sang (principalement des macrophages et des cellules T), ainsi que des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des lipides, des débris cellulaires et des protéines matricielles extracellulaires [179].

Les premières preuves du rôle de l'interaction CD154/CD40 dans les événements athérosclérotiques ont été fournies par des études menées chez les souris hyperlipédémiques LDLR^{-/-}, où le traitement avec des anticorps antagonistes du CD154 réduit significativement les lésions athérosclérotiques [180]. De même, une étude a démontré le développement de plaques pauvres en lipides, riches en collagène et riches en cellules musculaires lisses lors de l'administration précoce d'un traitement anti-CD154 à des souris déficientes en apolipoprotéine-E (ApoE^{-/-}) sujettes à l'athérosclérose [181]. De plus, en supprimant génétiquement le CD154 au niveau de ces souris ApoE^{-/-}, la surface de la plaque d'athérome est réduite avec une diminution de son contenu en cellules inflammatoires et en lipides et une augmentation en collagène, lui conférant la stabilité [182].

Dans les lésions athérosclérotiques, les CD154 et le CD40 sont exprimés sur la grande majorité des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et B, les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les mastocytes, ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses présentes dans la plaque. Ils sont aussi exprimés au niveau du sang périphérique à la surface des monocytes et des plaquettes [47, 183]. En outre, diverses cytokines

sont libérées des monocytes activés et des cellules T, parmi elles le TNF- α , l'IL-1, l'IL-4, l'IFN- γ , induisant une expression accrue du CD40 au niveau des cellules endothéliales [47].

Suite à l'interaction avec le CD40, le CD154 va activer les cellules endothéliales, et induit la surexpression des molécules d'adhésion vasculaire et intracellulaire (ICAM-1 et VCAM-1) et la E-sélectine. Ces cellules vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-8, l'IL-6 et la MCP-1 et induisent le recrutement des leucocytes et des cellules T vers le site inflammatoire induisant la formation et le développement de la plaque d'athérosclérose [47]. De plus, le CD154 va favoriser la formation du facteur de von Willebrand sur l'endothélium, et améliore ainsi la transmigration des leucocytes [184]. Le CD154 va stimuler aussi les macrophages à libérer plusieurs cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α ainsi que la sécrétion des métalloprotéinases matricielles contribuant à l'instabilité et la rupture de la plaque d'athérome [185].

De nombreuses études cliniques ont rapporté que les niveaux circulants du sCD154 sont significativement plus élevés chez les patients athérosclérotiques par rapport aux sujets témoins [184].

En plus de son interaction avec le CD40, la liaison du CD154 à l'intégrine $\alpha M\beta 2$ est impliquée dans l'athérogenèse. En effet, les interactions CD154/ $\alpha M\beta 2$ favorisent l'adhésion des monocytes et leur recrutement aux sites d'inflammation [33, 70]. Effectivement, dans un modèle d'athérosclérose le blocage de cette interaction par des peptides bloquants induit la réduction de la taille des lésions et augmente la teneur en collagène, stabilisant la plaque, sans compromettre l'immunité ou la thrombose médiées par l'interaction avec le CD40 [70]. Il est important de noter que le CD154, en interagissant avec l' $\alpha IIb\beta 3$ participe à l'activation plaquettaire, à la stabilisation des thrombus artériels et à la sécrétion de microparticules plaquettaires [19, 119].

7. L'implication du CD154/CD40 dans le rejet de greffe.

Des études chez des souris déficientes en CD40 ont démontré que l'interruption de la signalisation du CD40 réduit le degré du rejet, comme indiqué pour les allogreffes d'îlots pancréatiques, pour le rejet cutané et cardiaque, ainsi que pour la transplantation des splénocytes ou de la moelle osseuse [27]. Les études menées par Parker et al. ont montré qu'une transplantation de greffe d'îlots pancréatiques combinée à une administration d'un anti-CD154,

chez des souris diabétiques, empêche le rejet de greffe dans 40% des cas [186]. L'implication du CD154/CD40 dans le rejet d'allogreffes cardiaques a été mise en évidence par Larsen et al. qui ont constaté une survie prolongée de ces allogreffes chez les souris qui ont reçu un anti-CD154 avant la transplantation, en comparaison avec les souris contrôles [187].

Etant donné que l'interaction CD154/CD40 module l'activité costimulatrice, une étude a abordé cet aspect et son implication dans le rejet d'allogreffe [188]. En effet, les chercheurs ont montré qu'une seule injection d'anticorps anti-CD154 avec la transfusion des splénocytes du donneur, entraîne une survie prolongée de l'allogreffe cardiaque. Cette prolongation est associée à une inhibition des cytokines de type Th1 (IFN- γ et IL-2), à une production d'IL-12 et une augmentation des cytokines Th2 (IL-4 et IL-10) et à une perte complète de l'expression du CD80. Ces données suggèrent que le traitement avec un anti-CD154 empêche le rejet de greffe en inhibant l'induction du CD80 à la surface des CPA, affectant à la fois l'activation des lymphocytes T alloréactifs et inhibant l'activation de macrophages et autres cellules effectrices.

8. L'implication du CD154/CD40 dans le cancer.

Le cancer est caractérisé par la prolifération de cellules qui ont réussi à échapper aux mécanismes de contrôle endogène central.

Le CD40 a été identifié comme étant un marqueur de surface des cellules de carcinome de la vessie et des cellules B [189]. Son expression n'est donc pas limitée aux cellules normales, il se trouve également sur de nombreuses cellules tumorales, incluant les tumeurs malignes des cellules B et les tumeurs solides tel que c'est le cas pour les carcinomes de la vessie, du sein, du colon, de l'ovaire et du cerveau [86, 99]. Le CD40 a été signalé dans les lymphomes non hodgkiniens, les lymphomes de Hodgkin et sur d'autres tumeurs hématologiques malignes, comme la leucémie lymphocytaire, le lymphome, le myélome et la leucémie myéloïde aiguë [77].

De même, le CD154 s'est avéré être impliqué dans la pathogenèse du cancer. En effet, une surexpression du CD154 et de son récepteur, le CD40, a été identifiée dans certaines tumeurs solides et mélanomes et cette expression corrèle avec un mauvais pronostic [190, 191]. En outre, plusieurs types de cancers se caractérisent par une augmentation de la concentration du CD154 sérique. Une concentration sérique élevée du sCD154 a été détectée chez des patients souffrant

de leucémies [27, 192], chez des patients atteints du cancer des poumons [193], du cancer rénal [190] et de tumeurs ovariennes [194].

L'interaction CD154/CD40 s'est révélée à la fois promotrice et inhibitrice de la croissance tumorale selon les circonstances [195, 196] (Fig.11). En effet, l'engagement du CD40 dans certaines tumeurs malignes des cellules B entraîne une augmentation de l'expression de nombreux facteurs qui protègent la cellule de l'apoptose, tels que Bfl-1/A1 et Bcl-x, qui sont membres de la famille anti-apoptotique Bcl-2. Cette surexpression du CD40, active la voie de signalisation NF- κ B qui induit à son tour l'expression des membres de la famille Bcl-2 et protège les cellules de l'apoptose induite par Fas [197]. En 2013, une étude menée au niveau de lignées cancéreuses ovariennes et pulmonaires a montré que ces cellules expriment le CD40. La stimulation de ce CD40 avec un recombinant soluble du CD154 induit l'activation du NF- κ B dans ces cellules cancéreuses qui est dépendante de la production autocrine du TNF- α [196].

La co-expression du CD40 et du CD154 à la surface des cellules malignes leur confère des propriétés oncogènes en augmentant leur capacité proliférative et invasive et en favorisant l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur via l'interaction avec les CPA et les cellules T [113]. Dans le cas d'un carcinome rénal, cette co-expression est observée et l'engagement du CD40 par le CD154 stimule la prolifération cellulaire, la motilité et la production de la PAF, un médiateur phospholipidique de l'inflammation aux propriétés angiogéniques [190].

La stimulation du CD40 entraîne l'activation des voies PI3K et MAPK, essentielles pour contrebalancer les effets induisant l'apoptose étant donné que leur inhibition induit la mort des cellules cancéreuses, induite via le CD40 [198]. Cependant, le niveau et la durée de l'engagement du CD40 peuvent dicter l'équilibre entre la stimulation et la suppression de la croissance des cellules tumorales. En effet, il a été démontré que des faibles quantités de CD154 et de CD40 facilitent la croissance des cellules malignes et les protègent de l'apoptose, tandis que des concentrations élevées favorisent l'arrêt de la croissance [195] (Fig.11). De même, dans un modèle de leucémie lymphoblastique chronique CD154⁺, l'ajout d'un anti-CD154, bloquant l'interaction CD154/CD40, entraîne une inhibition de l'activation de la voie NF- κ B et une accélération de la mort des cellules tumorales [199]. Malgré l'association de l'expression du

CD154 à l'oncogénicité et au mauvais pronostic dans certaines tumeurs malignes, ce dernier joue un rôle dans l'immunothérapie de nombreux types de cancer [191]. La première preuve du rôle anti-tumoral du CD154 provient de la sensibilité accrue des patients souffrant du syndrome d'Hyper-IgM aux lymphomes et aux carcinomes [200]. L'importance du CD40 dans l'immunité tumorale a ensuite été démontrée dans des modèles murins de cancer, où l'administration d'un anticorps agoniste dirigé contre le CD40 a produit une immunité anti-tumorale dépendante des lymphocytes T [201, 202].

Bien que le CD40 soit dépourvu de domaines de mort, l'apoptose peut survenir via l'induction de l'expression des membres de la famille des TNF comme le TNF- α , FasL et TRAIL [203]. Ainsi, l'interaction du CD40 avec son ligand peut médier directement les effets cytotoxiques sur les cellules tumorales [57]. Ce rôle direct a été observé suite à l'administration *in-vitro* d'un recombinant soluble du CD154 au niveau de différentes lignées cellulaires du cancer. Ce sCD154 a inhibé significativement la prolifération et a induit l'apoptose des lignées cellulaires exprimant le CD40 [204]. Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que le CD154 recombinant est aussi efficace *in-vivo* dans un modèle de cancer du sein chez des souris immunodéficientes, où ce traitement entraîne une augmentation de la survie des souris receveuses [204]. De même, lors d'un traitement de mélanomes CD40⁺ avec un recombinant du sCD154, un arrêt de la croissance tumorale a eu lieu [205].

En plus, des fonctions directes contre le cancer, le CD154/CD40 possède un rôle indirect en affectant la croissance de la tumeur, par l'activation des CPA, propulsant ensuite les réponses des lymphocytes T dirigées contre les tumeurs et favorisant la mise en place d'une réponse anti-tumorale à médiation cellulaire [206]. L'effet anti-tumoral de l'interaction CD154/CD40 se manifeste premièrement par l'activation des cellules dendritiques via le CD40, suite à son engagement avec le CD154 des cellules T CD4⁺ stimulées par l'antigène, induisant ainsi la maturation des cellules dendritiques et l'amélioration de leur présentation antigénique [77]. Par la suite, ces cellules dendritiques vont activer les cellules T CD8⁺ et leurs fonctions cytotoxiques [191], ainsi que d'autres cellules effectrices anti-tumorales telles que les cellules *Natural Killers* [207, 208] (Fig.11). De plus, l'engagement du CD40 présent à la surface des monocytes et des

macrophages induit leurs activations, l'augmentation de l'expression des molécules costimulatrices et la production d'IL-12, de MCP-1 et d'IL-10 favorisant les réponses cellulaires de type Th-1 et la différenciation des monocytes en lignée M1 connue pour leurs propriétés pro-inflammatoires et anti-tumorales [209]. Au niveau des cellules endothéliales, l'interaction du CD40 avec le CD154 des cellules T induit l'expression des molécules d'adhésion, E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1, la libération de l'IL-8 et de MCP-1 permettant l'adhésion des monocytes circulants et des cellules T et le recrutement de leucocytes [191] (Fig.11). En conséquence, le CD154 stimule les cellules immunitaires induisant leur activation et migration dans le tissu tumoral afin d'éliminer les cellules cancéreuses.

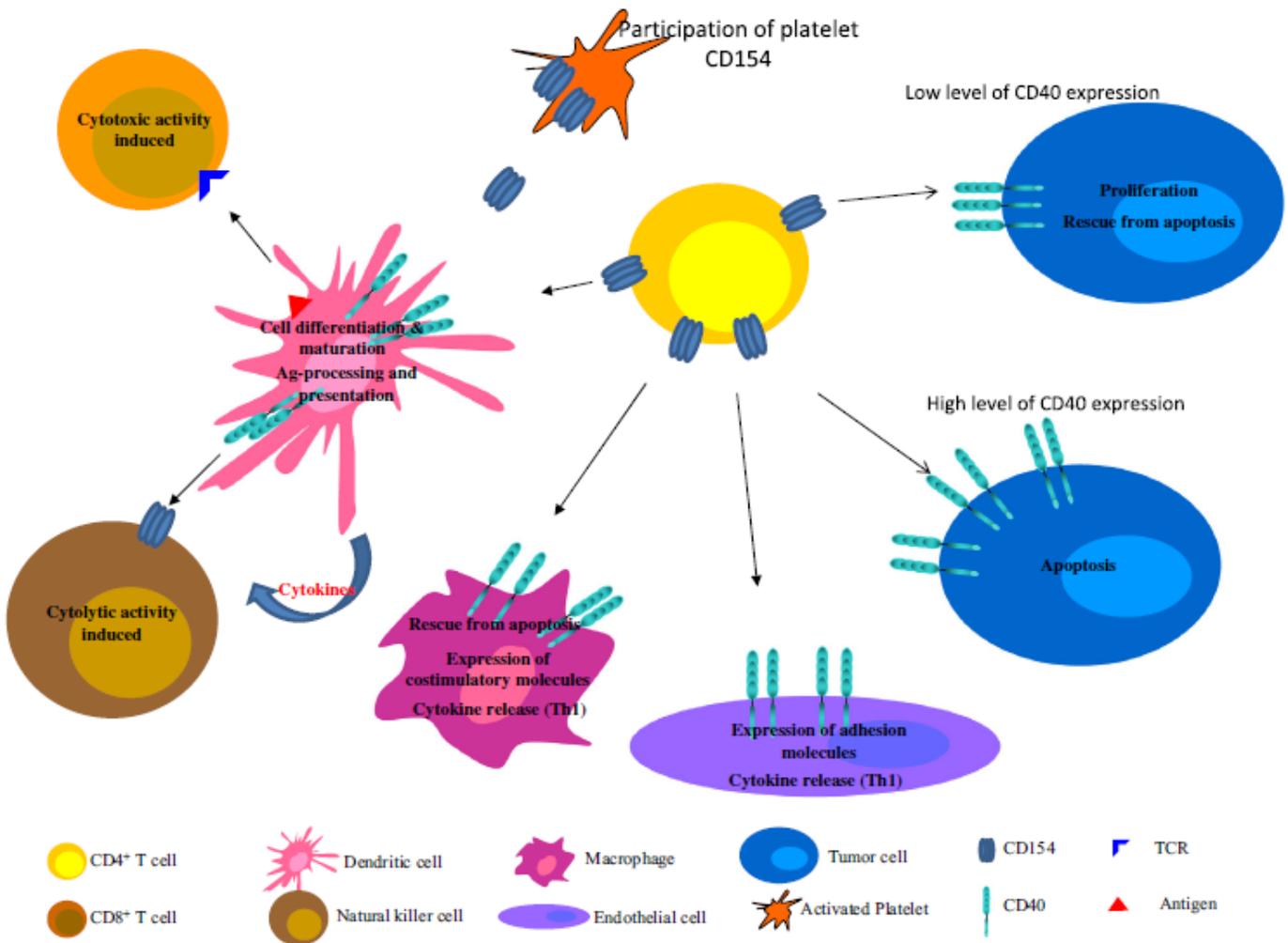


Figure 11. – Rôle du CD154 dans le développement ou l'élimination du cancer.

Le CD154 exprimé sur les cellules T CD4⁺ activées interagit avec le CD40 à la surface des cellules tumorales, induisant soit la prolifération cellulaire, soit la mort selon le niveau d'expression de CD40. Le CD154 active également les cellules dendritiques via leur CD40 qui à leur tour activent les T CD8⁺ et les cellules *Natural Killers*. CD154 interagit avec le CD40 exprimé sur les monocytes/macrophages ou sur les cellules endothéliales stimulant l'activation cellulaire et la libération de cytokines [191]. Avec autorisation du journal *Cancer Treatment Reviews*

L'activation de la voie du CD40 lors d'un cancer peut se faire principalement par trois différentes approches : en utilisant des molécules recombinantes du CD154, en administrant des adénovirus menant à l'expression du CD154 ou en utilisant des anticorps agonistes dirigés contre CD40 [210]. En effet, le traitement par des anticorps dirigé contre le CD40 chez des modèles de souris inoculées avec des lymphomes a démontré une élimination des tumeurs, l'anti-CD40 peut

imiter efficacement l'effet du CD154 et ainsi conférer des réponses immunitaires adaptatives [211]. De plus, le traitement de souris cancéreuses avec un adénovirus portant l'ADN du CD154 a entraîné une suppression de la croissance tumorale [212].

L'implication du CD154 dans l'activité anti-tumorale, n'est pas une propriété privilège au CD154 soluble ou membranaire. Les deux formes sont biologiquement actives, et plusieurs études ont montré l'efficacité du sCD154 dans le traitement de différentes tumeurs [204, 213]. Cependant son rôle pro-apoptotique *in-vitro* est considérablement amélioré suite à sa combinaison avec la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique [203]. En 2002, Bugajska et al. ont démontré que le sCD154 est capable d'inhiber la croissance des cellules urothéliales CD40⁺ mais n'induit pas l'apoptose; tandis que le CD154 membranaire, présenté à la surface cellulaire, induit l'apoptose des cellules malignes exprimant le CD40 [214]. Par la suite, les études ont confirmé que le CD154 membranaire est plus puissant que sa forme soluble [91, 114]. En effet, l'apoptose médiée par le CD154 membranaire survient directement via l'activation de JNK et AP-1, un mécanisme dépendant de TRAF-3 et de la cascade apoptotique intrinsèque, y compris les caspases 3 et 9 [91, 117]. Cette induction de la mort est indépendante des ligands et récepteurs de la mort (FasL/Fas, TRAIL/TRAIL-R, TNF/TNF-R) [91]. Elmetwali et al. en 2016, ont montré que cette mort est aussi dépendante de l'expression de *Ras-associated factor 5* (NORE1A/RASSF5) et de p21, un inhibiteur de protéines kinase [215]. Ainsi, le CD154 membranaire semble être plus attractif que le recombinant soluble.

Comme tous les membres de la famille des TNF, le CD154 est clivé de la membrane par les métalloprotéinases, et vu que le FasL résistant au clivage de la membrane cellulaire fournit un stimulus apoptotique plus puissant que sa forme naturelle, Elmetwali et al. ont généré un CD154 mutant résistant à ce clivage [114]. À la suite de son administration au niveau des cellules cancéreuses, via un adénovirus non répliquatif, ce CD154 résistant au clivage, dépourvu de la région ¹¹⁰SFEMQKG¹¹⁶, induit l'apoptose des cellules cancéreuses CD40⁺ d'une façon plus importante que celle du CD154 sous sa forme native. Récemment, en comparaison au sCD154, et suite à l'engagement du CD40 des cellules cancéreuses avec le CD154 membranaire, cette équipe a pu catégoriser une augmentation des transcrits impliqués dans des fonctions immunes et une baisse de ceux qui sont essentiels pour la prolifération et le cycle cellulaire [216]. Ils ont montré aussi

que le CD154 membranaire, en interagissant avec le CD40 des cellules dendritiques, induit des niveaux de maturation et d'activation plus importants de ces cellules, avec une production plus importante d'IL-12 et d'IL-10 et une capacité plus élevée d'absorption d'antigène par rapport à la stimulation avec le sCD154. Ces cellules dendritiques stimulées par le CD154, vont par la suite présenter l'antigène tumoral aux cellules T et initier une réponse cellulaire de type Th-1. En comparaison à la stimulation avec le sCD154, les cellules dendritiques stimulées avec le CD154 membranaire ont induit le changement de profil d'un pourcentage plus élevé de cellules T CD3⁺ en cellules T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques à la tumeur [216].

Ces résultats montrent que le CD154 membranaire possède la capacité de stimuler différentes facettes de la réponse immunitaire et d'induire directement la mort cellulaire dans les carcinomes exprimant le CD40, qui peuvent eux-mêmes libérer, dans le microenvironnement tumoral, des antigènes spécifiques des tumeurs pour améliorer les réponses immunitaires anti-tumorales (Fig.12).

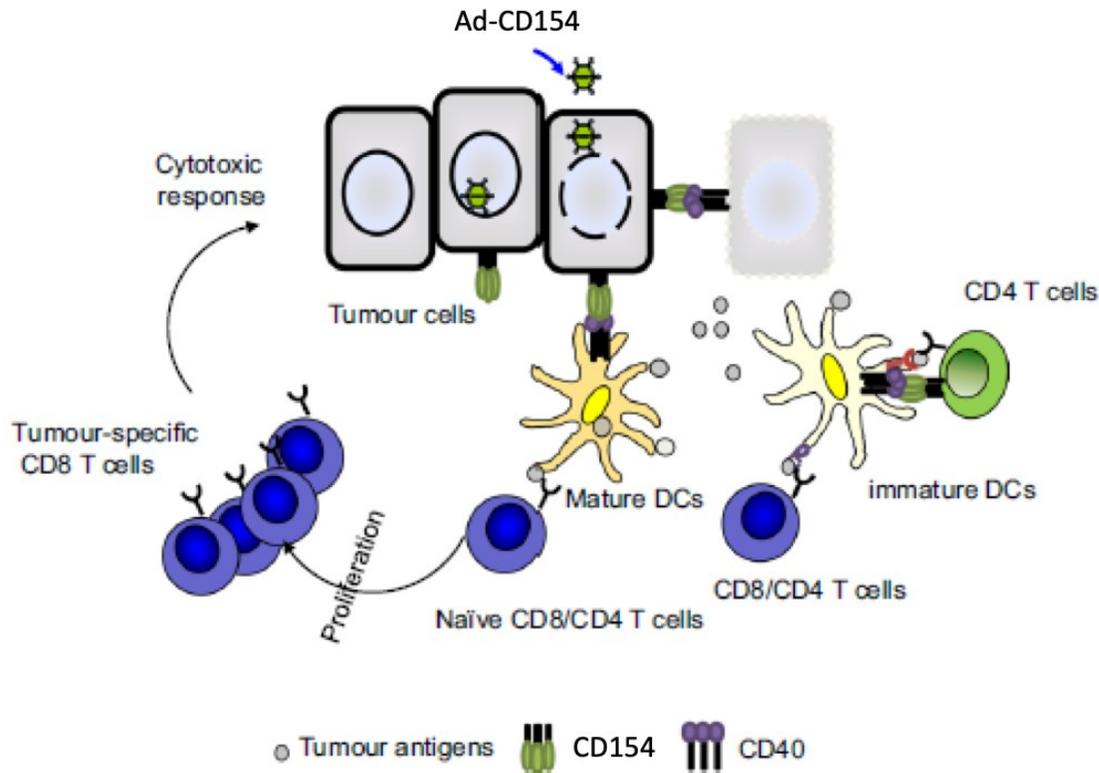


Figure 12. – Mécanismes d’action du CD154 membranaire.

Au niveau des carcinomes CD40⁺, le traitement avec le CD154 membranaire peut induire directement l’apoptose libérant des antigènes associés à la tumeur qui seront absorbés par les cellules dendritiques infiltrant la tumeur. Parallèlement le CD154 membranaire des cellules tumorales peut aussi stimuler directement ces DC pour une présentation d’antigène améliorée vers les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, favorisant leur prolifération et leurs réponses cytotoxiques spécifiques [216]. Avec autorisation du journal *Scientific Reports*

9. Le couple CD154/CD40 une cible thérapeutique.

Au cours des dernières années, il y a eu un nombre croissant d’études sur les interactions entre le système immunitaire, l’inflammation, l’athérombose et la tumorigenèse. De plus, l’implication du CD154/CD40 dans la réponse immune et son rôle dans divers contextes pathologiques ont permis la génération de plusieurs molécules ciblant cette voie et ont été évaluées en milieu clinique.

En effet, dans des modèles animaux le développement de différentes maladies telles l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et le lupus, le blocage de la voie CD154/CD40 avec un anticorps dirigé contre le CD154 ou le CD40, atténue considérablement les symptômes cliniques et permet le rétablissement. Cependant, malgré les résultats prometteurs de ces approches thérapeutiques dans des modèles de souris, son utilisation chez l'Homme à mener au développement de complication thromboembolique [217]. La raison de ces complications dépend des récepteurs Fc(γ) qui sont exprimés au niveau des plaquettes humaines et non au niveau des plaquettes murines [218]. Ainsi, comme le CD154 est exprimé sur les plaquettes activées, l'administration d'un anti-CD154 pourrait engager les récepteurs Fc(γ) exprimés sur la même plaquette ou sur les plaquettes adjacentes provoquant l'agrégation plaquettaire [118, 219].

Le 5C8 humanisé, ou Rupilizumab, un anticorps (IgG1) anti CD154 est parmi les premiers anticorps utilisés pour bloquer l'interaction CD154/CD40. Dans une étude clinique de phase II, l'administration de cet anticorps chez des patients lupiques entraîne une atténuation de complications pathologiques telles qu'une diminution des auto-anticorps de type auto-ADN et la réduction de l'hématurie [220]. Cependant cette étude a été interrompue en raison d'évènements thromboemboliques.

Le Toralizumab, un autre anticorps de la même classe dirigé contre le CD154 a été utilisé dans des essais cliniques sur des patients souffrant de lupus, de sclérose en plaques et de la maladie de Crohn. Le traitement avec cet anticorps n'a pas montré un avantage clinique significatif par rapport au placebo [221] et une apparition de complication thromboembolique a été observée chez les patients souffrant de la maladie de Crohn [217].

Un troisième anticorps, IgG1, dirigé contre un épitope différent que celui des deux autres anticorps a été testé dans des modèles de transplantation. Bien que son administration ait démontré une activité dans la prolongation de la survie de l'allogreffe et une suppression de la production d'anticorps par les receveurs, son utilisation a été arrêtée suite aux complications thromboemboliques [217].

Étant donné que ces trois anticorps appartiennent à la sous classe des IgG1, ces complications peuvent être un effet de la sous classe des immunoglobulines et n'ont aucun lien avec la spécificité des épitopes.

Afin d'éviter les complications associées aux anticorps, un certain nombre d'approches alternatives, pour bloquer l'interaction CD154/CD40, a été développé et examiné. Une possibilité consiste à concevoir des anticorps qui ne lient pas les récepteurs Fc(γ) tout en fournissant une puissante activité immunosuppressive. En effet, le développement d'anticorps avec une capacité réduite de lier le récepteur Fc(γ) [219, 222, 223], a prolongé la survie et a réduit la production d'autoanticorps dans des modèles de souris lupiques, a soulagé les symptômes de EAE et a prolongé la survie de l'allogreffe sans aucun signe de thromboembolie.

Une deuxième alternative était la génération d'anticorps composés du fragment Fab, dépourvus donc du fragment Fc, conjugués au polyéthylène glycol. Ces anticorps ont atténué les symptômes chez les souris lupiques et ont inhibé les réponses immunitaires spécifiques aux toxines de Tétanos chez les singes [224].

L'utilisation d'anticorps dirigés contre le CD40, plutôt que CD154, constitue une troisième alternative prometteuse. Parmi ces anticorps, citons un antagoniste du CD40 avec le domaine Fc modifié pouvant bloquer l'interaction du CD40 avec le CD154. Cet anticorps a aboli la production d'anticorps et induit la survie de l'allogreffe suite à une transplantation, atténué les symptômes chez les patients atteints de Sjögren et de RA [103].

En plus de l'utilisation de ces anticorps bloquants, l'utilisation de *small molecule* [225], d'agents bloquants les voies de signalisation du CD154 ou du CD40 peuvent être administrés afin de bloquer les réponses induites suite à cette interaction [103].

Dans le cas du cancer, plusieurs agonistes du CD40 sont utilisés afin d'activer la voie du CD40, soit par la stimulation avec un recombinant du CD154, soit par la thérapie génique du CD154, soit en administrant des anticorps agonistes dirigés contre le CD40. Chaque stratégie a produit une activité clinique prometteuse dans les études cliniques. En effet, l'utilisation d'un recombinant du CD154 améliore l'expression des molécules costimulatrices et des cytokines pro-inflammatoires, délivre des signaux inhibiteurs de la prolifération aux lignées cellulaires

cancéreuses et fait preuve d'activité anti-tumorale [226, 227]. Le traitement avec des anticorps agonistes du CD40 peut imiter efficacement l'effet du CD154 et ainsi conférer les réponses immunitaires adaptatives, activant les CPA et favorisant les réponses cellulaires anti-cancéreuses [228]. Chez des patients atteints de carcinome de la vessie, l'administration locale d'un adénovirus/CD154, limite l'exposition au CD154, stimule l'infiltration des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, augmente la production d'IFN- γ , d'IL-10, diminue le nombre de cellules T régulatrices et induit la mort des cellules urothéliales malignes exprimant le CD40 [229]. De plus, plusieurs études utilisant un adénovirus contenant un CD154 mutant, non clivable, dans des lignées cellulaires cancéreuses ont prouvé que cette thérapie avait des effets antiprolifératifs plus efficaces que la forme native et non toxiques [114, 216, 230].

Chaque stratégie produit donc une activité clinique prometteuse afin de combattre le développement et la progression d'une tumeur.

Chapitre 2 –L’hypothèse et les objectifs du travail.

En plus de son implication dans la réponse immune normale, plusieurs études ont démontré que l’interaction du CD154 avec le CD40 est impliquée dans le développement et la progression des maladies inflammatoires et auto-immunes. En effet, une augmentation de l’expression du CD40 et du CD154 a été observée chez les patients souffrant des complications cardiovasculaires [231], de l’arthrite rhumatoïde [149], du lupus érythémateux disséminé et de la sclérose en plaques [165]. De plus, une concentration élevée du sCD154 a été détectée dans le sérum des patients atteints de ces différentes pathologies. Le CD154 s’est avéré dans plusieurs études comme cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de ces maladies.

Il est intéressant de noter que le CD154 possède aussi une activité anti tumorale pouvant mener au contrôle de la croissance de la tumeur [191]. Cependant, les études ont montré que le CD154 membranaire est capable d’induire des réponses apoptotiques plus importantes que la forme soluble de la molécule dans les cellules CD40-positives [91, 198]. Par conséquent, l’inhibition du clivage du CD154 pourrait être efficace dans le traitement de ces maladies.

Ces observations nous ont sollicités à développer des outils afin d’inhiber le clivage du CD154, augmentant ainsi sa disponibilité à la surface cellulaire et sa puissance à stimuler les cellules CD40-positives.

Dans le but de définir l’importance du CD154 membranaire, nous avons émis comme Hypothèse que ***L’inhibition du clivage du CD154 de la surface cellulaire augmente ses fonctions immunitaires.***

Afin de confirmer notre hypothèse nos objectifs sont :

1. Générer un CD154 mutant résistant au clivage enzymatique et étudier le rôle biologique de l’inhibition du clivage du CD154.
2. Générer des anticorps monoclonaux capables d’inhiber le clivage du CD154 membranaire.
3. Étudier l’effet biologique du Clone 8 et sa capacité de lier l’espèce murine.

Chapitre 3 – L’inhibition du clivage du CD154 augmente ses fonctions immunitaires

1. Mise en contexte.

Plusieurs études ont démontré que l’interaction du CD154 avec le CD40 joue un rôle important dans le développement et la progression des maladies inflammatoires et auto-immunes. Il est aussi bien documenté que le CD154 membranaire et le sCD154 sont élevés chez les patients atteints par ces maladies. Bien qu’ils soient tous deux biologiquement actifs [232], il existe des preuves montrant que le CD154 membranaire possède une activité stimulatrice plus élevée que sa forme soluble [114]. Elmetwali et al. ont rapporté que le CD154 membranaire est capable d’induire l’apoptose des cellules urothéliales malignes CD40⁺ tandis que le sCD154 nécessite la présence d’autres signaux de mort [214]. Récemment, ils ont aussi prouvé que la génération d’un CD154 résistant au clivage, dépourvu de la région de clivage ¹¹⁰SFEMQKG¹¹⁶, augmente ses fonctions biologiques comparé à celles d’un CD154- wild-type (wt) [114, 233, 234]. Cependant, des études ultérieures menée par Pietravalle et al. montrent que la génération d’un CD154 résistant au clivage, où une délétion de 12 acides aminés a été effectuée, provoque une prolifération des cellules B comparable à celle induite par un CD154-wt [235]. Il est donc fort possible que la contradiction observée soit due au nombre d’acides aminés supprimé, qui peut probablement changer l’affinité de la liaison du CD154 au CD40.

Ces données ci haut nous ont sollicités à développer un CD154 résistant au clivage ciblant uniquement les deux acides aminés constituant le site de clivage du CD154.

2. Contribution des co-auteurs.

Suzanne Salti: Planification et exécution des expériences. Rédaction et correction de l'article.

Loubna Al-Zoobi: Participation à la réalisation de certaines expériences et à la rédaction de l'article.

Youssef Darif: Génération des cellules HEK-293 exprimant les différentes mutations du CD154.

Ghada S. Hassan: Planification des expériences et correction de l'article.

Walid Mourad: Planification des expériences, analyse des résultats et correction de l'article.

3. Résumé.

En plus du CD154 membranaire, le CD154 existe également sous une forme soluble provenant d'un clivage intracellulaire et membranaire. Nous avons déjà montré que le clivage du CD154 de la surface des cellules T est médié par le CD40 impliquant l'action des métalloprotéinases ADAM10/ADAM17.

Dans le but de définir l'importance du CD154 maintenu à la surface cellulaire, nous avons généré un CD154 muté au niveau du site de clivage. Nos données montrent que la double mutation des résidus E112 et M113 du CD154 abolit sa libération spontanée du milieu intracellulaire ainsi que son clivage de la membrane médié par le CD40 sans affecter sa liaison au CD40. Nous avons également démontré que la libération du CD154 du milieu intracellulaire, comme son clivage membranaire, dépend fortement des enzymes ADAM10/ADAM17. Le mutant CD154-EM s'est avéré capable d'induire une réponse apoptotique plus importante des cellules B que le CD154 sous sa forme native (CD154-WT). De plus, le CD154-EM induit des réponses prolifératives plus prononcées et déclenche la différenciation des cellules B humaines d'une manière plus significative que le CD154-WT. Ainsi, nos données suggèrent que le CD154 résistant au clivage est un stimulant plus important que sa forme clivable. Par conséquent, une expression maintenue du CD154 au niveau de la membrane cellulaire et un clivage perturbé de la molécule

pourraient être un mécanisme par lequel le CD154 est impliqué dans certaines conditions pathologiques et devrait être revisité.

Article 1: CD154 resistant to cleavage from intracellular milieu and cell surface induces more potent CD40-mediated responses.

Suzanne Salti¹, Loubna Al-Zoobi¹, Youssef Darif¹, Ghada S. Hassan¹ and Walid Mourad^{1†}.

Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada.

† To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Room 10-482, Montréal, Qc, Canada, H2X 0A9; Tel: 514-890-8000 Ext: 35287; Fax: 514-412-7314; E-mail: mw.mourad@umontreal.ca

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada

Running title: Higher potency of cleavage-resistant CD154

Abbreviations: TNF, tumor necrosis factor; sCD154, soluble CD154; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase.

Article publié dans *The Journal of Immunology* March 24, 2021, ji2001340.

DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001340>

Abstract

In addition to the membrane-bound form, CD154 also exists as a soluble molecule originating from an intracellular and membrane cleavage. We have previously shown that CD154 cleavage from T cell surface is mediated by CD40 and involves the action of ADAM10/ADAM17 enzymes. In the aim of defining the importance of CD154 maintained on cell surface, we generated a CD154 mutated at the cleavage site. Our data show that the double mutation of E112 and M113 residues of CD154 abolishes its spontaneous release and the CD40-mediated cleavage from cell surface but does not affect its binding to CD40. We also demonstrated that both the release of CD154 from the intracellular milieu and its CD40-mediated cleavage from cell surface are highly dependent on ADAM10/ADAM17 enzymes. The CD154-EM mutant was shown capable of inducing a more prominent apoptotic response in susceptible B cell lines than the wild-type form of the molecule. In addition, human B cells cultured in the presence of the CD154-EM mutant exhibited upregulated proliferative responses compared to the CD154-WT. The CD154-EM mutant was also shown to trigger differentiation of human B cells, reflected by an increased Ig production, more significantly than CD154-WT. Thus, our data strongly suggest that cleavage-resistant CD154 is a more prominent stimulant than the cleavable form of the molecule. Therefore, a maintained expression of CD154 on cell membrane and a disturbed cleavage of the molecule could be a mechanism by which CD154 is involved in some pathological conditions and should be revisited.

Key points:

- CD154-EM mutant is resistant to the spontaneous and induced cleavage from T cells.
- Spontaneous and induced cleavage of CD154 from T cells is mediated by ADAM10/ADAM17.
- The cleavage-resistant CD154 is a more prominent stimulant than cleavable CD154-WT.

Introduction.

CD154, also known as CD40 ligand (CD40L), is a 33-39 kDa type II transmembrane protein that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. It was initially identified on activated T cells (1), but it is evident now that CD154 is expressed on various cells of the immune system such as activated platelets, basophils, mast cells and others (2). The classical receptor of CD154, CD40, is a type I glycoprotein belonging to the TNF receptor family (3) expressed by many immune and non-immune cells, including B cells, macrophages, dendritic cells, endothelial cells and fibroblasts. The CD154/CD40 interaction is critical for B cell survival, proliferation, Ig isotype switching, germinal center formation and memory cell generation and for the activation and differentiation of other immune cells and their production of cytokines and chemokines (4). In addition to its classical receptor, CD154 was reported to bind to four other receptors that all belong to the integrin superfamily: α IIb β 3 (5), α 5 β 1 (6), α M β 2 integrin (7) and α v β 3 (8). The interaction of CD154 with all its receptors was shown to be implicated in immune and inflammatory responses (9).

In addition to the transmembrane molecule, CD154 also exists in a soluble form (sCD154) of 18 kDa compensating residues 113-261 (10). Soluble CD154 originates in part from an intracellular processing in microsomes via a poorly understood mechanism (10, 11), and from enzymatic cleavage of the transmembrane molecule from T cell surface (12). We have reported that only CD40 was capable of inducing CD154 cleavage from T cell surface in a process mediated by the activation of membrane proteinases, namely the A disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 (12). Both soluble and membrane-bound forms of CD154 occur as non-covalently-linked homotrimers (13), a property conveying to CD154 its biological activity (14). Several studies have highlighted the increased level of sCD154 in the plasma of patients with atherosclerosis, acute coronary syndrome and autoimmune diseases, indicating that sCD154 can contribute to a variety of systemic inflammatory responses (15-17).

It was initially suggested that the release of sCD154 is a way of terminating the process of cell activation triggered by the CD154/CD40 interaction during cell/cell contact. Various studies have thus compared the biological function of sCD154 as compared to its membrane-bound

counterpart. In this matter, Pietravalle et al. have demonstrated using a cleavage-resistant CD154 mutant generated by deletion of 12 amino acids around the CD154 cleavage site, that both the uncleavable mutant and the wild-type (WT) forms of CD154 are capable of inducing similar patterns of B cell proliferation and IgE synthesis (18). In the same line of evidence, a cleavage-resistant CD154 mutant generated by substituting six amino acids after the Methionine at position 113 triggered similar levels of adhesion and activation markers in transfected neoplastic B cells as did the WT form of CD154 (19). However, other studies have demonstrated that the membrane-bound form of CD154 was capable of inducing apoptosis of malignant cells while sCD154 could only induce a similar response in the presence of inhibitors of the MAPKs cascade or of protein synthesis (20). In addition, it was shown by Elmetwali et al. that a CD154 maintained on cell surface induces apoptosis of malignant urothelial cells in a TRAF3/JNK- and caspase-dependent mechanism (21) or by upregulating the Ras-associated factor 5 (NORE1A/RASSF5) and subsequently the gene suppressor p21, signals absent upon cell activation with the soluble form of CD154 (22). Nevertheless, the physiological impact of the process of CD154 release from the cell is still unclear, and so is the biological importance of having and/or maintaining the molecule on cell surface by inhibiting its cleavage.

In the aim of further understanding the mechanism involved in the process of CD154 cleavage and the implications of its disturbance in a biological context, we have generated a cleavage-resistant CD154 by a substitution residues E112 and M113 by Alanine, the smallest and neutral amino acid, and assessed its biological activities in B cells. Here we show that both residues are required for the release of CD154 from the intracellular milieu and for its cleavage from cell surface and that ADAM10 and ADAM17 metalloproteinases are involved in the spontaneous release and the CD40-induced cleavage of CD154. CD154 resistant to cleavage which maintains the ability to bind to CD40, induces a more pronounced cell death response, a prominent B cell proliferation and an upregulated Igs production in comparison to a cleavable form of CD154.

Materials and Methods

Cells

Human embryonic kidney cells (HEK 293), the murine B-cell lymphoma cell line (A20) and the human B cell line (Ramos) from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in RPMI supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% L-glutamine, penicillin, and streptomycin (PSG, Life Technologies, GIBCO, Burlington, ON, Canada). A20 transfected with human CD40 (A20-hCD40WT) and A20 Vector (A20 vect) were generated and maintained with a selective agent (Hygromycin 300µg/ml) as described before (23).

Plasmids and mutagenesis

Human CD154-WT were generated previously in our laboratory by using the plasmid pCDNA4-TO-myc-HisA Zeocin (Invitrogen) (23). Human CD154-E112, CD154-M113, CD154-EM and CD154-RY were generated using the primers in Table 1 and the QuickChange directed mutagenesis kit. Human CD154-EM and CD154-RY were generated in two steps, first we generated a CD154-R203 or CD154-E112 then these latter were used respectively to generate the double mutated CD154-RY or CD154-EM. HEK 293 cells, stably transfected with the CD154-WT, an empty vector and mutants, were generated by the method of calcium phosphate. Cells expressing comparable levels of CD154 were sorted using anti-CD154 mAb (Clone 4) and maintained in medium containing 100 µg/ml of the selective agent Zeocin (InvivoGen).

Antibodies and Reagents

The monoclonal antibody 5C8 against human CD154 and the anti-CD40 hybridoma G28.5 (IgG1) was obtained from ATCC. Clone 4, shown to recognize all CD154 mutants (manuscript In Preparation), the isotype controls anti-TSST-1 mAb2H8 (IgG1) and anti-SEB mAb-8C12 (IgG2a) were developed in our laboratory. Polyclonal antibodies raised against ERK1/2 (phosphorylated and total forms) were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), GI254023X (GI25) were obtained

from sigma-Aldrich. TAPI-2 was purchased from Calbiochem. Human soluble CD40 encompassing residues E21-R193 of the extracellular domain of CD40 without (sCD40) with or without human Fc (sCD40-Fc) were generated and purified as we described previously (24). Biotin-labelled 5C8 and sCD40 were prepared using the method provided by Pierce (Rockford, IL, USA).

Western Blot

To measure the signal pathway through CD154-WT and mutant, HEK transfected cells were incubated in serum-free DMEM for 2 h at 37°C, and then stimulated with different concentration of sCD40-Fc (31.2, 62.5, 125 and 250 ng/100µl) for 2 and 5 min or with hIgG (125 and 250 ng/100µl) as a negative control. The stimulation was stopped by the addition of hot 2X SDS sample buffer containing β-Mercaptoethanol (Invitrogen), protease inhibitors, phosphatase inhibitors (Sigma) and orthovanadate. All these samples were then heated for 5 min at 95°C, separated through a 12% SDS-PAGE gel under reducing conditions and proteins were transferred to PVDF membrane (Biorad). Membranes were then blocked in 5% milk-TBS for 60 min at room temperature and incubated with indicated primary antibodies (anti-P-ERK1/2 Ab, diluted at 1:1000 overnight at 4°C). Next, membranes were washed 3 times with 1X TBS+0.1% Tween-20, and incubated with HRP-conjugated secondary antibody (against rabbit in the case of the anti-P-ERK Ab as the 1^o Ab) for 60 min. Finally, proteins were revealed using enhanced chemiluminescence (PerkinElmer, MA, USA). Membranes of the P-ERK Ab were stripped using the re-blot solution and re-incubated with antibodies against total ERK1/2.

Cell stimulation for assessing CD154 cleavage

HEK 293 CD154-transfected (10^6 cells/ml) were either co-cultured with A20 hCD40WT or A20 Vector cells as a control (10^6 cells/ml) for 1h at 37°C. CD154 cleavage was then measured by determining the residual cell surface expression using FACS analysis and the sCD154 in the supernatants using ELISA as described in the datasheet (R&D, Minneapolis, USA).

To assess the implication of ADAM10 and 17 in the cleavage of CD154, HEK 293 stably transfected with CD154-WT were treated or not with ADAM10 inhibitor, GI25 (50µM), or ADAM17 inhibitor,

TAPI-2 (150 μ M), for 1 hour at 37°C. These cells were then cultured alone or co-cultured with A20 hCD40-WT or A20 Vector as a control, as described before, for another 1 hour at 37°C. Cells were recuperated, washed and incubated with mAbs 5C8-B for 30min at 4°C followed by the streptavidin-Alexa 488. The expression of CD154 on cell surface was analyzed by FACS and supernatants sCD154 by ELISA.

Cell stimulation for assessing Cell death

Ramos cells, non-treated or treated with PMA (0.06ng/ml) for 24 hours at 37°C, were washed and incubated with HEK 293 CD154 cells for 24 hours at 37°C, HEK 293 vector were used as a control. HEK 293 cells have been previously allowed to adhere for 3 hours at 37°C in flat-bottomed 96-well plate. The ratio used in this co-culture is 1:10, one HEK 293 cell for 10 Ramos cells treated or not with PMA. Ramos cell death was evaluated by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide (Invitrogen, Burlington, ON) staining.

Cytometric analysis

The expression of CD154 on HEK 293 cells transfected with human CD154-WT and mutant was examined with a biotin-conjugated 5C8 mAb for 30 min on ice, followed by streptavidin-Alexa488 (Invitrogen). To determine the ability of CD154 wild-type and mutants to bind sCD40, HEK 293 transfected cells were incubated with biotin-conjugated sCD40 at different concentrations for 30 min on ice, followed by Streptavidin-Alexa488 (Invitrogen). The KD was determined as previously described (25). The expression of CD40 on Ramos was evaluated with G28.5 mAb for 30 min on ice, followed by Goat-antiMouse-Alexa488. After washing with PBS 2% FBS, immunofluorescence intensity was detected using FACS-Calibur flow cytometry.

B cell proliferation and differentiation

Cell proliferation was assessed using CFSE staining and cell differentiation was evaluated by determining the Ig production in B cells purified from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Briefly, blood was withdrawn in acid/citrate/dextrose-anticoagulated tubes from donors who gave their written consent according to the guidelines established by the CR-CHUM ethical

committee. PBMCs were obtained from Ficoll separation gradient (Wisent). B cells were separated from PBMCs using the EasySep™ Human B Cell Isolation Kit (STEMCELL) by negative selection. B cells at a concentration of 10^6 cells/ml were then labeled with 1 μ M of CFSE for 15 min, washed and incubated with irradiated and adherent HEK 293-hCD154 for 1, 2, 3, 4, 5 and 10 days at a ratio of 1:10 (20 000 HEK 293 for 200 000 B cells). B cell proliferation was evaluated by FACS and by microscopy. The IgG, IgM and IgA production, on day 10, was evaluated in cell supernatants by ELISA (kits provided from Thermo Fisher, USA).

Results

Substitution of both residues E112 and M113 by Alanine abolished the spontaneous release of sCD154.

Soluble CD154 can be derived from intracellular compartment and from a membrane cleavage. Although mechanisms mediating the release of CD154 from the intracellular milieu are poorly understood, its cleavage from cell surface was shown to be mediated by CD40 and to involve activation of ADAM10 and ADAM17 metalloproteinases, cleaving CD154 between glutamic acid 112 (E112) and Methionine 113 (M113) thus releasing sCD154, an 18 KDa fragment (12). We hypothesize that these same residues and same metalloproteinases are involved in the CD154 release from the intracellular compartment. To investigate our hypothesis, we undertook mutations involving E112 and M113, substituting each or both of them with alanine (A). HEK 293 cells were then transfected with CD154-E112, CD154-M113, CD154-EM, CD154-WT, CD154-R/Y (a CD154 mutated at R203 and Y145 and that lost its capacity to interact with CD40 (26)) or with empty vector. Stably transfected HEK 293 cells expressing similar levels of CD154 on cell surface were sorted and maintained under selective conditions (Fig. 1A).

We next evaluated the spontaneous release of sCD154 from HEK 293 cells transfected with CD154-WT and the mutants described above. Sorted cells were cultured over a period of 24 hrs and their supernatants were analyzed for levels of sCD154 by ELISA. Our data show that levels of sCD154 released in the supernatants of cells transfected with CD154-E112, CD154-M113 or CD154-R/Y mutants were similar to those detected in supernatants of CD154-WT-transfected cells (Fig 1B). However, no detectable sCD154 was observed in the supernatant of cells transfected with the CD154 double mutant, CD154-EM. Taken together, these results indicate that these two residues, E112 and M113, are absolutely required for the spontaneous release of CD154.

CD154-EM mutant maintains its ability to bind to CD40

Before evaluating the biological activity of our CD154-EM mutant, we have to first confirm that this mutant maintains its ability to bind to sCD40. For this purpose, transfected HEK 293 cells were incubated with different concentrations of biotin-labeled sCD40 for 30 min at 4°C. Washed cells were then incubated with streptavidin-Alexa 488 and analyzed by Flow cytometry. As shown in Fig. 2A, sCD40 is capable of binding to CD154-WT-expressing cells as well as to cells transfected with CD154-EM in a similar fashion. Such experiments allowed us to determine the KD of both forms of CD154 and to conclude that they have similar affinities (5.3 nM) toward the receptor CD40 (Fig. 2B). These data demonstrate that the CD154-EM mutant did not lose the capacity to bind CD40 and that the EM/AA mutation did not induce any conformational change in the CD154 molecule that would affect its binding to CD40. Such conclusion is supported by the fact that the mutation in CD154-EM is located very distally from the CD154 residues implicated in the interaction of the ligand with CD40. Cells transfected with the CD154-R/Y mutant were used as a negative control, since such mutant has lost its capacity to interact with CD40 (26).

CD154-EM mutant maintains its ability to trigger an intracellular signal in CD154-positive cells.

Having demonstrated that our CD154-EM mutant is resistant to the release from intracellular milieu while still capable of binding to sCD40, we aimed next at evaluating if such mutant maintains its capacity to transduce an intracellular signal upon its interaction with CD40 (24). HEK 293 cells transfected with CD154-WT, with CD154-EM or with CD154-R/Y were stimulated with different concentrations of the sCD40-Fc (a more stable and active form of sCD40) or hIgG for 2 or 5 min. As shown in Fig. 3, CD40 was capable of interacting with CD154-WT and CD154-EM, inducing comparable levels of ERK phosphorylation in the respective transfected cells. However, CD154-R/Y-expressing HEK 293 cells failed to exhibit any response when stimulated with sCD40-Fc. These results indicate that CD154-EM mutant maintained the capacity of transducing intracellular signaling in CD154-positive cells upon its binding to CD40 as does CD154-WT. Such observation further support our data above showing comparable affinities of CD154-WT and CD154-EM toward CD40.

CD154-EM mutant is resistant to CD40-induced cleavage from cell membrane

Next, we evaluated the capacity of our CD154-EM mutant to be cleaved from the surface of transfected cells upon their stimulation with CD40 using A20 cells transfected with empty vector (A20 Vector) or with human CD40 (A20 hCD40-WT) (Fig. 4A). In the first set of experiments, transfected HEK 293 were co-cultured with A20 Vector or A20 hCD40-WT cells for 1 hour at 37°C. Transfected HEK 293 cells were analyzed for the level of CD154 expression on their surface before and after CD40 stimulation. As shown in Fig. 4B, HEK 293 cells transfected with CD154-EM, did not exhibit any decrease in their surface expression of CD154 when co-cultured with A20 hCD40-WT cells as compared to when co-cultured with A20 Vector cells. On the other hand, CD154-WT-transfected HEK 293 cells showed, in the presence of CD40-expressing A20 cells, a lower level of CD154 expressed on cell surface as compared to when in the presence of A20 Vector cells.

To confirm that the CD154-EM mutant is indeed resistant to CD40-mediated cleavage as shown in the flow cytometry experiments, supernatants of the above co-cultured cells were analyzed by ELISA (Fig. 4C). Results show that HEK 293 transfected with CD154-EM failed to shed sCD154 in their supernatants when cultured with A20 hCD40-WT cells. On the other hand, CD154-WT-expressing HEK 293 cells released sCD154 in their supernatants upon their co-culturing with CD40-transfected A20 cells, 20 x more than the CD154-EM cells. These data suggest that substitution of residues EM by AA abrogated the capacity of CD154 to be cleaved from cell surface upon its ligation to CD40.

Taken together, these results indicate that mutating the EM residues of CD154 significantly attenuated its capacity to be cleaved from cell surface and that our CD154-EM mutant is indeed resistant to CD40-induced cleavage.

ADAM10 and ADAM17 are required for the spontaneous release of CD154 from the intracellular milieu and for its CD40-mediated cleavage from cell surface

As mentioned above, we recently reported that the cleavage of CD154 from cell surface of Jurkat E6.1 T cells is induced by CD40 and is ADAM10- and ADAM17-dependent (12).

Interestingly, and based on the above data showing that the spontaneous release of CD154 from the intracellular milieu and its CD40-induced cleavage from cell surface are completely abolished when residues EM were substituted by A, we strongly believe that both processes are mediated by the same proteases. To verify our hypothesis, HEK 293 cells expressing CD154-WT were treated with inhibitors of ADAM10 (GI25, (27)) and of ADAM17 (TAPI-2), and then incubated with A20 cells expressing human CD40 for 1 hr. We then evaluated the expression level of membrane-bound CD154 using FACS and the concentration of sCD154 in cell supernatants using ELISA. As shown in Fig. 5, treatment of cells with GI25, TAPI-2 or a combination of both inhibited the CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface (panel A showing the effect of GI25 and TAPI-2 on the expression of CD154 on cell surface and panel B showing the effect of these inhibitors on the level of CD154 in the culture supernatants). Fig. 5B additionally demonstrates that GI25 and TAPI-2 also blocked the spontaneous release of CD154 from intracellular milieu (in HEK 293 cells incubated alone or in the presence of empty vector-transfected A20 cells). Taken together, these data highly suggest that both the CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface and its spontaneous release from the intracellular milieu are dependent on the activity of the ADAM10 and ADAM17 metalloproteinases of CD154-positive cells. It is important to mention at this point that in spite the finding reported above, the ADAM10/17 expressed on CD40-positive cells (APCs, B cells...) could be also implicated in the process of CD154 cleavage, however such investigation is beyond the scope of our present study and could be visited in future ones investigating the role of the ADAM10/17 metalloproteinases in B cell function.

CD154-EM induces apoptosis in CD40-positive lymphoma B cells

In spite the fact that both the membrane-bound and the soluble forms of CD154 are biologically active, evidence exists demonstrating the higher potency of the CD154 expressed on cell surface as a stimulant (20). Thus, having demonstrated the resistance of our CD154-EM mutant to cleavage and its increased persistence on cell surface, we aim here at assessing the biological importance of this CD154 mutant as a stimulant of CD40. As mentioned above, various studies have shown that CD40 plays a direct role in inducing the death and/or inhibiting the proliferation of tumor cells (28-31). In this matter, we have previously demonstrated that CD154

interacting with its receptor CD40 induces apoptosis in a variety of B cell lines (32), but mainly observed in Ramos B cells transformed with Epstein-Barr virus (33, 34). Ramos cells, an immature line of B cells, respond to the cell death signal induced by CD154 via its CD40 receptor only when cells are pre-activated with PMA and thus overexpressing CD40 on their cell surface (34). Thus, in the first set of experiments, we treated Ramos cells with PMA to upregulate their surface expression of CD40. Expression of CD40 on their surfaces was examined by flow cytometry (Fig. 6A). These cells were then co-cultured with HEK 293 hCD154-WT, hCD154-EM or HEK 293-vector cells for another 24 hours. Ramos cells were then labeled with propidium iodide (PI) for cell death assessment by flow cytometry. As shown in Fig. 6B, PMA-pretreated Ramos B cells co-cultured with HEK 293 hCD154-EM cells were more susceptible to cell death compared to cells cultured with CD154-WT-transfected HEK 293. It is to note that Ramos cells did not exhibit any significant cell death response when cultured in the presence of HEK 293 cells transfected with empty vector (Fig. 6B).

These data indicate that the cleavage-resistant CD154-EM mutant, exhibiting a maintained expression on cell surface, induces a more pronounced death response in CD40-positive B cell lines as compared to the CD154-WT cleavable form of the molecule.

CD154-EM induces prominent B cell proliferation

In the next set of experiments aiming at evaluating the biological importance of the CD154-EM mutant maintained on cell surface, we evaluated the role of this cleavage-resistant CD154 in B cell proliferation. For this purpose, we irradiated HEK 293 cells transfected with CD154 in B cell proliferation. For this purpose, we irradiated HEK 293 cells transfected with CD154-WT, CD154 mutants or empty vector and allowed them to adhere in a 96 well plate. Human B cells isolated from PBMCs, were labeled with CFSE and co-cultured with the irradiated HEK 293 for different time periods (1, 2, 3, 4 and 5 days). Cells were then collected and CFSE labeling was analyzed by flow cytometry. As shown in Fig. 7A, B cells proliferated after 4-5 days co-culture time and were identified by low CFSE staining. B cells incubated with HEK 293 hCD154-EM cells exhibited a more pronounced proliferation than those cultured with the CD154-WT-transfected HEK 293 cells (Fig. 7A). B cells co-cultured with the HEK 293-Vector cells did not proliferate due to the absence of CD154 (HEK 293-Vector).

These data indicate that the CD154-EM mutant, given its higher persistence on cell surface, exerts a more important proliferative effect on CD40-positive B cells as compared to the CD154-WT cleavable form of the molecule, concomitant with its effect on cell adhesion.

CD154-EM induces enhanced immunoglobulin production

Another biological response to be evaluated for the cleavage-resistant CD154 is its ability to induce cell differentiation and Ig production from CD40-positive B cells. HEK 293 cells transfected with CD154-WT, with CD154 mutants or with empty vector were irradiated and allowed to adhere in a 96-well flat bottom plate. Cells were co-cultured with primary B cells at a ratio of 1 HEK 293 for 10 B cells. Immunoglobulin production from B cells was measured in supernatants after 10 days of co-culture using ELISA Kits. Our data show that the levels of IgG, IgM and IgA produced were significantly higher in supernatants of B cells cultured with the cleavage-resistant form of CD154 (i.e. in the co-culture with HEK 293 hCD154-EM cells) than those cultured in the presence of CD154-WT (Fig. 7B). Concentrations of the various Igs in supernatants of B cells co-cultured with HEK 293-Vector was insignificant as the CD154 was absent in these co-cultures (Fig. 7B).

Our results further outline another important biological feature of the cleavage-resistant CD154 and its capacity to be maintained on cell surface, namely its ability to trigger an increased production of Igs by B cells as compared to the cleavable form of CD154.

Discussion

As other members of the TNF family, CD154 is cleaved from cells into a soluble form (sCD154) by the action of membrane enzymes (12, 35, 36). Although, both soluble and transmembrane forms of TNFs are biologically active, studies have shown distinctive mechanisms of action for each form, leading to different potencies or even to different responses as a whole. In order to investigate if CD154 maintained on cell surface would induce an altered response than a CD154 destined to be cleaved into a soluble form, we first demonstrated that the individual substitution of E112 or of M113 by Alanine failed to affect the release/cleavage of CD154 from the intracellular milieu or from cell surface, while the simultaneous substitution of both residues completely abolished the spontaneous as well as the CD40-induced cleavage of the molecule. Both processes were shown to be mediated by ADAM10 and 17. The EM double mutation did not affect the ability of CD154 to interact with CD40 or to induce the activation of MAPKs pathway. The cleavage-resistant CD154 induced a more important cell death response in death-susceptible B cell lines, the Ramos cells, than did cleavable CD154. In addition, our uncleavable CD154 is revealed a more important stimulant of proliferation as well as of Ig production in B cells than its wild-type cleavable counterpart.

Early studies in the mid 90s identified the soluble CD154 as the 18 KDa molecule starting with M113, lacking the intracellular and transmembrane domains and part of the extracellular regions, but still capable of interacting with CD40 (10, 18). Additional studies have demonstrated that this form is derived from intracellular (10, 11) and from cell surface cleavage (12). In the aim of generating a CD154 resistant to cleavage, we substituted the residues at position 112, Glutamic acid (E) and position 113, Methionine (M) by directed mutagenesis, with two alanine (A). Such substitution is far from the residues implicated in the binding of CD154 with CD40, namely the Y145 and R203, previously described by our group (37). Nevertheless, a given mutation could affect the tertiary structure of the molecule and thus change its conformation which might compromise its binding to CD40. Our results show that the CD154-EM mutant was still capable of binding to CD40-positive cells similarly to its wild type counter-part. In this matter, mutations of CD154 previously reported to influence its cleavage from cell surface, involved deletion of six or

even seven aa around the cleavage site, a process that might highly be affecting the conformation of CD154 and thus its binding affinity to CD40 (19, 20). These facts underline the importance of our CD154-EM mutant involving only two residues and shown not to affect the binding of the molecule to CD40. Our mutant was also shown to maintain the capacity to transduce an intracellular signal as does the wild-type form of the molecule. This finding is of high importance in the phenomenon of bidirectional signaling of the CD154/CD40 dyad during cell-cell interaction (24, 26, 38-41). It is worth distinguishing at this point between the role of CD40 in the cleavage of CD154 from cell surface versus its role in the internalization of the molecule (42). As our data shows the expression of CD154 on cell surface in the presence of CD40, to be always inversely proportional to the level of sCD154 in the supernatant, we are assuming that a minimal level of CD154 internalization if any, is taking place in our system. Nevertheless, this point should be revisited in future studies under different conditions and different culture systems, favoring internalization to be able to investigate this process in detail.

The release of sCD154 is increased in several inflammatory and autoimmune conditions, such as systemic lupus erythematosus (17), rheumatoid arthritis, diabetes, hypertension, atherosclerosis and others (15, 43). Therefore, it was crucial to investigate the process of sCD154 release from cells in the aim of ultimately determining the biological importance of sCD154 compared to that of the transmembrane form of the molecule. Human T cells activated with PMA and ionomycin or even with processed antigens in the presence of CD40, released sCD154 of 18 KDa (10, 44). Authors suggested that such sCD154 was preformed inside the cell by an intracellular cleavage of the full length CD154 and then released to the outside milieu, based on their metabolic labelling data and the fact that inhibiting proteases on cell surface did not alter levels of sCD154 in cell supernatants. More recent studies by our group and others, further investigated the process of sCD154 release and highlighted that such process is also due, at least partially, to the cleavage of CD154 from cell surface via the activation of membrane enzymes, namely ADAM10 and ADAM17 metalloproteinases (12, 45). Interestingly, data in our current study show that ADAM10 and ADAM17 are responsible not only for the cleavage of CD154 from cell surface but also for the spontaneous release of the molecule from inside the cell suggesting a basic level of activity of these metalloproteinases even in non-activated states of the cell. While

describing the processing of CD154 inside the cell and the existence of an 18KDa soluble form intracellularly, the group of Gauchat suggested the activity of enzymes at this level (11). It has been suggested by Reiss et al. that a low level of sheddase activity exists for ADAM17 in non-activated cells and is linked to the negatively charged phosphatidylserine in the inner cell membrane leaflet (46). A similar process could be highly probable for ADAM10 as well, supporting our data above.

The soluble form of CD154 was suggested to have less binding affinity to CD40 than the membrane-bound CD154 (10, 44) but maintained its biological activity such as downregulating CD40 expression on the surface of dendritic cells and inducing their survival (44). More recent studies reported a differential signaling potential between transmembrane and sCD154 leading to different responses induced by each form. Indeed, transmembrane CD154 was shown capable of inducing apoptosis of CD40-positive malignant urothelial cells (47) either by upregulating TRAF-3 and the downstream activation of JNK/AP-1 and the apoptotic cascade including caspases 3 and 9 (48), or by stabilizing this TRAF and thus upregulating p40phox, a component of NADPH oxidase-2 (Nox-2) leading to ROS generation and the ultimate advent to apoptosis (48, 49). The soluble form of CD154, on the other hand, could halt the growth of urothelial cells of normal or malignant phenotype but could induce their cell death only in the presence of other TNF members or upon inhibition of their protein synthesis, respectively (47). Moreover, Elmetwali et al. confirmed in a series of studies that a CD154 maintained on cell surface induces apoptosis of malignant urothelial cells by upregulating TRAF3 and decreasing TRAF6, processes that would lead to the activation of JNK-mediated apoptotic signals and the downregulation of PI3K/Akt survival signals, respectively (21). On the other hand, membrane-bound CD154, and not the soluble form of the molecule could also induce cell death responses in cancerous cells by upregulating the Ras-associated factor 5 (NORE1A/RASSF5) and subsequently the gene suppressor p21 (22). More recently, the same group demonstrated that CD40-positive malignant cells exhibited an upregulation of genes modulating immune functions and a downregulation of those responsible for cell growth and division upon their stimulation with membrane-bound CD154 as compared to the soluble form of the molecule. Taken together, these studies outline the greater potency of transmembrane CD154 as an inducer of death in cancerous cells as compared to the soluble form

of CD154. However, little is known as to the effect of the transmembrane uncleavable form of CD154 as compared to its cleavable form. Our study investigated responses mediated by membrane-bound CD154 in its uncleavable versus its cleavable form.

Depending on the level of CD40 expression on cell surface, the stimulation with CD154 could have a distinct path with respect to proliferative responses. Indeed, a low-grade expression of CD40 has been associated with cell proliferation while a high expression level of the receptor has been linked to apoptosis, as might be the case with the apoptosis data from our laboratory and others described above. With respect to CD154-mediated apoptosis, our cleavage-resistant CD154, being maintained on cell surface for a longer period of time, induced a more important cell death response in susceptible B cell lines as compared to the wild-type cleavable transmembrane CD154. Our resistant form of CD154 could be beneficial in stimulating immune cell responses against tumors and reduce the adverse inflammatory effects caused by sCD154. Conversely, previous studies with regard to comparing a CD154-WT with a cleavage-resistant mutant, demonstrated similar effects of both forms in inducing the expression of adhesion and activation markers in transfected lymphocytic B cells and their capacity to stimulate T cells in co-cultures (19), and in triggering the apoptosis and growth arrest of a CD40-positive lung adenocarcinoma cell line, A549 and its co-activation of dendritic cells (50). Their cleavage-resistant CD154 involved a mutation of a six aa region starting after the cleavage site, M113, affecting probably the conformation of the molecule and thus its binding force to CD40, possibly explaining the disagreement between their data and ours (50). In the same matter, the discrepancy between the above results and those obtained in our study herein, could be due to differences in the apoptotic response of malignant cells depending on their origin.

With respect to CD154-mediated proliferative responses, our data show that a cleavage-resistant CD154 is a stronger stimulant of human B cell proliferation as compared to the cleavable form of the molecule. Previous studies in this matter have compared membrane-bound CD154 to the soluble form of CD154. Naïve B cells stimulated with cells expressing CD154 on their surface were shown to expand and proliferate, in a src-dependent mechanism activating downstream the Ras/ERK and PI-3K pathways (51, 52). Soluble CD40 ligands have been also shown to induce B cell

proliferation implicating NFκB, p38, MAPK ½ and PI-3K activation (53, 54). In a study comparing both forms of CD154, and even though focusing on proving the biological activity of sCD154, authors have shown that such form of CD154 exhibit less proliferative capacities toward B cells as compared to CD154 expressed on the surface of COS-7 cells (13). On the other hand, and in the aim of determining the biological importance of CD154 cleavage, a mutation was created at the level of the cleavage site of CD154 implicating 12 aa around this point. Authors argued that the cleavage of CD154 from cell surface is not a pre-requisite for its proliferative or activating functions toward B cells, and that the uncleavable and cleavable forms CD154 share the same pattern of B cell responses (18). Their disagreement with our data is highly probably due to the fact that their mutant, missing 12 aa, might be exhibiting an altered conformation affecting its biological response.

The interaction of CD154 with CD40 expressed on B cells induce Ig class switching (55), and disruption of the CD154/CD40 dyad, prevents B cells from undergoing isotype switching. Our cleavage-resistant CD154 mutant, CD154-EM induced a more pronounced production of IgG, IgA and IgM in B cells than the wild-type cleavable form of CD154. It is important to mention at this point and given our data showing that ADAM10/17 are involved in the release/cleavage of CD154 from T cells and that inhibiting these enzymes will block the process of CD154 release/cleavage and maintain CD154 on cell surface, we expect ADAM10/17 to be implicated in B cell activation via their releasing/cleaving function towards CD154.

In conclusion, inhibiting the cleavage of CD154 from cell surface and maintaining its transmembrane expression induces an increase in the efficacy and the biological activity of the molecule. Indeed, the cleavage-resistant molecule was able to induce a more important apoptotic response in CD40-positive lymphoma B cells and a more prominent proliferation of human B cells together with an enhancement of their immunoglobulin production than did the native form of CD154. With this being said, it is important to underline the role of CD154 not only as a ligand, but also as a signal transduction molecule (24, 56). Thus, maintaining the molecule on cell surface, the case of our CD154-EM mutant will highly probably influence not only biological responses in CD40-positive cells, as shown by our data, but also biological functions in CD154-positive cells.

Our study will open the door as to how to enhance the CD154/CD40 interaction and will allow the development of novel tools to treat diseases in which CD154 is implicated.

Acknowledgements

We like to thank Dr. Yahye Merhi for his critical insights.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. van Kooten, C., and J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67: 2-17.
2. Schonbeck, U., and P. Libby. 2001. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 4-43.
3. Bishop, G. A., C. R. Moore, P. Xie, L. L. Stunz, and Z. J. Kraus. 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597: 131-151.
4. Foy, T., A. Aruffo, J. Bajorath, J. Buhlmann, and R. Noelle. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 591-617.
5. Andre, P., K. S. Prasad, C. V. Denis, M. He, J. M. Papalia, R. O. Hynes, D. R. Phillips, and D. D. Wagner. 2002. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat. Med.* 8: 247-252.
6. Leveille, C., M. Bouillon, W. Guo, J. Bolduc, E. Sharif-Askari, Y. El-Fakhry, C. Reyes-Moreno, R. Lapointe, Y. Merhi, J. A. Wilkins, and W. Mourad. 2007. CD40 Ligand Binds to alpha 5beta1 Integrin and Triggers Cell Signaling. *J. Biol. Chem.* 282: 5143-5151.
7. Zirlik, A., C. Maier, N. Gerdes, L. MacFarlane, J. Soosairajah, U. Bavendiek, I. Ahrens, S. Ernst, N. Bassler, A. Missiou, Z. Patko, M. Aikawa, U. Schonbeck, C. Bode, P. Libby, and K. Peter. 2007. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 115: 1571-1580.
8. Takada YK, Y. J., Shimoda M, Takada Y. 2019. Integrin Binding to the Trimeric Interface of CD40L Plays a Critical Role in CD40/CD40L Signaling. *J. Immunol.* 203: 1383-1391.
9. Hassan, G. S., Y. Merhi, and W. Mourad. 2011. CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology* 217: 521-532.
10. Graf, D., S. Muller, U. Korthauer, C. van Kooten, C. Weise, and R. A. Kroczeck. 1995. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 25: 1749-1754.
11. Pietravalle, F., S. Lecoanet Henchoz, H. Blasey, J. P. Aubry, G. Elson, M. D. Edgerton, J. Y. Bonnefoy, and J. F. Gauchat. 1996. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J. Biol. Chem.* 271: 5965-5967.

12. Yacoub, D., N. Benslimane, L. Al-Zoobi, G. Hassan, A. Nadiri, and W. Mourad. 2013. CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 288: 36083-36093.
13. Mazzei, G. J., M. D. Edgerton, C. Losberger, S. Lecoanet Henchoz, P. Graber, A. Durandy, J. F. Gauchat, A. Bernard, B. Allet, and J. Y. Bonnefoy. 1995. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J. Biol. Chem.* 270: 7025-7028.
14. Anand, S. X., J. F. Viles-Gonzalez, J. J. Badimon, E. Cavusoglu, and J. D. Marmur. 2003. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb. Haemost.* 90: 377-384.
15. Tamura, N., S. Kobayashi, K. Kato, H. Bando, K. Haruta, M. Oyanagi, M. Kuriyama, T. J. Kipps, and H. Hashimoto. 2001. Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. *J. Rheumatol.* 28: 2583-2590.
16. Heeschen, C., S. Dimmeler, C. W. Hamm, M. J. van den Brand, E. Boersma, A. M. Zeiher, and M. L. Simoons. 2003. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 348: 1104-1111.
17. Kato, K., E. Santana-Sahagun, L. Z. Rassenti, M. H. Weisman, N. Tamura, S. Kobayashi, H. Hashimoto, and T. J. Kipps. 1999. The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 104: 947-955.
18. Pietravalle, F., S. Lecoanet-Henchoz, J. Aubry, G. Elson, J. Bonnefoy, and J. Gauchat. 1996. Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation. *Eur. J. Immunol.* 26: 725-728.
19. Masuta, Y., K. Kato, K. Tomihara, K. Nakamura, K. Sasaki, S. Takahashi, and H. Hamada. 2007. Gene transfer of noncleavable cell surface mutants of human CD154 induces the immune response and diminishes systemic inflammatory reactions. *J. Immunother.* 30: 694-704.
20. Elmetwali, T., P. F. Searle, I. McNeish, L. S. Young, and D. H. Palmer. 2010. CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus. *Mol. Cancer* 9: 52.

21. Elmetwali, T., L. S. Young, and D. H. Palmer. 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: 1111-1120.
22. Elmetwali, T., A. Salman, and D. H. Palmer. 2016. NORE1A induction by membrane-bound CD40L (mCD40L) contributes to CD40L-induced cell death and G1 growth arrest in p21-mediated mechanism. *Cell Death Dis.* 7: e2146.
23. Nadiri, A., M. J. Polyak, M. Jundi, H. Alturaihi, C. Reyes-Moreno, G. S. Hassan, and W. Mourad. 2011. CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events. *Eur. J. Immunol.* 41: 2358-2367.
24. El Fakhry, Y., H. Alturaihi, D. Diallo, Y. Merhi, and W. Mourad. 2010. Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling. *Eur. J. Immunol.* 40: 770-779.
25. Chambers, J. R., and K. Sauer. 2017. Detection of Cyclic di-GMP Binding Proteins Utilizing a Biotinylated Cyclic di-GMP Pull-Down Assay. *Methods Mol. Biol.* 1657: 317-329.
26. Alturaihi, H., H. G. S., L. Al-Zoobi, S. Salti, Y. Darif, D. Yacoub, S. E. Akoum, M. Oudghiri, Y. Merhi, and W. Mourad. 2015. Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur. J. Immunol.* 45: 592-602.
27. Lagares, D., P. Ghassemi-Kakroodi, C. Tremblay, A. Santos, C. K. Probst, A. Franklin, D. M. Santos, P. Grasberger, N. Ahluwalia, S. B. Montesi, B. S. Shea, K. E. Black, R. Knipe, M. Blati, M. Baron, B. Wu, H. Fahmi, R. Gandhi, A. Pardo, M. Selman, J. Wu, J. P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, A. M. Tager, and M. Kapoor. 2017. ADAM10-mediated ephrin-B2 shedding promotes myofibroblast activation and organ fibrosis. *Nat. Med.* 23: 1405-1415.
28. Funakoshi, S., D. L. Longo, M. Beckwith, D. K. Conley, G. Tsarfaty, I. Tsarfaty, R. J. Armitage, W. C. Fanslow, M. K. Spriggs, and W. J. Murphy. 1994. Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood* 83: 2787-2794.
29. Marches, R., E. Racila, T. Tucker, L. Picker, P. Mongini, R. Hsueh, E. Vitetta, R. Scheuermann, and J. Uhr. 1995. Tumour dormancy and cell signalling--III: Role of hypercrosslinking of IgM and CD40 on the induction of cell cycle arrest and apoptosis in B lymphoma cells. *Ther. Immunol.* 2: 125-136.

30. Hess, S., and H. Engelmann. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* 183: 159-167.
31. Hirano, A., Longo, D. L., Taub, D. D., Ferris, D. K., Young, L. S., Eliopoulos, A. G., Agathangelou, A., Cullen, N., Macartney, J., Fanslow, W. C., Murphy, W. J. 1999. Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand. *Blood* 93: 2999–3007.
32. Jundi, M., A. Nadiri, L. Al-Zoobi, G. S. Hassan, and W. Mourad. 2011. CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment. *Immunobiology* 217: 375-383.
33. Leveille, C., H. Zekki, R. Al-Daccak, and W. Mourad. 1999. 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: 719-730.
34. Al-Zoobi, L., S. Salti, A. Colavecchio, M. Jundi, A. Nadiri, G. S. Hassan, H. El-Gabalawy, and M. Walid. 2014. Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface. *Int. Immunol.* 26: 451-465.
35. Horiuchi, T., H. Mitoma, S. Harashima, H. Tsukamoto, and T. Shimoda. 2010. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1215-1228.
36. Canault, M., F. Peiretti, F. Kopp, B. Bonardo, M. F. Bonzi, J. C. Coudeyre, M. C. Alessi, I. Juhan-Vague, and G. Nalbone. 2006. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis* 187: 82-91.
37. Alturaihi, H., S. H. G, L. Al-Zoobi, S. Salti, Y. Darif, D. Yacoub, S. E. Akoum, M. Oudghiri, Y. Merhi, and W. Mourad. 2015. Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur. J. Immunol.* 45: 592-602.
38. Kawabe, T., M. Matsushima, N. Hashimoto, K. Imaizumi, and Y. Hasegawa. 2011. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J. Med. Sci.* 73: 69-78.
39. Blotta, M. H., J. D. Marshall, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1996. Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J. Immunol.* 156: 3133-3140.

40. Brenner, B., U. Koppenhoefer, H. Grassme, J. Kun, F. Lang, and E. Gulbins. 1997. Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a signalling molecule in T-lymphocytes. *FEBS Lett.* 417: 301-306.
41. Brenner, B., U. Koppenhoefer, A. Lepple-Wienhues, H. Grassme, C. Muller, C. P. Speer, F. Lang, and E. Gulbins. 1997. The CD40 ligand directly activates T-lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 11-17.
42. Yellin, M. J., K. Sippel, G. Inghirami, L. R. Covey, J. J. Lee, J. Sinning, E. A. Clark, L. Chess, and S. Lederman. 1994. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J. Immunol.* 152: 598-608.
43. Vakkalanka, R. K., C. Woo, K. A. Kirou, M. Koshy, D. Berger, and M. K. Crow. 1999. Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum.* 42: 871-881.
44. Ludewig, B., V. Henn, J. M. Schroder, D. Graf, and R. A. Kroczeck. 1996. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ T cells with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 3137-3143.
45. Matthies, K. M., J. L. Newman, A. Hodzic, and D. G. Wingett. 2006. Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells. *Cell. Immunol.* 241: 47-58.
46. Reiss, K., and S. Bhakdi. 2017. The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864: 2082-2087.
47. Bugajska, U., N. T. Georgopoulos, J. Southgate, P. W. Johnson, P. Graber, J. Gordon, P. J. Selby, and L. K. Trejdosiewicz. 2002. The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 1381-1395.
48. Georgopoulos, N. T., L. P. Steele, M. J. Thomson, P. J. Selby, J. Southgate, and L. K. Trejdosiewicz. 2006. A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ.* 13: 1789-1801.
49. Dunnill, C. J., K. Ibraheem, A. Mohamed, J. Southgate, and N. T. Georgopoulos. 2017. A redox state-dictated signalling pathway deciphers the malignant cell specificity of CD40-mediated apoptosis. *Oncogene* 36: 2515-2528.

50. Xu, W., Y. Li, X. Wang, C. Wang, W. Zhao, and J. Wu. 2010. Anti-tumor activity of gene transfer of the membrane-stable CD40L mutant into lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 37: 935-941.
51. Fecteau, J. F., and S. Neron. 2003. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J. Immunol.* 171: 4621-4629.
52. Neron, S., G. Suck, X. Z. Ma, D. Sakac, A. Roy, Y. Katsman, N. Dussault, C. Racine, and D. R. Branch. 2006. B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase. *Int. Immunol.* 18: 375-387.
53. Dadgostar, H., B. Zarnegar, A. Hoffmann, X. F. Qin, U. Truong, G. Rao, D. Baltimore, and G. Cheng. 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 1497-1502.
54. Zarnegar, B., J. Q. He, G. Oganessian, A. Hoffmann, D. Baltimore, and G. Cheng. 2004. 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* 101: 8108-8113.
55. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 881-922.
56. Benslimane, N., G. S. Hassan, D. Yacoub, and W. Mourad. 2012. Requirement of transmembrane domain for CD154 association to lipid rafts and subsequent biological events. *PLoS One* 7: e43070.

Figure Legends

Figure 1. CD154-EM is resistant to the spontaneous release from cells. (A) HEK 293 cells were transfected with hCD154-WT, hCD154-E112, hCD154-M113, hCD154-EM, hCD154-R/Y or with an empty vector. Cells expressing comparable levels of CD154 were sorted using an anti-CD154 mAb, (Clone 4). (B) Sorted cells (0.5×10^6 cells/ml) were left in culture for 24 hours, their supernatants collected and assessed by ELISA to quantify the concentration of sCD154. Results represent mean values \pm SD of 5 independent experiments ($*** p < 0.001$).

Figure 2. CD154-EM and CD154-WT have similar binding affinity to CD40. HEK 293 stably transfected with hCD154-WT, hCD154-EM, hCD154-R/Y or with an empty vector were incubated at 4°C for 30 min with different concentrations of biotin-labeled sCD40 (sCD40-Biotin). Washed cells were then incubated for 30 min with streptavidin-Alexa 488 and analyzed by Flow Cytometry. (A) Results shown are derived from one experiment representative of 4 independent ones. (B) The KD was calculated for CD154-WT and the CD154-EM, as described in [236].

Figure 3. CD154-EM is still capable of inducing MAPKs activation in a comparable way to CD154-WT. Transfected HEK 293 cells were stimulated with different concentrations of the sCD40-Fc, hIgG for 2 or 5min, and reactions were terminated by addition of 2X Laemmli sample buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Samples were then analyzed by western blot for ERK1/2 activation using phospho-specific Abs. Blots were stripped and reprobbed with antibodies against total ERK1/2. (A) Blots shown is a representative experiment of 3 independent ones. (B) Quantification of the band intensity of the blot in (A).

Figure 4. CD154-EM is resistant to CD40-induced cleavage from cell surface. (A) A20 cells stably transfected with human CD40 (hCD40) were incubated with mAbs G28.5-B for 30min at 4°C followed by the streptavidin-Alexa 488. The expression of hCD40 on cell surface was analyzed by FACS. (B, C) HEK 293 stably transfected with CD154-WT, CD154-EM or empty vector were co-cultured with A20 hCD40-WT or A20 Vector as a control for 1 hours at 37°C. (B) Cells were recuperated, washed and incubated with mAbs 5C8-B for 30min at 4°C followed by the streptavidin-Alexa 488. The expression of CD154 on cell surface was analyzed by FACS. Results in the left panel are derived from one experiment representative of 5 independent ones. The right panel show mean values \pm SD of the five independent experiments ($*** p < 0.001$). (C) Supernatants of co-cultures above were assessed by ELISA to quantify the concentration of sCD154. Results shown are mean values \pm SD of the five independent experiments ($*** p < 0.001$).

Figure 5. ADAM10 and ADAM17 are responsible for the CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface and for its spontaneous release from the intracellular milieu. HEK 293 stably transfected with CD154-WT were cultured alone or co-cultured with A20 hCD40-WT or A20 Vector as a control, in the presence or absence of the ADAM10 inhibitor, GI25 (50 μ M), ADAM17 inhibitor, TAPI-2 (150 μ M) or a combination of both for 1 hour at 37°C. (A) Cells were recuperated, washed and incubated with mAbs 5C8-B for 30min at 4°C followed by the streptavidin-Alexa 488. The expression of CD154 on cell surface was analyzed by FACS. Results in the left panel are derived from one experiment representative of 4 independent ones. The right panel show mean values \pm SD of the four independent experiments ($*** p < 0.001$). (B) Supernatants of co-cultures were assessed by ELISA to quantify the concentration of sCD154. Results shown are mean values \pm SD of the four independent experiments.

Figure 6. CD154-EM is a more important inducer of apoptosis in CD40-positive lymphoma B cells than CD154-WT. (A) Ramos stimulated or not with PMA, were incubated with mAbs G28.5 for 30min at 4°C followed by the Goat-anti mouse-Alexa 488. CD40 expression was analyzed by FACS. (B) HEK 293 stably transfected with CD154-WT, CD154-EM or vector alone were incubated with PMA-pretreated Ramos cells for 24 hours at 37°C. Ramos cell death response was assessed by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. Results shown are mean values \pm SD of five independent experiments (***p* < 0.001).

Figure 7. CD154-EM is a more important inducer of proliferation and Ig production in human B cells than CD154-WT. (A) B cells from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples were labeled with CFSE and co-cultured with HEK 293 transfected with CD154-WT (□), CD154-EM (▣) or vector alone (■) for different periods of time and assessed for proliferation by CFSE staining using FACS analysis. Results shown are derived from an experiment representative of 5 independent ones. (B) Purified human B cells were co-cultured with HEK 293 transfected with CD154-WT(□), CD154-EM (▣) or vector alone (■) for 10 days and levels of Igs were measured by ELISA. Results shown are mean values \pm SD of five independent experiments (***p* < 0.001).

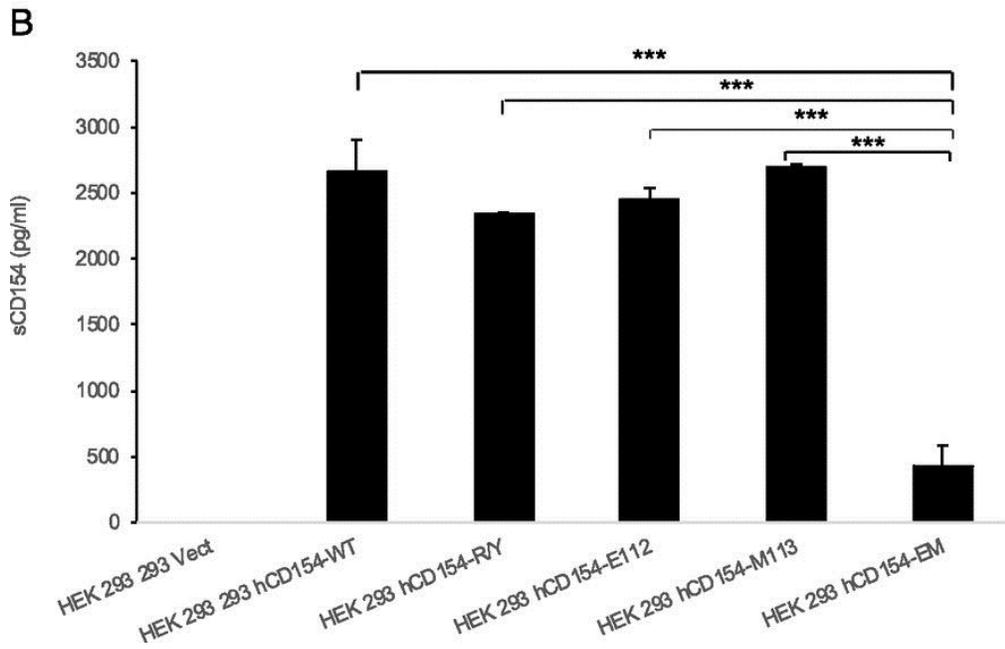
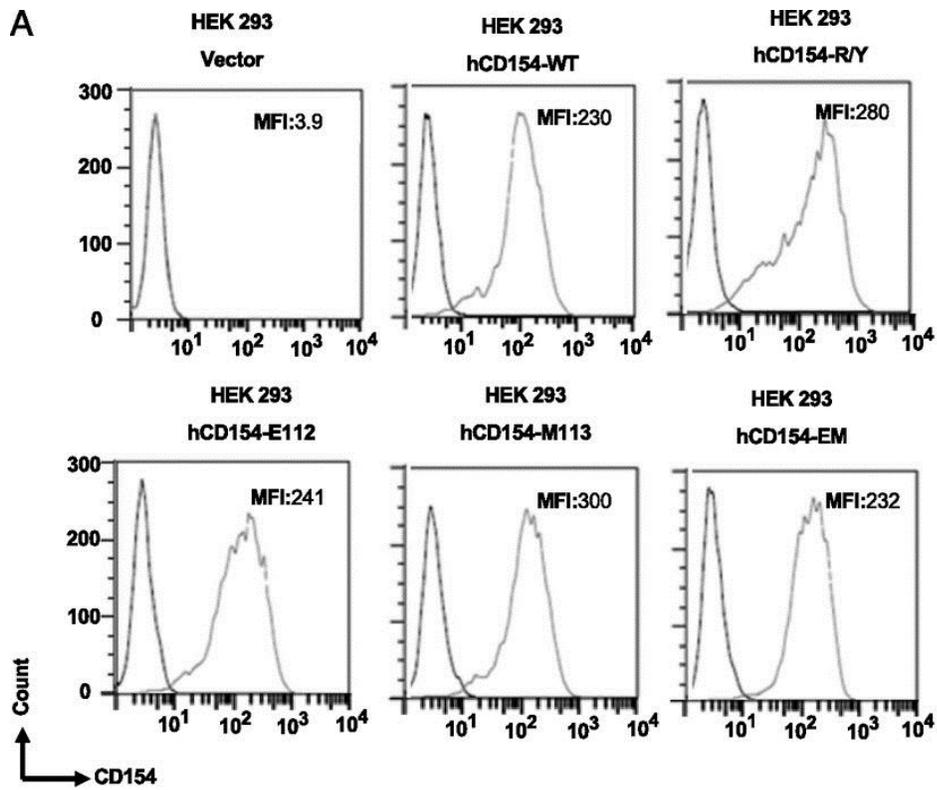


Figure 1.

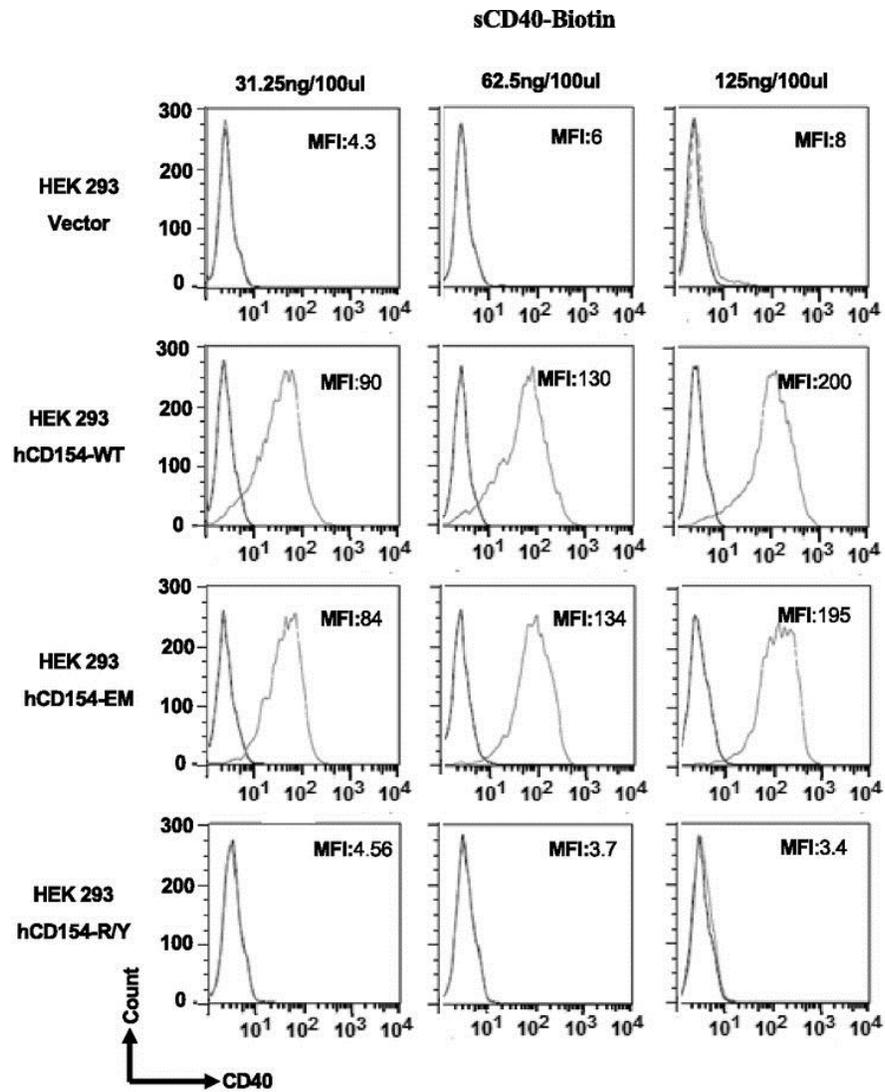
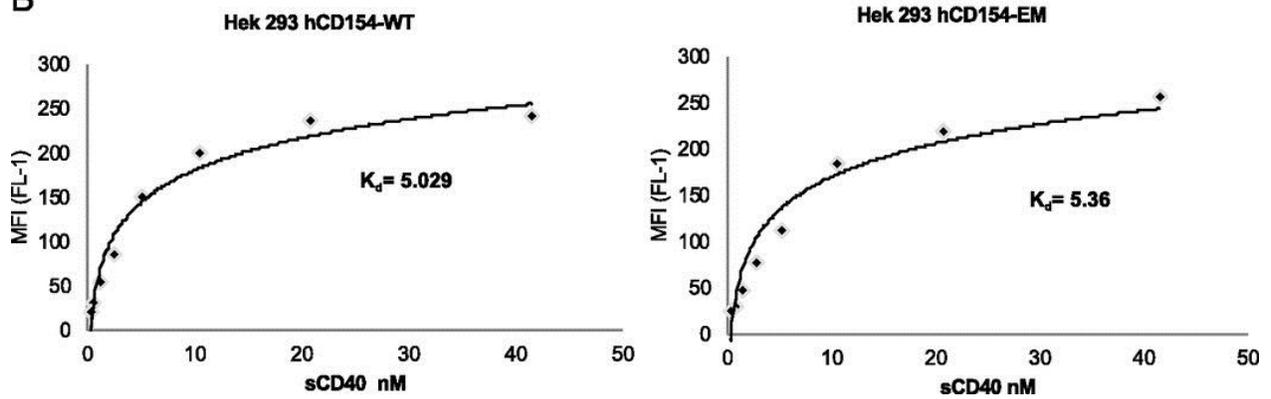
A**B**

Figure 2.

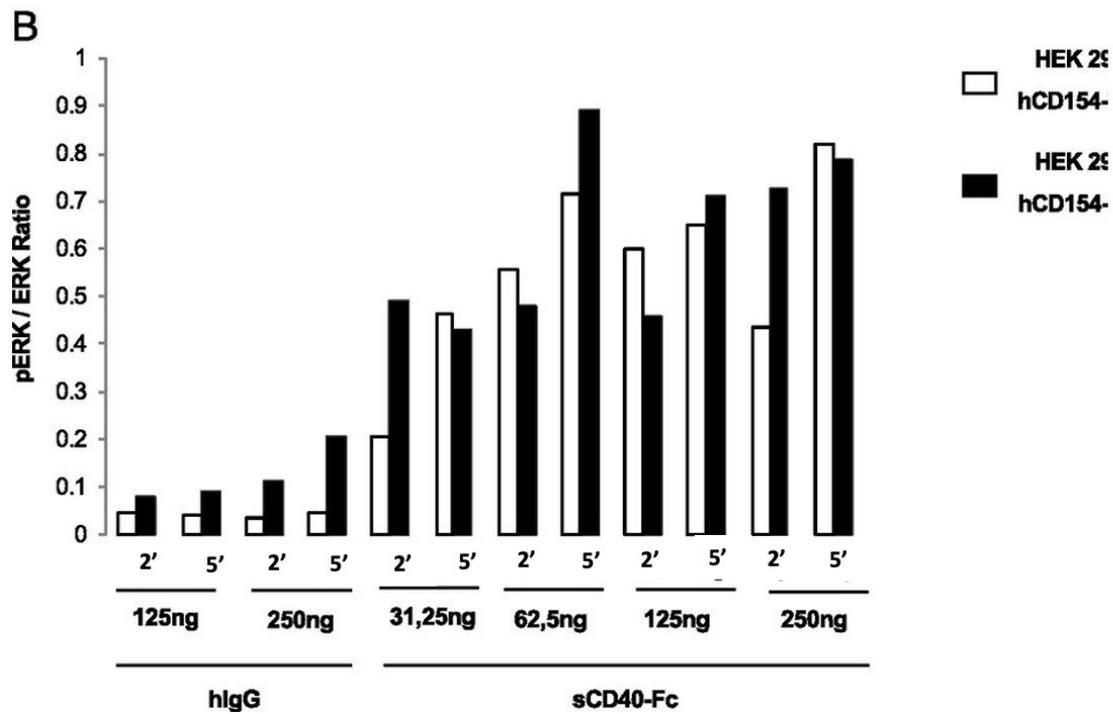
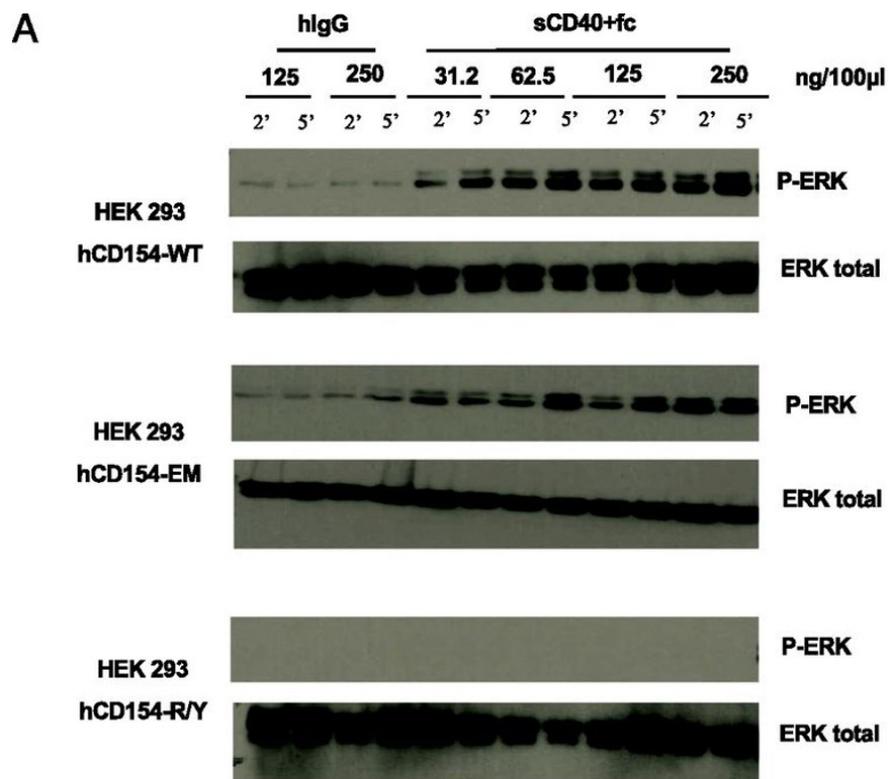


Figure 3.

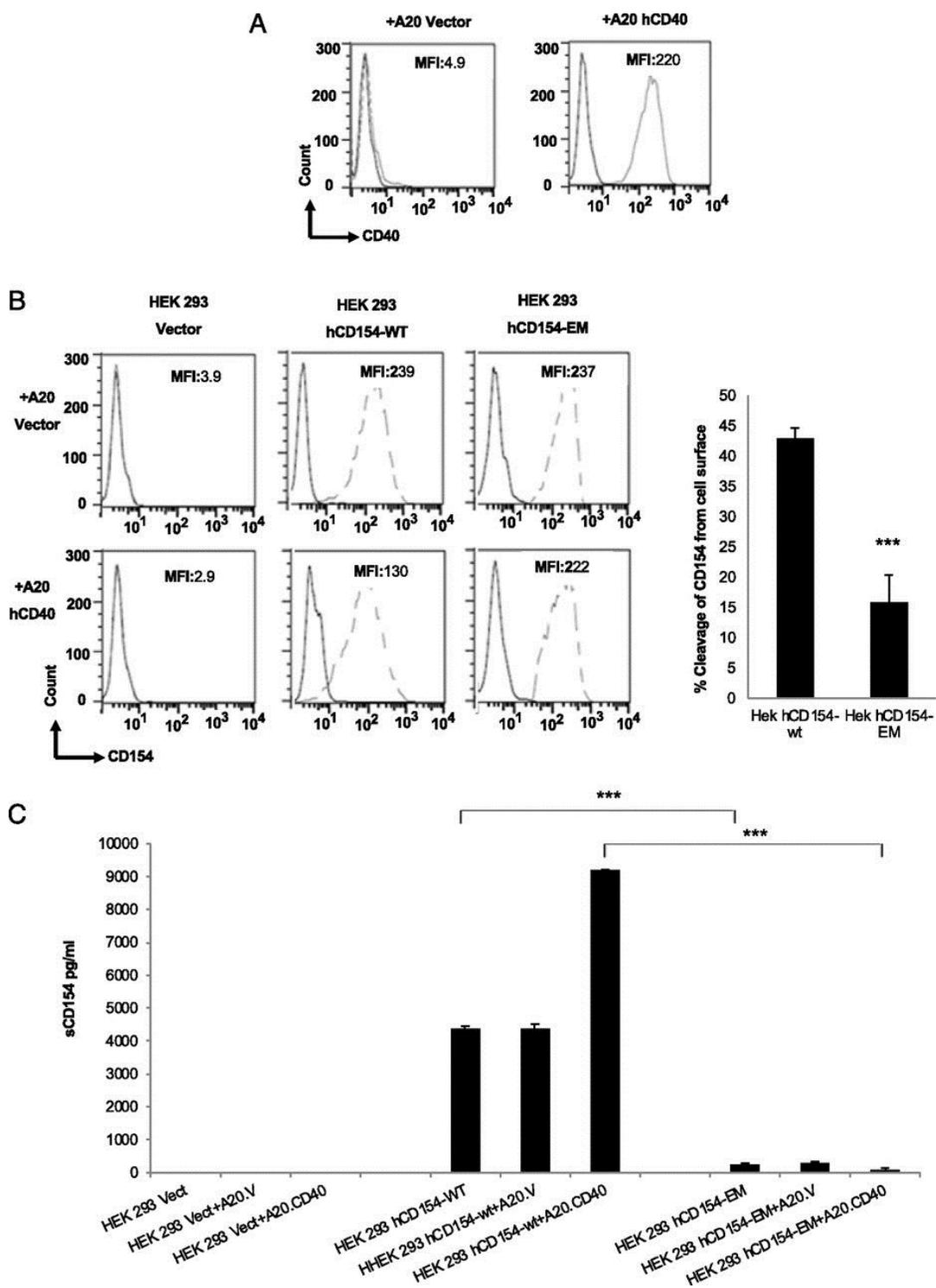


Figure 4.

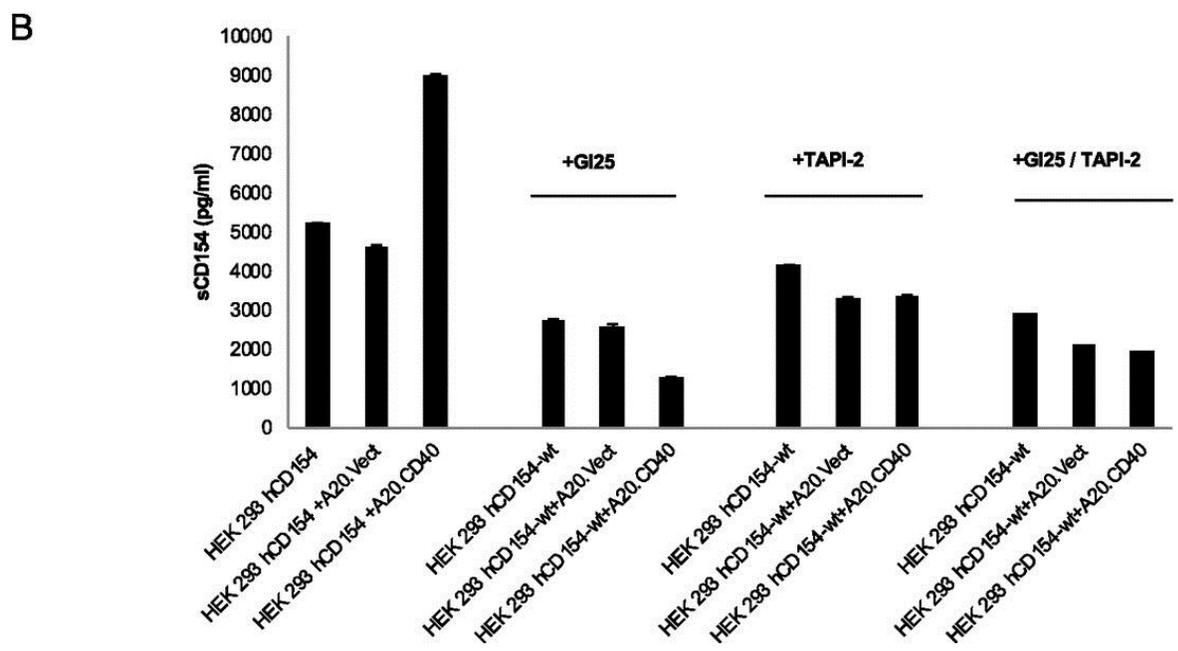
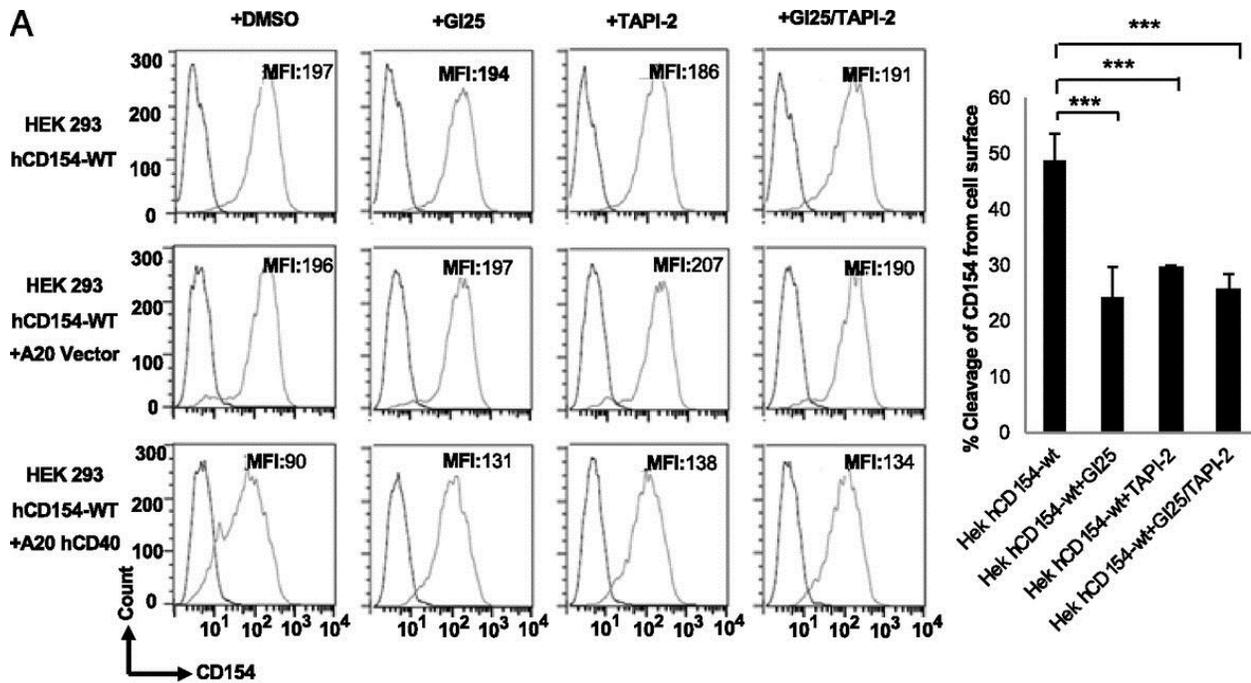


Figure 5.

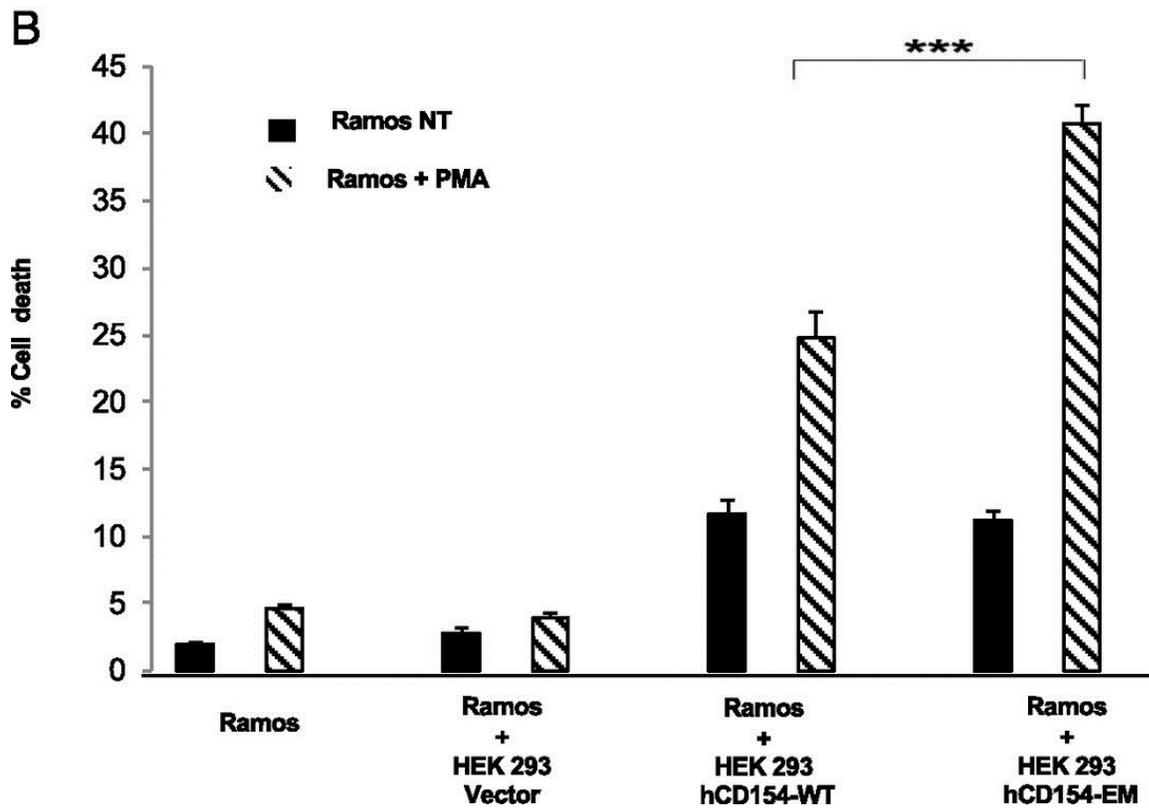
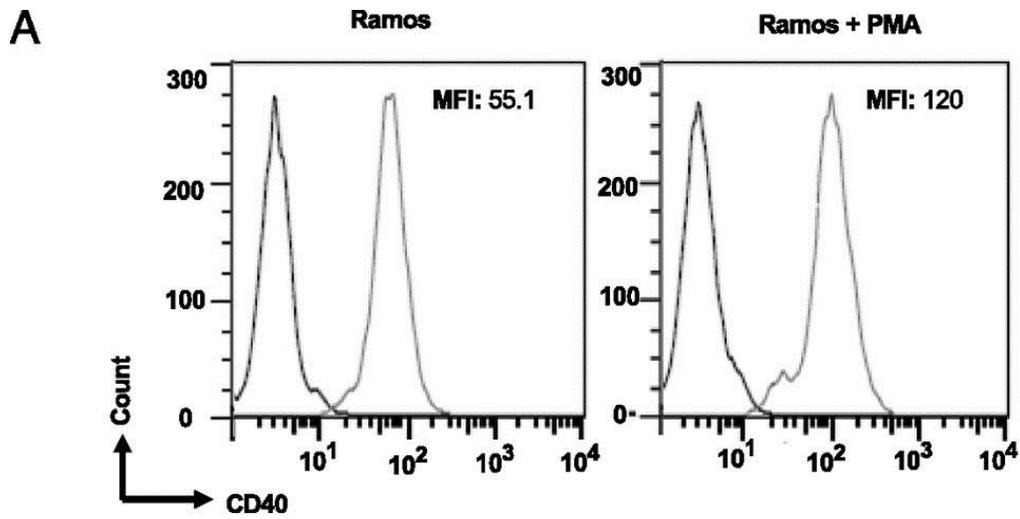
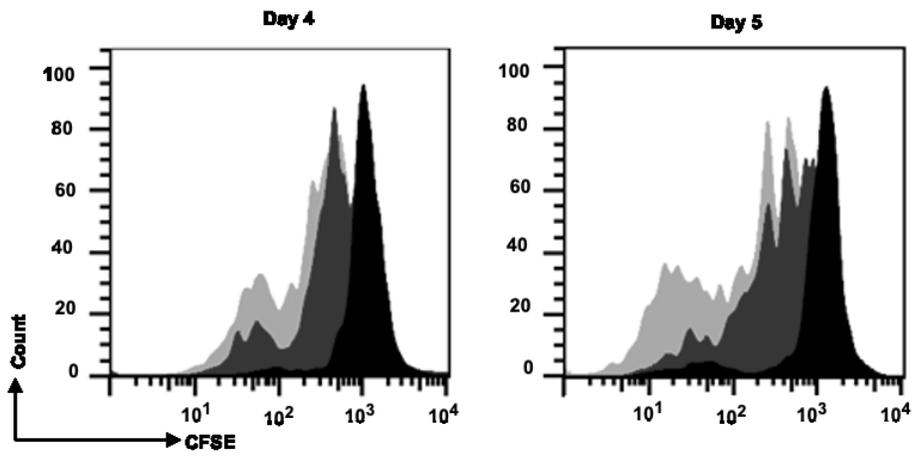


Figure 6.

A



B

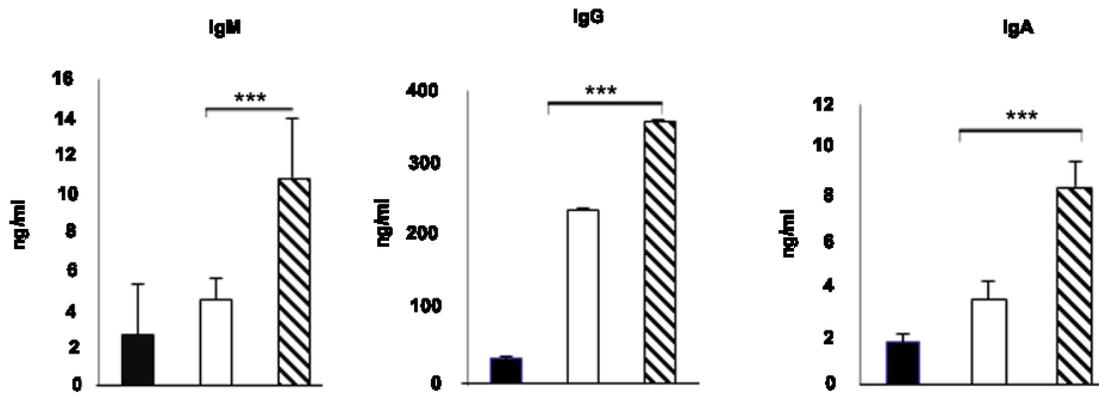


Figure 7.

Chapitre 4 – Un anticorps monoclonal ciblant le site de clivage du CD154 inhibe son clivage membranaire qu’il soit dépendant ou indépendant du CD40

1. Mise en contexte.

La génération de notre mutant CD154 résistant au clivage et nos résultats montrant sa puissance accrue en tant que stimulant du CD40, par rapport à son homologue de type sauvage, ont sollicité notre intérêt pour le développement d'outils qui inhiberaient le clivage du CD154 de la surface cellulaire. L'inhibition du clivage du CD154 membranaire peut être réalisée par deux différentes approches. La première consiste à utiliser petits peptides (Small molécules) [237-239], alors que la deuxième consiste à utiliser des anticorps monoclonaux. Lors de mon projet, nous avons opté pour l'utilisation des anticorps monoclonaux grâce à leur forte affinité pour leurs épitopes spécifiques.

2. Contribution des co-auteurs.

Suzanne Salti: Planification et réalisation des expériences. Rédaction et correction de l'article.

Loubna Al-Zoobi: Participation à la réalisation de certaines expériences et à la correction de l'article.

Youssef Darif: Génération des cellules HEK-293 exprimant les différentes mutations du CD154.

Ghada S. Hassan: Planification des expériences et correction de l'article.

Walid Mourad: Planification des expériences, analyse des résultats et correction de l'article.

3. Résumé

En plus du CD154 membranaire, le CD154 existe aussi sous une forme soluble (sCD154). Le sCD154 est détecté à des niveaux élevés dans le milieu des lymphocytes T activés et des plaquettes et dans le sérum de patients souffrant de différentes maladies inflammatoires. Ce sCD154 est le résultat du clivage de la molécule entre le résidu d'acide glutamique en position 112 (E112) et la méthionine en position 113 (M113), et peut être dérivé aussi bien du milieu intracellulaire que du clivage des molécules de la surface cellulaire. Nous avons récemment rapporté que la substitution à la fois des résidus E112 et M113 par deux alanines inhibe le clivage du CD154 et lui procure une fonction biologique accrue par rapport au CD154 clivable. Ainsi, ici, et dans le but de développer des outils inhibant le clivage du CD154 à partir de la surface cellulaire, nous avons généré une panoplie d'anticorps monoclonaux (mAbs) anti-CD154 humain. L'un de ces mAbs, nommé Clone 8, n'altère pas la liaison du sCD154 au CD40 et a perdu sa capacité de lier les cellules exprimant le CD154 muté au niveau des résidus E112 et M113. Le traitement avec le Clone 8 s'est avéré abolir complètement le clivage du CD154 de la surface cellulaire, qu'il soit dépendant ou non du CD40. Notre étude met en évidence le développement et la caractérisation d'un outil thérapeutique innovant capable d'inhiber la libération/le clivage du CD154 à partir des cellules et ainsi le maintenir à la surface cellulaire et d'augmenter probablement sa puissance en tant qu'activateur des réponses induites par le CD40.

Article 2: Monoclonal antibody targeting the CD154 cleavage site inhibits CD40-dependent and -independent cleavage of CD154 from cell surface

Suzanne Salti, Loubna Al-Zoobi, Youssef Darif, Ghada S. Hassan and Walid Mourad†.

Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada.

† **To whom correspondence should be addressed:** Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Room 10-482, Montréal, Qc, Canada, H2X 0A9; Tel: 514-890-8000 Ext: 35287; Fax: 514-412-7314; E-mail: mw.mourad@umontreal.ca.

Running title: Monoclonal antibody against CD154 cleavage from cell surface

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada

Abbreviations: mAb, monoclonal antibody; sCD154, soluble CD154; SAg, superantigen; TNF, tumor necrosis factor superfamily

Article publié dans *Immunohorizons*. 2021 Jul 29 ;5(7):590-601.

Doi: 10.4049/immunohorizons.2100062.

Abstract

In addition to the membrane-bound molecule, soluble CD154 (sCD154) is also detected at high levels in the medium of activated T cells and platelets and in the serum of patients suffering from different inflammatory diseases. This sCD154 is the result of cleavage of the full-length molecule between the Glutamic acid residue at position 112 (E112) and Methionine at position 113 (M113), and can be derived from the intracellular milieu and from cleavage of cell surface molecules. We have recently reported that substitution of both E112 and M113 by Alanine inhibits intracellular and CD40-induced membrane cleavage of CD154 and procures to CD154 an increased biological function as compared to cleavable CD154. Thus, herein, and in the aim of developing tools inhibiting cleavage of CD154 from cell surface, we generated a panel of anti-human CD154 monoclonal antibodies (mAb). One of the derived mAbs that did not alter the binding of sCD154 to CD40, named here Clone 8 mAb, totally lost its binding activity against cells expressing CD154 mutated at its E112 and M113 residues. Treatment with Clone 8 mAb was shown to completely abolish CD40-dependent and -independent cleavage of CD154 from cell surface. Our study is highlighting the development and characterization of an innovative therapeutic tool capable of inhibiting the release/cleavage of CD154 from cells and thus maintaining its availability on cell surface and high probably increasing its potency as an activator of CD40-induced responses.

Introduction

CD154, also known as CD40 ligand (CD40L), is a type II transmembrane glycoprotein, with a molecular weight of 33-39 kDa, belonging to the family of tumor necrosis factors (TNF) (1, 2). Its coding gene is located on chromosome X (3) and was initially thought to be transiently expressed only on activated CD4-positive T cells (2) but has been later identified on various cell types such as mast cells, basophils, and activated platelets (4). In addition to the membrane-bound molecule, CD154 can be found in a soluble form (sCD154) as an 18 kDa fragment, without being expressed on cell surface, resulting from an intracellular enzymatic cleavage between the Glutamic acid residue at position 112 (E112) and Methionine at position 113 (M113) (5, 6). Recently, we have demonstrated that membrane-bound CD154 can also become soluble upon its interaction with CD40 in a mechanism mediated by ADAM-10 and ADAM-17 metalloproteinases (7). Like other members of the TNF family, the two forms of CD154, soluble and membrane-bound, have a trimeric structure which is necessary for its biological activity (6, 8-10).

CD154 exerts a broad range of biological activities by interacting with five different receptors, CD40 (2), α IIb β 3 (11), α 5 β 1 (12), α M β 2 (13) and α v β 3 (14). Its classical receptor, CD40, is a 45-50 kDa type I glycoprotein belonging to the TNF receptor family, that is expressed constitutively on non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells (15), B cells, dendritic cells, macrophages, basophils, platelets, epithelial and endothelial cells, fibroblasts and vascular smooth muscle cells (16). The biological importance of the CD154/CD40 interaction in immune responses was initially described in patients suffering from the X-linked hyper-IgM syndrome (17). These patients, with mutations in the gene encoding CD154, abrogating its interaction with CD40, present a defect in Ig class switching and a susceptibility to various infections (18). The CD154/CD40 dyad is at the basis of the interaction between T and antigen presenting cells and is thus highly implicated in the development and/or initiation of several autoimmune diseases, cardiovascular complications, and cancer therapy (19). The interaction of sCD154 with the other receptors was also shown to be of high biological significance and have been involved in various inflammatory responses and events (12, 13, 20). CD154 interacts with its various receptors via distinct residues and such interaction and particularly that of the CD154/CD40 dyad results in a

bidirectional signaling in CD154- as well as in receptor-positive cells (21, 22). However, cleavage of CD154 from the cell membrane is a privileged property of CD40 (7).

Our group has recently demonstrated that cleavage-resistant CD154 mutant (mutated at the cleavage site, E112 and M113) exhibited an increased biological function as compared to the cleavable CD154 (23). These findings solicited our interest in developing tools to inhibit cleavage of CD154 from cell surface. In the study described herein, we developed a panel of mAbs directed against CD154 and one of them, named Clone 8 mAb, lost its binding activity against cells expressing the CD154 double mutant described above and inhibits CD154 cleavage from cell surface. This mAb will high probably represent an exquisite therapeutic tool that could be used in various diseases where upregulating CD154 and its immune functions are implicated in disease resorption and treatment.

Materials and Methods

Cell lines

Mouse connective tissue fibroblasts (LTK), human embryonic kidney cells (HEK 293), Jurkat E6.1 (human lymphoblastic T cells), D1.1 (a subclone derived from Jurkat E6.1 constitutively expresses hCD154 (24)), and the SP2 (mice myelomateous B cells) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and maintained in RPMI 1640 supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% L-glutamine, penicillin, and streptomycin (PSG, Life Technologies, GIBCO, Burlington, ON, Canada).

Plasmids and mutagenesis

Human CD154 wild type (WT) and its mutant CD154-112EM113/AA were generated as we previously described (23) using the plasmid pCDNA4-TO-myc-HisA Zeocin (Invitrogen). HEK 293 cells stably transfected with the mutant were generated by the method of calcium phosphate and sorted using the anti-CD154, 5C8 mAb, known to completely block the CD154/CD40 interaction (25) and according to the crystal structure of its Fab/CD154, it is directed against residue located far from the cleavage site (26). Sorted cells were then cultured in the presence of Zeocin (InvivoGen), a selective agent, at 100 µg/ml.

Antibodies and Reagents

The 5C8 hybridoma, obtained from ATCC (Manassas, VA, USA), was cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS. The mAb derived from this hybridoma was purified using G protein affinity columns and was biotin-labelled according to the method provided by Pierce (Rockford, IL, USA). The mouse anti-human CD3 Alexa 488- is from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). Goat-anti-mouse-Alexa-488 (GAM-Alexa-488), Streptavidin-Alexa488, and Streptavidin-PE come from Invitrogen Life Technology (Burlington, Ontario, Canada). Human soluble CD154 (sCD154) and sCD40 were generated in our laboratory as described previously (22, 27). Alexa Fluor-488 labeling of sCD154 (sCD154-Alexa-488) and of sCD40 (sCD40-Alexa-488) was performed according to the manufacturer's instructions (12).

Monoclonal Antibody production

The production of mouse monoclonal antibodies (mAbs) against hCD514 was carried out as previously described (28). The method consists at immunizing Balb/c mice several times (day 0, 21, and weekly for 3 consequent weeks) with cell lysates of LTK transfected cells. Spleen cells of sacrificed mouse were purified and fused with immortalized myeloma cells (SP2) by the polyethylene glycol (PEG), and maintained in 96 well plates in the presence of a selective agent: Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine (HAT). Two weeks later, supernatants were collected and tested for the production of Igs by ELISA. Cells from positive wells were propagated into 24-well plates and after ten days, positive wells were tested by flow cytometry to verify their production of specific antibodies against hCD154. The hybridomas producing mAbs directed against hCD154 were cloned twice, then the isotype of each Clone was determined by a specific ELISA. Clones were then propagated in vitro and mAbs purification from cell supernatants was carried out using the G protein affinity columns according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Bio-sciences, Mississauga, ON, Canada).

Cell stimulation for assessing cleavage

Jurkat E6.1-hCD154 or HEK 293 cells transfected with CD154 were cultured alone or with Ramos, CD40-positive B cells for 1h or 24hrs, respectively at 37°C in the presence of isotype controls, Clone 8 or the 82102 mAb (an anti-hCD40 that blocks the CD40/CD154 interaction). CD154 cleavage was determined by measuring the residual cell surface expression of CD154 by flow cytometry analysis using the 5C8-B and the anti-hCD3 Alexa-488 followed by the Streptavidin-PE. The concentration of sCD154 in the cell supernatant was measured by ELISA as described in the datasheet (R&D, Minneapolis, USA).

Evaluating CD154 expression on superantigen-stimulated PBMC

CD154 expression was assessed on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Briefly, blood was withdrawn in acid/citrate/dextrose-anticoagulated tubes from donors who gave their written consent according to the guidelines established by the CR-CHUM ethical committee.

PBMCs were purified using the Ficoll separation gradient (Wisent). PBMCs, at a concentration of 106 cells/ml, were then pre-incubated with Clone 8 or 82102 mAbs for 1hour at 37°C then stimulated with a mix of Superantigens (SEA-SEB and TSST-1) for 3, 6 and 24 hrs at 37°C. The concentration of sCD154 in the supernatant was measured by ELISA as described in the datasheet (R&D, Minneapolis, USA).

Western blotting

HEK 293 cells transfected with an empty vector (HEK 293-Vect) or cells expressing hCD154-WT were lysed for 1h on ice in 40 µl of Ripa lysis buffer supplemented with protease inhibitors (Invitrogen). To test if the Clone 8 recognizes the sCD154, 50 ng of sCD154 in 40 µl of Ripa lysis buffer was also used. Ten µl of preheated sample buffer was added and the mix was incubated at 95°C for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and were transferred to PVDF membranes, to be incubated with Clone 8 or 5C8 (mouse anti-hCD154, 1:1000) overnight at 4°C. After washing the membranes three times with TBS-Tween, we incubated them with HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (GAM-HRP, 1:20 000) for 1h at room temperature. The membrane was washed with TBS-Tween then incubated with an HRP substrate (Western Lightning Plus ECL, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions to reveal the protein bands.

Results

Generation of anti-human CD154 mAbs.

We have generated a panel of mouse mAbs directed against human CD154 (anti-hCD154 mAb) as previously described (28). These anti-hCD154 mAbs were first tested for their ability to recognize CD154 on LTK-transfected cells. The anti-hCD154 mAb, 5C8 was used as a positive control. Ten hybridomas that specifically recognize CD154-transfected LTK cells but not Vector-transfected ones were selected, cloned twice, and propagated in vitro. The ability of these selected clones to produce mAbs recognizing hCD154 expressed on the surface of HEK 293- or Jurkat E6.1 transfected with hCD154, the surface of D1.1 cells (clone derived from Jurkat E6.1 constitutively expressing CD154) and the surface of activated human T cells, was then tested by flow cytometry. Table I summarizes the ability of these clones to recognize hCD154 expressed on all the tested cell types.

Selection of anti-hCD154 mAbs that do not interfere with CD154/CD40 interaction.

Since our major goal is to generate mAbs directed against the cleavage site and capable of inhibiting CD40-induced CD154 cleavage from cell surface, it was crucial to select those that do not interfere with the binding of CD154 to CD40. For this purpose, we first determined the isotype of our derived mAbs by specific ELISA (Table II), and purified them from cell supernatants using the G protein affinity columns. Clones producing mAbs that do not interfere with CD154/CD40 interaction were selected using three complementary approaches: a) binding of sCD154-Alexa-488 to HEK 293 transfected with CD40; b) binding of sCD40-Alex 488 to HEK 293 transfected with CD154; and c) binding of sCD154 to sCD40-coated 96 well plates. In the first two approaches, CD40-transfected HEK 293 cells were incubated with sCD154-Alexa-488, CD154-transfected HEK 293 cells were incubated with sCD40-Alexa-488, in the presence or absence of the different anti-CD154 mAbs for 30 min at 4°C and analyzed by flow cytometry. In the third approach, sCD154 were added to CD40 coated 96 well plates in the presence of control mAb or anti-CD154 mAbs. The 5C8 mAb known to block the interaction of CD154 with CD40 was used as a control in all these experiments. Results in Table II show the effect of our mAbs on the CD154/CD40 interaction and clearly indicate that only Clone 6 mAb interferes with the CD154/CD40 interaction.

Clone 8 mAb is directed against the residues required for CD154 cleavage.

In order to determine if any of the derived mAbs is directed against the CD154 cleavage site, we first evaluated their recognition of our cleavage-resistant CD154-EM described previously (23). For this purpose, we transfected HEK 293 cells with CD154-WT and CD154-EM, and assessed their binding to our above-generated mAbs using flow cytometry. We used herein the 5C8 mAb as a control since its recognition site is located far from the cleavage site and is capable of blocking the interaction of CD154 with CD40 (25, 26) making its ability to recognize the CD154 not impaired by the above mutation. Our data demonstrate that only Clone 8 mAb lost its ability to recognize the CD154-EM mutant (Table III and Fig. 1A), strongly suggesting that Clone 8 is directed against the major residues implicated in CD154 cleavage.

Clone 8 mAb inhibits the spontaneous release of sCD154.

As Clone 8 is directed against the CD154 cleavage site, we hypothesize that this mAb would inhibit the cleavage of the molecule from cell surface. In the first set of experiments and since it is well established that CD154 is expressed in a transient fashion on activated T cells, we studied the effect of Clone 8 mAb on the spontaneous release of CD154. For this purpose, hCD154-WT-transfected-HEK 293 and -Jurkat E6.1 cells were treated with isotype control or Clone 8 mAb for 24 hrs. Cell supernatants were then assessed for sCD154 by ELISA. Treatment with Clone 8 mAb significantly inhibited the spontaneous release of sCD154 from both cell types (Fig. 1B) suggesting that the sCD154 usually detected in the medium of activated T cells or in the serum of patients with chronic inflammatory diseases can be also derived from a spontaneous cleavage of membrane-bound CD154.

Clone 8 mAb inhibits membrane-cleavage of CD154 induced upon polyclonal activation of T cells.

Induction and/or upregulation of CD154 can be triggered upon polyclonal stimulus or during cognate T/B cell interaction. To study the effect of Clone 8 mAb on the upregulation of CD154 and its release induced by the polyclonal activation of T cells, Jurkat E6.1 cells transfected with hCD154-WT were treated with isotype control or Clone 8 mAb and stimulated with PMA for 24 hrs. Membrane-bound CD154 was analyzed by flow cytometry and sCD154 by ELISA. Our

results show that treatment with Clone 8 mAb significantly inhibited the release of sCD154 and maintained membrane-bound CD154 on cell surface (Figs 2A and 2B).

To rule out the possibility that the inhibiting effect of Clone 8 mAb towards the release of sCD154 is the result of a competition between the used mAbs and/or a steric hindrance we performed the following experiments: 1) HEK 293 or Jurkat E6.1 cells stably transfected with CD154-WT were pre-treated with mIgG, Clone 8 or with 5C8 itself, incubated with biotinylated-5C8 and Streptavidin-Alexa488 then analyzed by FACS for the expression of CD154 on cell surface. Fig. 3A shows that binding of Clone 8 mAb does not inhibit the binding of 5C8 to CD154; 2) Soluble CD154 in the cell supernatant of PMA-stimulated Jurkat E6.1 transfected with CD154 was analysed by ELISA, after the addition of mIgG, Clone 8 or 5C8 mAb. Fig. 3B shows that adding Clone 8 mAb to the collected supernatants containing sCD154 did not alter the concentration of sCD154; 3) Western blot analysis (Fig. 3C) indicate that Clone 8 mAb is not capable of recognizing sCD154 involving residues 113-261.

Clone 8 mAb inhibits CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface.

In order to verify the effect of Clone 8 mAb on CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface, co-culture experiments using Jurkat E6.1 cells transfected with hCD154 and Ramos cells, a CD40-positive B cell line, were conducted. For this purpose, hCD154-transfected Jurkat E6.1 cells were treated with 2 μ g of an isotype control or Clone 8 mAb for 20 min at 37°C whereas Ramos cells (106), were treated with isotype control or anti-CD40 mAb 82102 known to inhibit the CD154/CD40 interaction prior to mixing the cells together for an additional 1 hour. The expression level of CD154 on cell surface was evaluated by two colors flow cytometry analysis and the concentration of cleaved sCD154 was assessed by ELISA. Fig. 4A shows that treatment with Clone 8 significantly inhibited the cleavage of CD154 from cell surface induced by an interaction with CD40 as well as the spontaneous one (Fig. 4B). Similar results were obtained in the presence of the anti-CD40 82102 mAb used as a control (Figs. 4A and 4B).

Clone 8 inhibits membrane-cleavage of CD154 from superantigen-stimulated cells.

It is well established that superantigen (SAg) mimics nominal antigen in initiating cognate T/B cells interaction and inducing CD154 expression on CD4-positive T cells in a β chain variable

region-restricted fashion (29, 30). To further verify the inhibitory effect of Clone 8, PBMC were stimulated with SAg in the presence of isotype control, Clone 8 mAb, anti-CD40 82102 mAb for 3, 6 and 24 hrs at 37°C (31). Next, we evaluated the level of CD154 expression on the surface of PBMCs by flow cytometry (Fig. 5A). Our results show that the surface expression of CD154 on PBMCs (on the T cell portion of these cells) is not decreased if PBMCs were treated with Clone 8 mAb. We also assessed the concentration of sCD154 in cell supernatants (Fig. 5B). Our ELISA data confirm those of the surface expression of the molecule, obtained by flow cytometry, demonstrating that the Clone 8 mAb inhibits the spontaneous and the CD40-induced release/cleavage of CD154 from cells in a comparable way to the control used, the anti-CD40 82102 mAb.

Taken together, we demonstrated, using three culture systems that Clone 8 is capable of blocking the release/cleavage of CD154 from the surface of T cells.

Discussion

CD154 plays a key role in the regulation of immune and inflammatory responses (4, 16, 32) and many autoimmune and inflammatory diseases that are characterized by increased levels of CD154 expression on cell surface and elevated concentrations of sCD154 in patients sera (33). Like other members of the TNF family, CD154 is transiently expressed on activated T cells, and rapidly disappear from cell surface (6). The sCD154 was initially thought to be mainly derived from intracellular cleavage (5) however our recent study clearly demonstrated that it is also derived from a membrane-bound cleavage of CD154 (7). The biological role of sCD154 has not been well investigated, but it has been proposed that cleavage of CD154 is to attenuate the immune response. Our recent finding confirms this hypothesis (23) and most importantly, it indicates that cleavage of CD154 into sCD154 is a property required for its binding to the $\alpha 5\beta 1$ integrin (34). An interest was created in defining how sCD154 is generated in the aim of targeting this process ultimately for research or even therapeutic purposes. Thus, our study herein outlines the generation of an anti-CD154 Clone 8 mAb directed against the CD154 cleavage site and demonstrate its ability to inhibit the spontaneous and the CD40-induced cleavage of CD154 from cell surface without interfering with the interaction of CD154 with CD40.

The discovery of mAbs by Milstein and Köhler in 1975 (28) revolutionized the field of immunology. It has opened the door to interesting advances in the therapy of various autoimmune diseases and cancer immunotherapy. Taking advantage of this approach, we generated a panel of mAbs directed against human CD154, capable of recognizing the molecule on the surface of different cell types in its conformational form. One of the generated mAb, named Clone 8 mAb, completely lost its ability to recognize membrane-bound CD154 when the E residue at position 112 and the M at position 113 were substituted by A. Based on our recent study showing such substitution of these two residues at the cleavage site totally abolishes the spontaneous- and the CD40-dependent cleavage of membrane-bound CD154 (23), it is therefore highly likely that binding of Clone 8 mAb to residues E112 and M113 completely abrogates the ability of ADAM-10 and ADAM-17 to recognize their substrate, the membrane-bound CD154 molecule .

The release and cleavage of CD154 has been previously assessed in T cells. It was initially reported that sCD154 encompassing residues M113-261, found in the supernatant of activated T cells and T cell clones, is an 18 kDa fragment derived from intracellular cleavage of CD154 without being expressed on the cell surface (6) and processed inside the microsomes (5). The same authors further reported that deletion of 12 amino acids (F111-A123) around the cleavage site abolished CD154 cleavage without altering CD40-induced responses (35). In contrast, Elmetwali et al., have reported that deletion of 7 amino acid (S110-G116) abrogated CD154 cleavage and enhanced CD40-induced responses (36). In support of this latter observation, we have recently demonstrated that CD154 mutated at the cleavage site itself, namely the E112 and the M113 residues (CD154-EM), is resistant to being spontaneously released from cells or cleaved from their surface upon the interaction with CD40. Such cleavage-resistant membrane-bound CD154 was shown to trigger a significantly higher response in CD40-positive cells as compared to the cleavable form of the molecule (23). Indeed, CD154 mutant resistant to cleavage upregulated the apoptotic response of susceptible B cell lymphoma cells as well as enhanced the proliferation and activation of immune cells i.e. human B cells (23). These observations are strongly in support of a biological significance of our Clone 8 mAb, inhibiting CD154 cleavage from cell surface, and high probably leading to a significant enhancement of CD40-mediated responses.

Generating an anti-CD154 mAb inhibiting CD154 cleavage will open the door for identifying the biological importance of this cleavage process. Thus, it was important to ensure that our anti-cleavage mAb do not interfere with the interaction of CD154 with CD40. The three complementary approaches used in the current study clearly show that Clone 8 mAb does not alter the interaction of CD154 with CD40. Indeed, our anti-CD154 mAb is aiming at enhancing the availability and thus the immune function of CD154 (as suggested by our previous work (23)) rather than at inhibiting its interaction with CD40. Not only that, the interaction of CD154 and CD40 is of particular importance at this point, as CD40 is the only one among CD154 receptors capable of inducing cleavage of the molecule, as previously shown by our group (7).

Our current study is highlighting the mere generation of an mAb that inhibits the cleavage of CD154 from cell surface as well as its release from the intracellular milieu. Nevertheless, future studies (some of which are already ongoing), should characterize the biological importance of this

mAb and its effect on various responses ranging from activation, proliferation, differentiation and death of many types of immune as well as malignant cells. Future studies will be also investigating the therapeutic efficiency of the Clone 8 mAb in animal tumor models, providing the proof of concept for its use in disease treatment. In fact, some disease conditions necessitate enhancing the function of CD154 in order for the disease to be alleviated, controlled or cured. Indeed, the CD154/CD40 dyad has been implicated in anti-tumoral responses and is thus the target of several cancer immunotherapeutic approaches. Treatment with recombinant CD154 or with agonistic antibodies directed against its receptor, CD40, has been assessed in animal models as well as in human clinical trials (37-39), and shown to have low feasibility (cells transfected *ex vivo* with CD154) or limited activation profile (anti-CD40 Abs relative to the membrane-bound form of CD154) (40, 41). Our study is offering an interesting and probably a highly efficient tool in this matter, mAbs that would inhibit the cleavage of CD154 from cells, maintaining the molecule on cell surface and high probably increasing its potency in inducing immune responses against cancer cells. It is important to mention at this point, that the use of our mAb in the treatment of conditions benefiting from an enhanced immune/inflammatory function of CD154 such as anti-tumoral therapies of cancers should be monitored for autoimmune and inflammatory complications, as is the case with most immunotherapeutic strategies (42).

In conclusion, and based on researches by several groups including ours showing that a CD154 mutated at its cleavage site and maintained on cell surface exhibited more apoptotic functions against cancer cells, the cleavage site of CD154 was identified as a target for a better immune function against cancer cells. These interesting findings solicited us to develop our anti-cleavage mAb as a highly promising therapeutic tool in conditions requiring enhanced and more efficient CD154-mediated responses for their treatment. Cancers and malignancies figure on top of the list of these conditions and could highly benefit from our therapeutic agent in their treatment approaches.

Acknowledgements

We like to thank Dr. Yahye Merhi for his critical insights.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
2. van Kooten, C., and J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67: 2-17.
3. Schönbeck U, M. F., Libby P. 2000. CD154 (CD40 ligand. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32(7): 687-693.
4. Schonbeck, U., and P. Libby. 2001. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 4-43.
5. Pietravalle, F., S. Lecoanet Henchoz, H. Blasey, J. P. Aubry, G. Elson, M. D. Edgerton, J. Y. Bonnefoy, and J. F. Gauchat. 1996. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J. Biol. Chem.* 271: 5965-5967.
6. Graf, D., S. Muller, U. Korthauer, C. van Kooten, C. Weise, and R. A. Kroccek. 1995. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 25: 1749-1754.
7. Yacoub, D., N. Benslimane, L. Al-Zoobi, G. Hassan, A. Nadiri, and W. Mourad. 2013. CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 288: 36083-36093.
8. Karpusas, M., Y. M. Hsu, J. H. Wang, J. Thompson, S. Lederman, L. Chess, and D. Thomas. 1995. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 3: 1426.
9. Mazzei, G. J., M. D. Edgerton, C. Losberger, S. Lecoanet Henchoz, P. Graber, A. Durandy, J. F. Gauchat, A. Bernard, B. Allet, and J. Y. Bonnefoy. 1995. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J. Biol. Chem.* 270: 7025-7028.
10. Anand, S. X., J. F. Viles-Gonzalez, J. J. Badimon, E. Cavusoglu, and J. D. Marmur. 2003. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb. Haemost.* 90: 377-384.
11. Andre, P., L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad, and D. R. Phillips. 2002. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 106: 896-899.
12. Leveille, C., M. Bouillon, W. Guo, J. Bolduc, E. Sharif-Askari, Y. El-Fakhry, C. Reyes-Moreno, R. Lapointe, Y. Merhi, J. A. Wilkins, and W. Mourad. 2007. CD40 Ligand Binds to alpha-5beta1 Integrin and Triggers Cell Signaling. *J. Biol. Chem.* 282: 5143-5151.
13. Zirlik, A., C. Maier, N. Gerdes, L. MacFarlane, J. Soosairajah, U. Bavendiek, I. Ahrens, S. Ernst, N. Bassler, A. Missiou, Z. Patko, M. Aikawa, U. Schonbeck, C. Bode, P. Libby, and K. Peter. 2007. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 115: 1571-1580.
14. Yoko K. Takada, J. Y., Michiko Shimoda and Yoshikazu Takada. 2019. Integrin Binding to the Trimeric Interface of CD40L Plays a Critical Role in CD40/CD40L Signaling. *J. Immunol.* 10.4049: 1383-1391.

15. Eliopoulos, A. G., and L. S. Young. 2004. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 360-367.
16. Hassan, G. S., M. Rana, C. Léveillé, A. Nadiri, M. Jundi, M. Polyak, Y. El-Fakhry, and W. M. Mourad. 2009. Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. *Curr. Immunol. Rev.* 5: 285-299.
17. LC, S. 2000 X-linked hyper IgM syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 19(2): 205-215.
18. Qamar N, F. R. 2014. The hyper igm syndromes. *Clinical reviews in allergy & immunology.* 46: 120-130.
19. Foy, T., A. Aruffo, J. Bajorath, J. Buhlmann, and R. Noelle. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 591-617.
20. Prasad, K. S., P. Andre, M. He, M. Bao, J. Manganello, and D. R. Phillips. 2003. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 12367-12371. Epub 12003 Sep 12330.
21. Alturaihi, H., H. G. S., L. Al-Zoobi, S. Salti, Y. Darif, D. Yacoub, S. E. Akoum, M. Oudghiri, Y. Merhi, and W. Mourad. 2015. Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur. J. Immunol.* 45: 592-602.
22. El Fakhry, Y., H. Alturaihi, D. Diallo, Y. Merhi, and W. Mourad. 2010. Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling. *Eur. J. Immunol.* 40: 770-779.
23. Salti, S., L. Al-Zoobi, Y. Darif, G. S. Hassan, and W. Mourad. 2021. CD154 Resistant to Cleavage from Intracellular Milieu and Cell Surface Induces More Potent CD40-Mediated Responses. *J. Immunol.* 206: 1793-1805.
24. Yellin, M., J. Lee, L. Chess, and S. Lederman. 1991. A human CD4- T cell leukemia subclone with contact-dependent helper function. *J. Immunol.* 147: 3389-3395.
25. Lederman, S., M. J. Yellin, G. Inghirami, J. J. Lee, D. M. Knowles, and L. Chess. 1992. Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J. Immunol.* 149: 3817-3826.
26. Karpusas, M., J. Lucci, J. Ferrant, C. Benjamin, F. R. Taylor, K. Strauch, E. Garber, and Y. M. Hsu. 2001. Structure of CD40 ligand in complex with the Fab fragment of a neutralizing humanized antibody. *Structure* 9: 321-329.
27. Nadiri, A., M. J. Polyak, M. Jundi, H. Alturaihi, C. Reyes-Moreno, G. S. Hassan, and W. Mourad. 2011. CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events. *Eur. J. Immunol.* 41: 2358-2367.
28. Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
29. Mourad, W., R. Al-Daccak, T. Chatila, and R. S. Geha. 1993. Staphylococcal superantigens as inducers of signal transduction in MHC class II-positive cells. *Semin. Immunol.* 5: 47-55.
30. Mourad, W., P. Scholl, A. Diaz, R. Geha, and T. Chatila. 1989. The staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 triggers B cell proliferation and differentiation via major histocompatibility complex-unrestricted cognate T/B cell interaction. *J. Exp. Med.* 170: 2011-2022.

31. Mehindate, K., J. Thibodeau, M. Dohlsten, T. Kalland, R. P. Sekaly, and W. Mourad. 1995. Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression. *J. Exp. Med.* 182: 1573-1577.
32. Hassan, G. S., Y. Merhi, and W. Mourad. 2011. CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology* 217: 521-532.
33. Hassan, G. S., Y. Merhi, and W. M. Mourad. 2009. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol.* 30: 165-172.
34. Bachsais M, S. S., Zaoui K, Hassan GS, Aoudjit F, Mourad W. . 2020. CD154 inhibits death of T cells via a Cis interaction with the $\alpha 5\beta 1$ integrin. . *PLoS One.* 15.
35. Pietravallo, F., S. Lecoanet-Henchoz, J. Aubry, G. Elson, J. Bonnefoy, and J. Gauchat. 1996. Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation. *Eur. J. Immunol.* 26: 725-728.
36. Elmetwali, T., P. F. Searle, I. McNeish, L. S. Young, and D. H. Palmer. 2010. CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus. *Mol. Cancer* 9: 52.
37. Gonzalez-Carmona, M. A., V. Lukacs-Kornek, A. Timmerman, S. Shabani, M. Kornek, A. Vogt, Y. Yildiz, E. Sievers, I. G. Schmidt-Wolf, W. H. Caselmann, T. Sauerbruch, and V. Schmitz. 2008. CD40 ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo. *Hepatology* 48: 157-168.
38. Wierda, W. G., J. E. Castro, R. Aguillon, D. Sampath, A. Jalayer, J. McMannis, C. E. Prussak, M. Keating, and T. J. Kipps. 2010. A phase I study of immune gene therapy for patients with CLL using a membrane-stable, humanized CD154. *Leukemia* 24: 1893-1900.
39. Ruter, J., S. J. Antonia, H. A. Burris, R. D. Huhn, and R. H. Vonderheide. 2010. Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors. *Cancer Biol. Ther.* 10: 983-993.
40. Hassan, S. B., J. F. Sorensen, B. N. Olsen, and A. E. Pedersen. 2014. Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 36: 96-104.
41. Hassan, G. S., J. Stagg, and W. Mourad. 2015. Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 41: 431-440.
42. Konig, D., and H. Laubli. 2021. Mechanisms of Immune-Related Complications in Cancer Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Pharmacology* 106: 123-136.

Figure Legends

Figure 1. Clone 8 mAb recognizes the Glutamic acid residue at position 112 (E112) and the Methionine at position 113 (M113) and inhibits the spontaneous release of sCD154. (A) HEK 293 stably transfected with CD154-WT or the CD154-EM mutant were stained with anti-CD154 5C8, Clone 4 or Clone 8 mAbs, followed by the GAM-Alexa488, and analyzed by flow cytometry. (B) HEK 293- (0.5x10⁶cells/well) and Jurkat E6.1- (10⁶ cells/well) stably transfected with vector or CD154-WT were cultured with Clone 8 mAb or an isotype control, for 24 hrs at 37 °C. Cell supernatants were collected and assessed by ELISA to quantify the concentration of sCD154. Results shown are mean values ± SD of five independent experiments (***) p < 0.001).

Figure 2. Clone 8 mAb inhibits membrane-cleavage of CD154 induced upon polyclonal activation of T cells. (A) Jurkat E6.1 stably transfected with CD154-WT were pre-treated 20 min with Clone 8 mAb or isotype control (mIgG) followed by a stimulation with PMA (50 ng/ml), for 24 hrs at 37°C. Cell supernatants were collected, and cells were washed and stained with 5C8 mAb and analyzed by flow cytometry. (B) The supernatants were assessed by ELISA to quantify the concentration of sCD154. Results shown are mean values ± SD of six independent experiments (***) p < 0.001).

Figure 3. Clone 8 mAb does not inhibit the binding of 5C8 to CD154 and fails to recognize sCD154-compensating residues 113-261. (A). HEK 293 or Jurkat E6.1 stably transfected with CD154-WT were pre-treated with mIgG, Clone 8 mAb or with 5C8 mAb itself, followed by biotinylated-5C8 and Streptavidin-Alexa488. Washed cells were analyzed by flow cytometry. (B) Clone 8 mAb was added for a period for 24 hrs to a supernatant derived from PMA (100 ng/ml)-stimulated Jurkat E6.1 cells stably transfected with CD154-WT, prior to the sCD154 quantified by ELISA. (C) Cell lysates of HEK 293-Vect or HEK 293-CD154 or recombinant of sCD154 compensating residues 113-261 were blotted using 5C8 mAb or Clone 8 mAb followed by GAM-HRP. Blots shown are a representative experiment of five independent ones.

Figure 4. Clone 8 mAb inhibits CD40-induced CD154 cleavage from cell surface. (A) Jurkat E6.1 stably transfected with CD154-WT were pre-treated for 20 min with Clone 8 mAb or with the isotype control (mIgG) then co-cultured for an additional 1 hour at 37°C with Ramos cells, human

B lymphoma cells expressing CD40, pre-treated in their turn with an isotype control or with anti-CD40 mAb 82102 inhibiting the CD154/CD40 interaction. Cells were washed, stained using isotype controls (IC) or double stained with a mix of biotinylated 5C8 mAb followed by the Streptavidin-PE and of the anti-CD3-Alexa488 (Abs), and analyzed by FACS. Results shown are derived from one experiment representative of five independent ones. (B) The concentration of sCD154 in the co-culture supernatants was assessed by ELISA. Results shown are mean values \pm SD of the five independent experiments (** $p < 0.001$).

Figure 5. Clone 8 mAb inhibits membrane-cleavage of CD154 from SAg-stimulated T cells. (A) PBMCs were left unstimulated or stimulated with SAgS (SEA, SEB and TSST-1) in the presence of isotype control, Clone 8 mAb or 82102 mAb for 3, 6 and 24 hours at 37°C. CD154 expression was tested by FACS using the 5C8-B and the mIgG-B followed by the Streptavidin-PE. Results shown are derived from one experiment representative of three independent ones. (B) Supernatants were assessed for sCD154 by ELISA. Results shown are mean values \pm SD of the three independent experiments (ns: non-significant; *** $p < 0.001$).

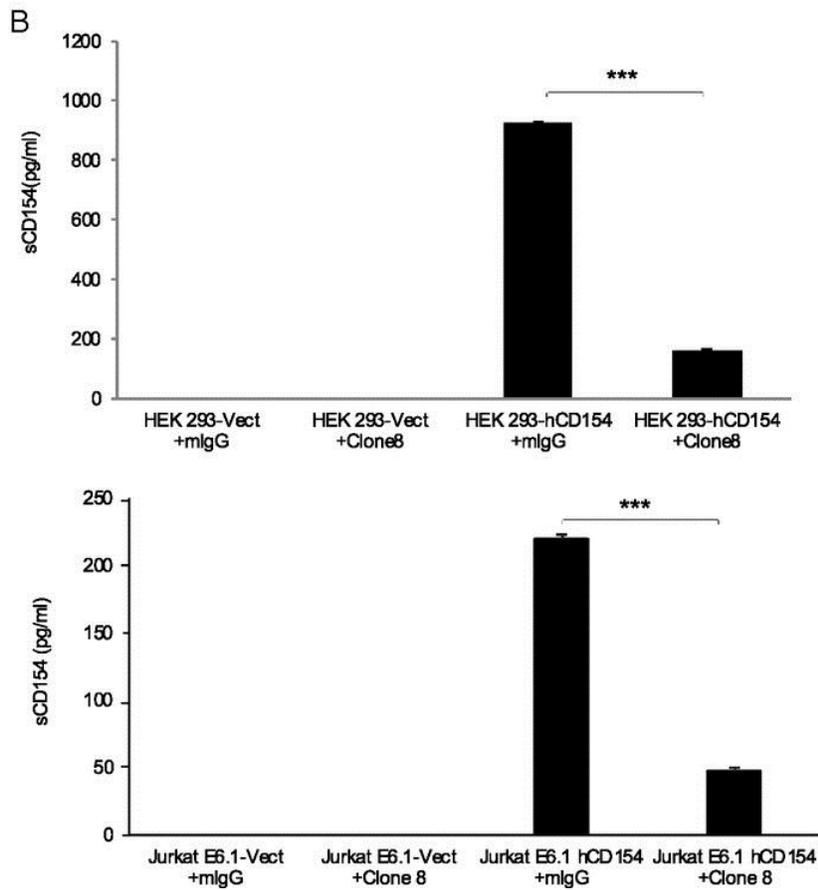
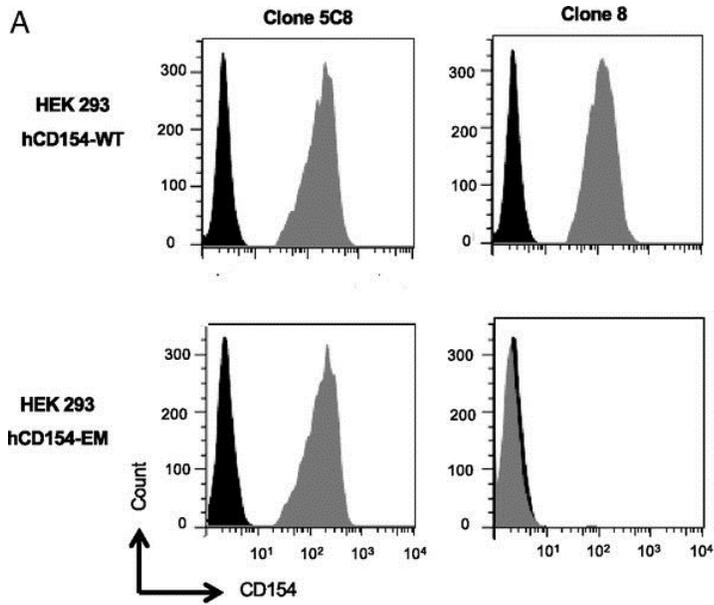


Figure 1.

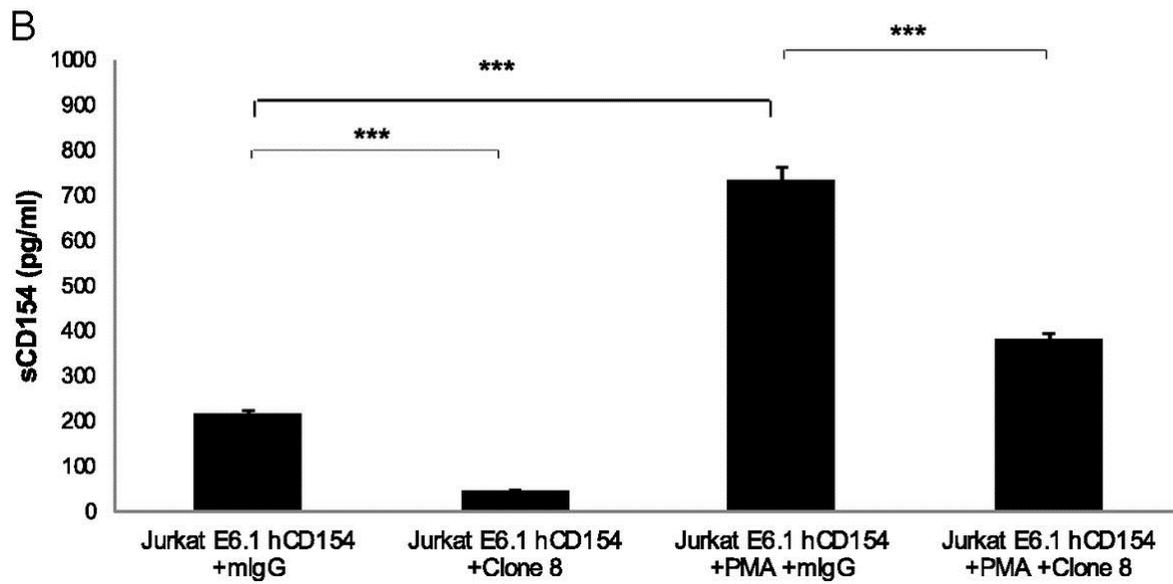
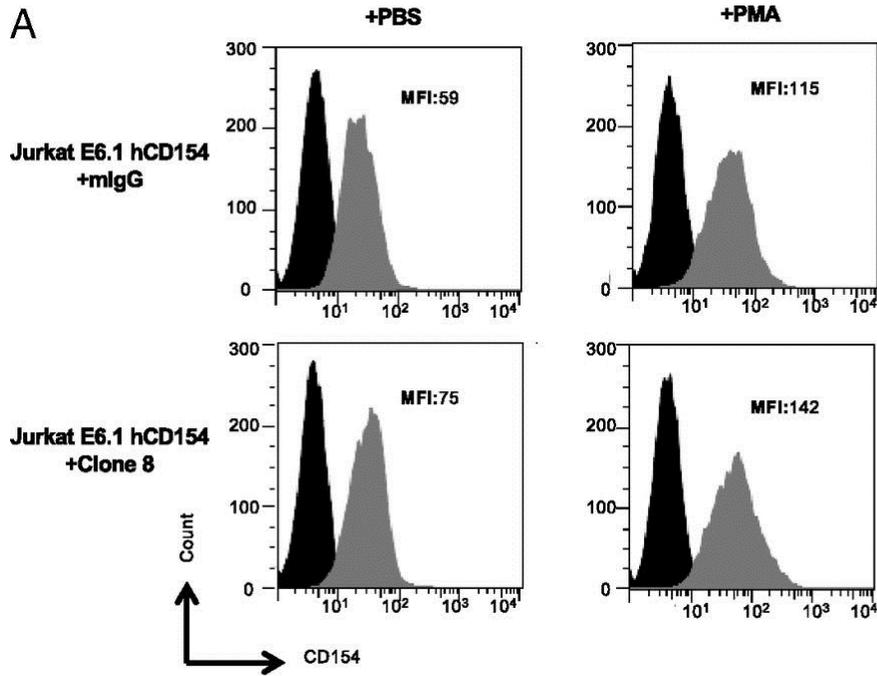


Figure 2.

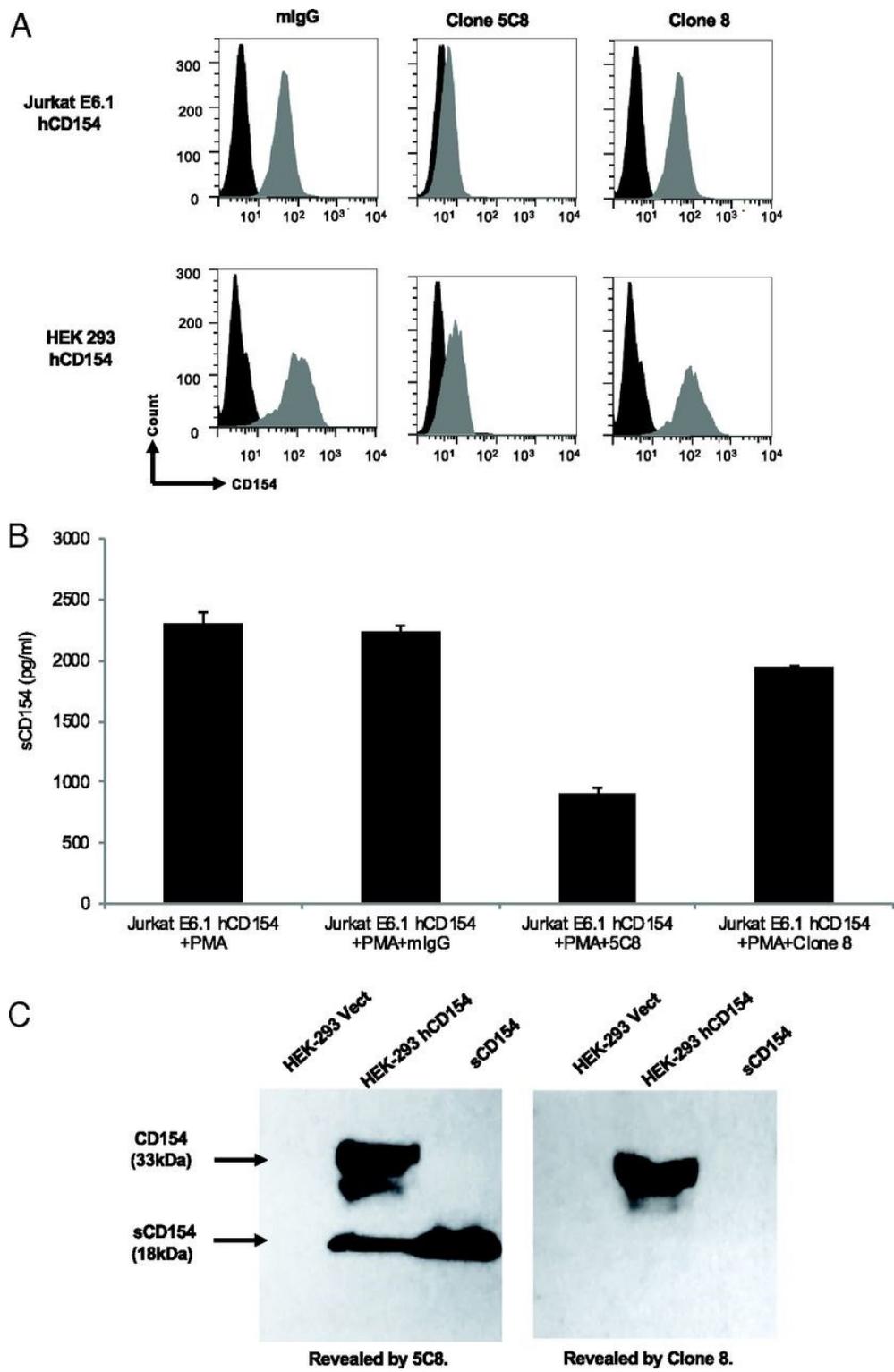


Figure 3.

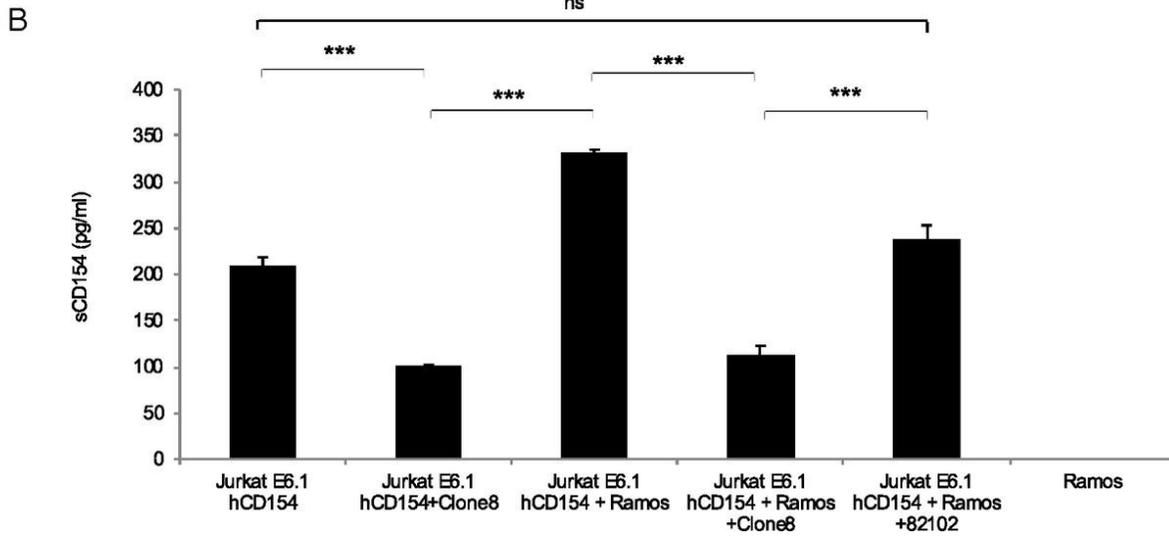
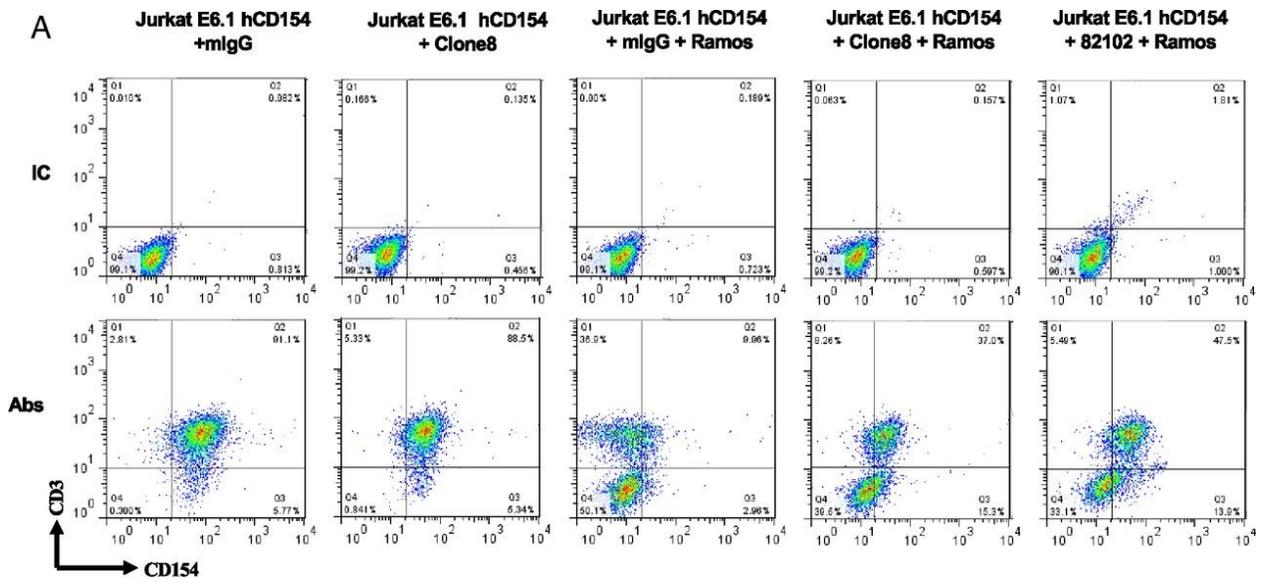


Figure 4.

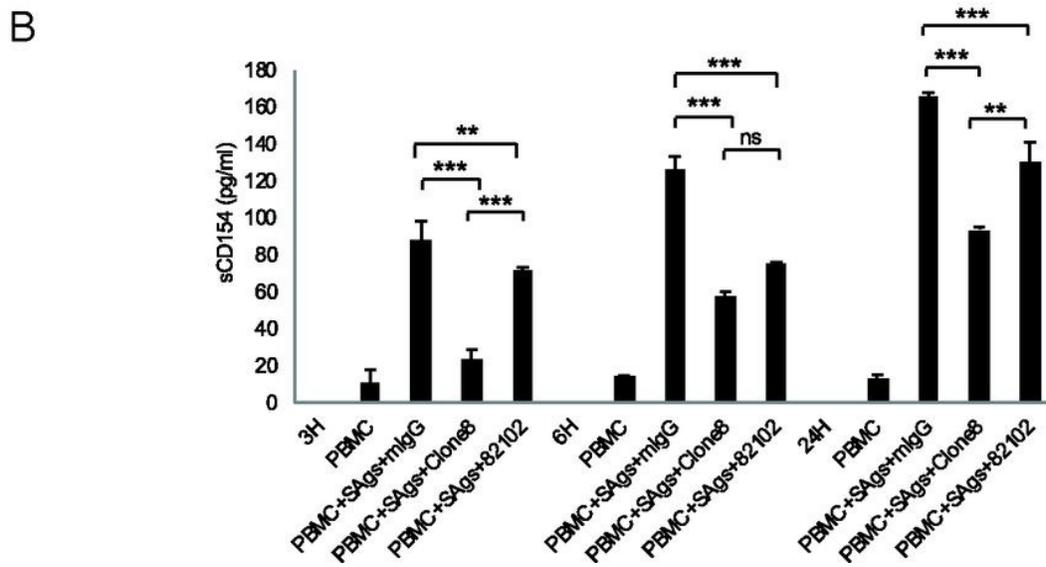
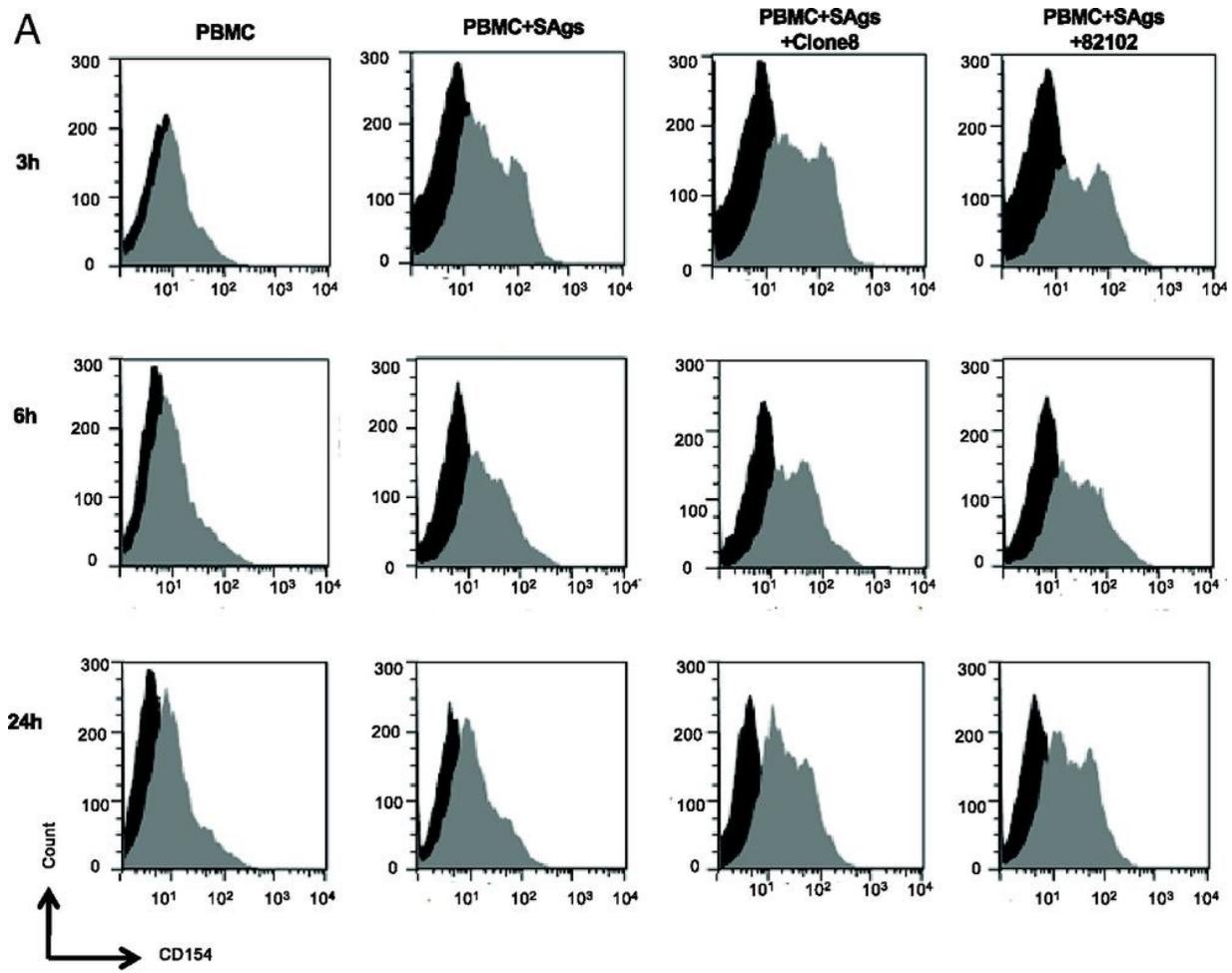


Figure 5.

Tableau 1. – Table I: Specificities of the generated anti-human CD154 mAbs.

Anti-CD154 mAbs	Binding to LTK-Vect	Binding to LTK-CD154	Binding to HEK 293-CD154	Binding to Jurkat D1.1	Binding to Jurkat E6.1-Vect	Binding to Jurkat E6.1-CD154	Binding to activated T cells
control	-	-	-	-	-	-	-
5C8	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 3	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 4	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 5	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 6	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 7	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 8	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 10	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 11	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 13	-	+++	+++	+++	-	+++	+++
Clone 14	-	+++	+++	+++	-	+++	+++

This table shows the specificities of the generated mAbs in recognizing human CD154 expressed on the surface of different cell types: LTK: mouse connective tissue fibroblasts (LTK-Vect: cells transfected with empty vector; LTK-CD154: cells transfected with CD154); HEK 293: human embryonic kidney cells (HEK 293-CD154: cells transfected with CD154); Jurkat E6.1: human lymphoblastic T cells (Jurkat E6.1-Vect: cells transfected with empty vector; Jurkat E6.1-CD154: cells transfected with CD154); Jurkat D1.1 (a subclone derived from Jurkat E6.1 constitutively expressing hCD154). These cells were stained for 30 min at 4°C with the various mAbs followed by 30 min at 4°C with GAM-Alexa488 then analyzed by flow cytometry. The 5C8 mAb was taken as a control. Data presented are representative of five different experiments. Significant binding is represented by (+++); and no detectable binding is represented by (-).

Tableau 2. – Table II: Effect of the generated mAbs on the binding of CD154 to CD40.

Anti-CD154 mAb	Sub-Class	Binding of sCD154* to HEK-293 CD40	Binding of sCD40* to HEK-293 CD154	Binding of sCD154 to CD40-coated wells
control	IgG	+++	+++	+++
5C8	IgG2a	-	-	+
Clone 3	IgG2b	+++	+++	+++
Clone 4	IgG2b	+++	+++	+++
Clone 5	IgG2a	+++	+++	+++
Clone 6	IgG1	-	-	+
Clone 7	IgG2a	++	++	++
Clone 8	IgG2a	+++	+++	+++
Clone 10	IgG1	+++	+++	++
Clone 11	IgG1	+++	+++	+++
Clone 13	IgG1	+++	+++	+++
Clone 14	IgG2b	+++	+++	-

This table outlines the ability of the generated mAbs to interfere with the binding of sCD154 to CD40. HEK 293 CD154 and HEK CD40 were incubated with CD154-Alexa 488 (sCD154*) or with CD40-Alexa 488 (sCD40*) in the presence of isotype control or specific antibody. High binding level is represented by (+++), medium level by (++) , low level by (+) and complete inhibition of binding is represented by (-).

Tableau 3. – Table III: Substitution of E112 and M113 at the CD154 cleavage site abolishes the ability of clone 8 mAb to recognize the CD154 molecule.

Anti-CD154 mAbs	Binding to HEK 293 CD154-WT	Binding to HEK 293 CD154-EM
control	-	-
5C8	+++	+++
Clone 3	+++	+++
Clone 4	+++	+++
Clone 5	+++	+++
Clone 6	+++	+++
Clone 7	+++	+++
Clone 8	+++	-
Clone 10	+++	+++
Clone 11	+++	+++
Clone 13	+++	++
Clone 14	+++	+

This table outlines the recognition of hCD154-WT or hCD154 mutated at the cleavage site (CD154-EM) by the various mAbs using FACS analysis. Transfected HEK 293 were incubated for 30 min at 4°C with 1µg/100 µl of the various mAbs followed by GAM-Alexa488. The 5C8 mAb was taken as a control. Data presented are representative of five different experiments. High level of binding is represented by (+++), medium level by (++), low level by (+) and complete inhibition of binding is represented by (-).

Chapitre 5 – Effet biologique du Clone 8 et cross-réactivité avec le CD154 de souris

1. Mise en Contexte

Nos résultats décrits dans les chapitres précédents démontrent que la substitution des résidus E112 et M113 du CD154 par deux alanine (A) rend la molécule résistante au clivage enzymatique et augmente ces fonctions biologiques par rapport au CD154 clivable. Ils démontrent aussi qu'un des anticorps monoclonaux générés dans notre laboratoire, le Clone 8, est capable de reconnaître le site de clivage et d'abolir complètement son clivage de la membrane cellulaire.

Nous nous sommes donc intéressés à étudier l'effet du Clone 8 dans l'activation des réponses induites via le CD40. Et vu la similarité entre le CD154 humain et murin notre objectif est d'évaluer l'efficacité thérapeutique du Clone 8 dans des modèles de souris. Il est important donc de confirmer la capacité du Clone 8 à reconnaître le CD154 de souris et d'inhiber son clivage de la membrane cellulaire de la même façon que celle étudiée dans les cellules humaines.

2. Matériels et méthodes.

2.1. Les lignées cellulaires :

Les HEK 293 (cellules rénales embryonnaires humaines) et les Ramos (immature human B cell lymphoma) ont été obtenues d'ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, VA, USA). Les 3T3 mCD154 (fibroblastes embryonnaires de souris) ont été obtenus du Dr Rejean Lapointe (Centre de recherche du CHUM). Ces cellules ont été maintenues dans du RPMI 1640, supplémenté avec 5% du FBS (Fetal Bovine Serum) inactivé (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et 1% de PSG (Pénicilline, Streptomycine et L-Glutamine) (GIBCO, Burlington, ON, Canada). Les HEK 293 hCD154-WT, hCD154-EM, hCD15R-RY ou Vecteur ont été générées comme décrit précédemment, utilisant le plasmide pCDNA4-TO-myc-HisA Zeocin (Invitrogen) [240].

2.2. Anticorps et Réactifs:

Le MR1, un anticorps monoclonal d'Hamster dirigé contre le mCD154 (IgG1), le G28. (IgG1) un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le hCD40, ont été obtenus d'ATCC (Manassas.VA, USA). Le Clone 8 (IgG2a) et le clone 4 (IgG2b), des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre le hCD154 ont été générés comme décrit précédemment [241]. L'IgG de souris (mIgG) provient de chez Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA). Le chèvre anti souris marqué à l'Alexa 488 (le GAM-Alexa488) et le chèvre anti hamster marqué à l'Alexa 488 (GAH-Alexa 488) proviennent d'Invitrogen Life Technology (Burlington, Ontario, Canada). Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et le GI254023X (GI25) ont été obtenus auprès de sigma-Aldrich.

2.3. Étudier la mort cellulaire.

Les cellules Ramos, traitées avec la PMA (0,06ng/ml) pendant 24 heures à 37°C, ont été lavées et incubées avec des cellules HEK 293 hCD154-WT pendant 24 heures à 37°C. Les HEK 293 hCD154 ont été pré incubées 2h à 37°C avec 4 µg du Clone 8 ou de l'IgG de souris (mIgG) comme contrôle négatif. Les HEK 293 hCD154-RY ont été utilisées comme contrôle négatif vu que ces cellules ont perdu la capacité de lier le CD40. Les cellules HEK 293 avaient été préalablement laissées adhérer pendant 2 heures à 37°C dans une plaque de 96 puits à fonds plat. Le ratio utilisé dans cette co-culture est de 1:10 une cellule HEK 293 pour 10 cellules Ramos traitées à la PMA.

La stimulation avec le G28.5 a été utilisée comme contrôle positive. La mort des Ramos a été évaluée par FACS par l'analyse du pourcentage de mort obtenu suite à la coloration à l'iodure de propidium (Invitrogen, Burlington, ON).

2.4. Cytométrie en Flux.

Afin de vérifier si le Clone 8 reconnaît le mCD154, les cellules ont été incubées avec le Clone 8, le Clone 4, le 5C8 mAbs ou le MR1 (1µg/100µL), pendant 30 min sur glace, suivi par un lavage avec du PBS 2% FBS froid. Les cellules ont été par la suite incubées 30 min avec le GAM-Alexa488 (1µg /1000µL). Les cellules ont été analysées par FACS Calibure (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). Le MR1 a été utilisé comme contrôle positif, l'IgG d'Hamster comme contrôle isotypique, et le GAH-Alexa 488 comme anticorps secondaire.

L'expression du CD40 à la surface des Ramos a été évaluée en utilisant le G28.5 suivi par le GAM-Alexa488

2.5. Immunoprécipitation et Western blot.

Les HEK 293 Vect, les HEK 293 hCD154 WT, les 3T3-Vect ou mCD154 ont été lysées pendant 1h sur glace dans 400 µl de tampon de lyse Ripa, supplémenté avec les inhibiteurs de protéase (Invitrogen). Les lysats ont ensuite été centrifugés à 10 000 x g pendant 15 min à 4°C. 200 µl des surnageants de lysat ont été ajoutés à 25 µl de Dynabeads conjuguées à 5 µg d'anticorps (C4.14 ou MR1). Les mélanges ont été incubés pendant 16 h avec rotation à 4°C. Les anticorps conjugués aux billes ont ensuite été placés sur un aimant pour séparer les billes des surnageants. Les surnageants ont été jetés, et les billes ont été rincées cinq fois avec 200 µl du tampon de lyse et ont été remises en suspension dans 40 µl de tampon de lyse. 10 µl du Lammeli buffer préchauffé ont été ajoutés et les billes ont été incubées à 95°C pendant 5 min. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur des gels d'acrylamide à 12 % et ont été transférées sur des membranes de PVDF. Les membranes ont été incubées avec le Clone 8 (souris anti-hCD154, 1:1000) pendant une nuit à 4°C. Après avoir lavé les membranes trois fois avec du TBS-Tween, ces membranes ont été incubées avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à HRP (GAM-HRP, 1:20 000) pendant 1 h à température ambiante. Les membranes ont été ensuite lavées au TBS-Tween puis incubées avec un substrat de la HRP (Western Lightning Plus ECL,

PerkinElmer, Waltham, MA, USA) conformément aux instructions du fabricant pour révéler les bandes protéiques.

2.6. Stimulation cellulaire pour évaluer le clivage de CD154

Les 3T3 mCD154 ont été incubées 1h à 37°C avec 4 µg du Clone 4, du Clone 8 ou du mIgG comme contrôle isotipique. Le traitement avec 50 µM du GI25, un inhibiteur d'ADAN-10, a été utilisé comme contrôle positif pour l'inhibition du Clivage spontané du CD154. Les surnageants des différents traitements ont été récupérés et analysés par ELISA afin de doser la concentration du CD154 soluble qui s'y trouve.

3. Résultats.

3.1. L'inhibition du clivage du CD154 par le Clone 8 augmente l'apoptose dans les cellules B de lymphome CD40-positives.

Afin d'évaluer l'importance biologique du Clone 8 et ayant démontré que le mutant CD154-EM résistant au clivage induit une réponse de mort cellulaire plus prononcée dans les lignées cellulaires B CD40-positives par rapport à la forme clivable CD154-WT de la molécule [240], nous avons évalué le rôle de cet anticorps, dans la mort des cellules B. A cet effet, des cellules Ramos, une lignée immature de cellules B humaines, ont été utilisées. Comme nous le savons pour répondre au signal de la mort cellulaire induit par le CD154 via son récepteur, le CD40, les Ramos devraient être pré-activées avec de la PMA. Cette activation va induire une surexpression du CD40 à la surface cellulaire et rend les cellules Ramos susceptibles à la mort induite via CD40 [112]. L'expression du CD40 à la surface des Ramos a été examinée par cytométrie en flux (Fig.1A). Suite à une activation de 24h avec la PMA les Ramos ont été ajoutées aux HEK 293 adhérentes, pré-incubées avec le mIgG ou le Clone 8. Le ratio utilisé dans cette co-culture est de 1:10, une cellule HEK 293 pour 10 cellules Ramos. Les combinaisons de cellules ont été incubées 24h à 37°C avant d'analyser la mort par FACS. Comme le montre la figure 1, l'ajout du clone 8 aux HEK 293-hCD154-WT augmente la mort des Ramos à un niveau comparable à celui induit par le mutant CD154-EM résistant au clivage. La stimulation avec le G28.5 (un anticorps dirigé contre le hCD40) a été utilisée comme contrôle positif.

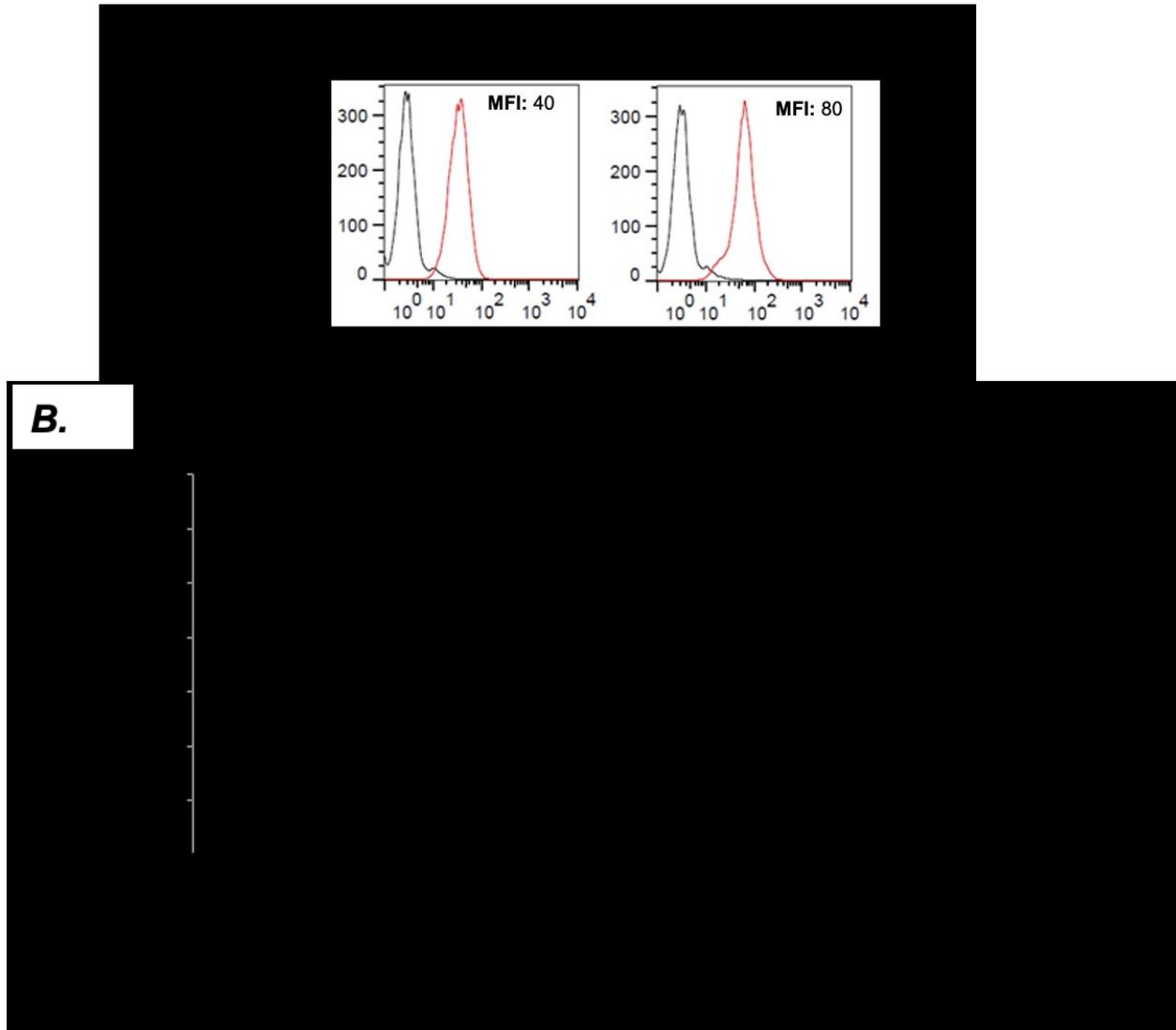


Figure 1.-.- L'inhibition du clivage du CD154 par le Clone 8 augmente l'apoptose des lymphocytes B CD40-positifs. (A) Des cellules Ramos stimulées ou non avec du PMA, ont été incubées avec les mAbs G28.5 pendant 30 minutes à 4°C suivi par la GAM-Alexa 488. L'expression du CD40 a été analysée par FACS. (B) Les Ramos prétraitées au PMA ont été co-cultivées avec des HEK 293-transfectés avec le CD154-WT ou mutés et adhérentes dans des plaques de 24 puits à un ratio 10:1, pendant 24 heures à 37°C. La réponse à la mort cellulaire des Ramos a été évaluée par l'analyse du pourcentage de mort obtenu par coloration à l'iodure de propidium par FACS.

Les résultats affichés sont des valeurs moyennes \pm SD de cinq expériences indépendantes. Le G28.5 a été utilisé comme contrôle positif de la mort.

3.2. Le Clone 8 reconnaît le CD154 de souris.

Puisque notre objectif est d'évaluer l'efficacité thérapeutique du Clone 8 dans des modèles de souris, et même si les séquences d'acides aminés présentent 100 % d'homologie au niveau du site de clivage entre le CD154 humain et le murin (Fig.2A), il est important de confirmer la capacité du Clone 8 à reconnaître le CD154 murin. Les cellules 3T3 transfectées avec le CD154 de souris et les HEK 293 transfectées avec le CD154 humain ont été incubées avec les anticorps monoclonaux suivants : le 5C8, le Clone 8, le Clone 4 et le MR1. La capacité de reconnaissance a été analysée par cytométrie en flux (Fig.2B). Le MR1, un mAb de hamster dirigé contre le CD154 murin de souris, a été utilisé comme contrôle positif pour le mCD154 et le 5C8 comme contrôle positif de la reconnaissance du hCD154. La Figure 2B montre bien que le Clone 8 reconnaît le CD154 de souris exprimé à la surface des 3T3 d'une façon comparable à celle du MR1.

Afin de confirmer davantage la capacité du Clone 8 à reconnaître le CD154 de souris et de s'assurer de sa spécificité, nous avons procédé à des expériences d'immunoprécipitation. En effet, les HEK 293 (Vect ou hCD154 WT) et les 3T3 (Vect ou mCD154) ont été lysées puis centrifugées et 200 μ l des surnageants ont été incubés avec 25 μ l de Dynabeads préalablement conjuguées à 5 μ g d'anticorps (Clone 4 ou MR1). Les mélanges ont été incubés pendant 16 h à 4°C. Les anticorps conjugués aux billes ont ensuite été placés sur un aimant pour séparer les billes des surnageants. Les surnageants ont été jetés, et les billes ont été rincées et remises en suspension dans 40 μ l de tampon de lyse. 10 μ l du Lammeli buffer préchauffé ont été ajoutés et les billes ont été incubées à 95°C pendant 5 min. Les protéines ont été par la suite séparées par électrophorèse sur des gels d'acrylamide à 12 % et transférées sur des membranes de PVDF. Les membranes ont été incubées avec le Clone 8 (1:1000) suivi par le GAM-HRP (1:20 000) pendant 1 h à température ambiante. Les membranes ont été ensuite lavées et incubées avec un substrat de la HRP (Western Lightning Plus ECL, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Les résultats de la Fig.2C montrent bien que le Clone 8 reconnaît aussi bien le CD154 humain que le CD154 de souris.

immunoprécipitées avec des billes recouvertes de MR1 puis analysés par immunoblot avec le mAb Clone 8; alors que les HEK 293 transfectées avec le hCD154 ou le vecteur vide ont été immunoprécipitées avec des billes recouvertes du Clone 4 puis analysés par immunoblot avec le mAb Clone 8.

3.3. Le Clone 8 inhibe la libération spontanée du sCD154 murin.

Comme le clone 8 est dirigé contre le site de clivage du CD154 et vu que le Clone 8 est capable de reconnaître aussi bien le hCD154 que le mCD154 nous avons procédé par la suite à étudier si le Clone 8 pourrait inhiber le clivage de la molécule du milieu intracellulaire comme c'est le cas pour le CD154 humain [241]. Nous avons étudié l'effet du Clone 8 sur la libération spontanée du mCD154. À cette fin, les cellules 3T3 transfectées avec le mCD154 ou le vecteur vide ont été traitées avec un contrôle isotypique ou avec l'un des anticorps monoclonaux; le Clone 4 ou le Clone 8 pendant 24 heures. Les surnageants cellulaires ont ensuite été évalués pour doser la concentration du sCD154 par ELISA. Comme le montre la Figure 3, le traitement avec le Clone 8 a inhibé de manière significative la libération spontanée du sCD154.

Cette inhibition du clivage a été comparée à celle obtenue par le traitement avec le GI25, inhibiteur d'ADAM-10. Suite à notre récente publication qui montre bien que le GI25 inhibe le clivage spontané du CD154, nous avons opté à l'utiliser comme contrôle positif de cette inhibition [240].

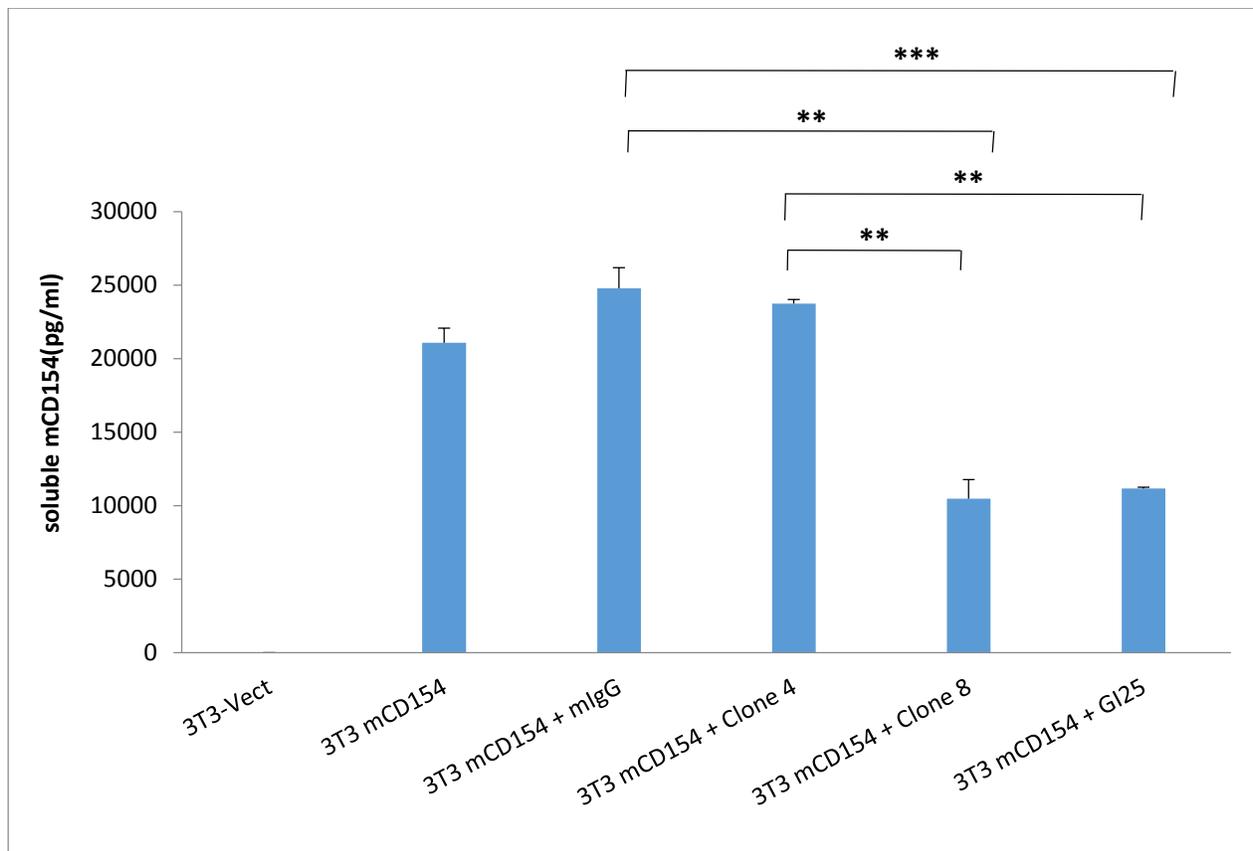


Figure 3.- Le Clone 8 inhibe le clivage spontané du CD154 murin. Les 3T3 transfectées avec le mCD154 ou avec un vecteur vide ont été traitées 1h à 37°C avec le Clone 8, le Clone 4 ou un contrôle isotypique (mIgG). Le traitement avec 50µM du GI25 a été utilisé comme contrôle positif. Par la suite les surnageants cellulaires ont été collectés et ont été analysés par ELISA pour quantifier la concentration du sCD154. Les résultats indiqués sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes. Les résultats affichés sont des valeurs moyennes \pm SD de trois expériences indépendantes.

Chapitre 6 – Discussion

Comme tous les membres de la famille des TNF, le CD154 existe aussi sous une forme soluble. Il a été initialement suggéré que la libération du sCD154 est un moyen de mettre fin au processus d'activation cellulaire déclenché par l'interaction CD154/CD40. Notre laboratoire a démontré que cette forme soluble est le résultat d'un clivage enzymatique par les métalloprotéinases (ADAM-10 et ADAM-17) [18]. Des études antérieures ont montré que le CD154 peut aussi être relâché du milieu intracellulaire sans qu'il soit exprimé à la surface des cellules sous forme d'un fragment de 18 KDa [17]. Les deux formes du CD154, soluble et membranaire, possèdent une structure trimérique qui est absolument nécessaire pour leurs activités biologiques [12, 16]. A noter, qu'en plus du CD40, l' α IIb β 3 [19], l' α 5 β 1 [32], l' α M β 2 [33] l' α v β 3 [34] et α 4 β 1 [35] ont été identifiés comme étant aussi capables de lier le CD154, cependant, nous avons observé que le clivage du CD154 de la membrane cellulaire reste une propriété privilège au CD40 [18].

Le CD154 possède aussi une activité anti tumorale pouvant mener au contrôle de la croissance de la tumeur [191]. En effet, suite à son interaction avec le CD40 des cellules tumorales, le CD154 est capable d'initier une réponse immune anti-tumorale. Il est intéressant de noter que le CD154 membranaire est capable d'induire des réponses apoptotiques plus importantes que la forme soluble de la molécule dans les cellules CD40-positives [91, 198]. D'autres études ont démontré que la forme membranaire du CD154 était capable d'induire l'apoptose des cellules malignes alors que sCD154 ne pouvait induire une réponse similaire qu'en présence d'inhibiteurs de la cascade des MAPK ou de la synthèse protéique [114].

Afin de déterminer si le CD154 maintenu à la surface cellulaire induirait une réponse modifiée par rapport au CD154 destiné à être clivé, nous avons d'abord démontré que la substitution individuelle du E112 ou du M113 par alanine n'affecte ni la libération du CD154 du milieu intracellulaire ni son clivage de la surface cellulaire, tandis que la substitution simultanée de ces deux résidus abolit complètement son clivage spontané et son clivage induit par le CD40. Une telle substitution est loin des résidus impliqués dans la liaison du CD154 avec le CD40, Y145

et R203, précédemment décrits par notre groupe [40]. Néanmoins, une mutation quelconque pourrait affecter la structure tertiaire de la molécule et ainsi changer sa conformation pouvant compromettre sa liaison au CD40. Nos résultats montrent que la double mutation EM du CD154 n'a pas affecté sa capacité de lier les cellules CD40-positives. Pietravalle et al. ont généré un CD154 résistant au clivage où une délétion de 12 acides aminés a été effectuée et ont trouvé que ce dernier induisait une prolifération des cellules B comparable à celle induite par un CD154-wild-type (wt) [235]. Nous pensons que ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par le fait qu'une délétion de 12 acides aminés pouvait probablement changer l'affinité de la liaison du CD154 à son récepteur le CD40. De plus, Masuta et al. ont généré un mutant CD154 résistant au clivage et ont démontré que les cellules B transfectées avec cette forme du CD154 présentaient des niveaux comparables du marqueur d'adhésion CD54 ainsi que des marqueurs d'activation CD80 et CD83, que ceux des cellules exprimant une forme clivable de la molécule [242]. Des études plus récentes utilisant le même mutant CD154 ont montré que sa transfection dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire CD40⁺, A549, induisait des niveaux d'apoptose et un arrêt de la croissance de ces cellules ainsi qu'une activation des cellules dendritiques similaires à ceux induits suite à la transfection avec la forme WT de la molécule [230]. Le CD154 résistant au clivage utilisé ici est le résultat d'une substitution de six acides aminés après la M113, n'impliquant donc pas les résidus E112-M113, connus pour être impliqués dans le processus du clivage, expliquant probablement le désaccord entre ces données et les notre. Il est important de signaler ici que le CD154 peut aussi être internalisé [243]. En effet, le CD40 joue un rôle dans le clivage du CD154 de la surface cellulaire ainsi que dans l'internalisation de la molécule [243]. Comme nos données montrent que l'expression du CD154 à la surface cellulaire en présence du CD40 est toujours inversement proportionnelle au niveau du sCD154 qui se trouve dans le surnageant, nous supposons qu'un niveau minimal d'internalisation du CD154 a lieu dans notre système.

En plus de son rôle de ligand, le CD154 agit également comme une molécule de transduction de signal. Il a été démontré que la liaison du CD154 à des anticorps monoclonaux qui lui sont spécifiques induisait l'activation d'une variété de voies de signalisation, notamment celle de PTK, JNK, p38, Rac-1 et p56lck [106, 107, 244-247]. En effet, cette activation était similaire

à celle produite suite à la stimulation avec le CD40 purifié, ce qui prouve sa spécificité au CD154. Nos travaux montrent qu'une telle capacité à transmettre un signal intracellulaire n'a pas été affectée par la mutation EM du CD154 vu que suite à l'interaction avec le CD40, les deux formes sauvage et mutée présentaient une activation ERK1/2 similaire. Ces données suggèrent que notre mutant résistant au clivage conserve sa capacité à agir comme une molécule de transduction et participe à la signalisation bidirectionnelle induite par le complexe CD154/CD40, un processus important dans le système immunitaire et inflammatoire [44, 47].

Malgré que certaines études montrent que la forme soluble du CD154 a perdu sa capacité à activer les CPA [248], la plupart des évidences indiquent que le sCD154 est biologiquement actif [249, 250]. De plus, il a été montré que la libération du sCD154 à des niveaux accrus est une caractéristique de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, l'athérosclérose [41, 47]. Dans ces maladies, les cellules T activées du sang périphérique et le sCD154 libéré par les plaquettes, vont interagir avec les cellules exprimant le CD40, stimulant ainsi le complexe CD154/CD40 et amplifiant son rôle biologique [23]. Afin de déterminer l'importance biologique du sCD154 par rapport au CD154 membranaire, il était important d'étudier le processus par lequel les cellules produisent le sCD154. Il a été suggéré que la libération du sCD154 des cellules T humaines activées provient de l'intérieur de la cellule suite à un clivage intracellulaire suivi d'une libération dans le milieu extracellulaire [16, 232]. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases, à la surface cellulaire, n'a pas modifié les niveaux du sCD154 détectés dans les surnageants cellulaires [16, 232]. Or, nos résultats décrits dans le troisième chapitre, montrent que les métalloprotéinases ADAM-10 et ADAM-17 sont responsables non seulement du clivage du CD154 de la surface cellulaire, mais également de sa libération spontanée de l'intérieur de la cellule, suggérant un niveau d'activité basale de ces métalloprotéinases. En effet, lors de leur étude sur le sCD154, Pietravalle et al. ont suggéré la présence d'une activité enzymatique intracellulaire menant à la libération du sCD154 [249]. De plus, Reiss et al. ont suggéré la présence d'une activité d'ADAM-17 au niveau des cellules non activées [251]. Par conséquent un processus similaire pourrait également être probable pour l'ADAM-10.

Comme décrit plus haut, le CD154 membranaire est un inducteur plus puissant que le sCD154. En effet, Elmetwali et al. ont démontré que le CD154 résistant au clivage induit l'apoptose des cellules cancéreuses en augmentant le TRAF-3 par rapport à TRAF-6, activant ainsi les signaux apoptotiques médiés par JNK et régulant négativement ceux de la survie PI3K/Akt [117] ou en régulant positivement le NORE1A/RASSF5 [215]. Récemment, le même groupe a démontré que les cellules malignes CD40⁺ stimulées avec le CD154 résistant au clivage présentent une régulation positive des gènes modulant les fonctions immunitaires et une régulation négative de ceux responsables de la croissance et de la division cellulaires [216]. Cependant, peu est connu sur l'effet de la forme non clivable du CD154 par rapport à sa forme clivable d'où l'intérêt de notre étude qui a examiné les réponses médiées par le CD154 lié à la membrane sous sa forme résistante au clivage par rapport à sa forme clivable. Nous savons que l'interaction CD154/CD40 joue un rôle important dans la prolifération et la survie des cellules B [101]. Cependant, diverses études ont montré que cette interaction peut également jouer un rôle direct dans l'induction de la mort cellulaire spécifique et dans l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales [204, 252, 253]. Une étude réalisée dans notre laboratoire montre que la signalisation via le CD40 conduit à une mort rapide des cellules B médiée par ce dernier [112]. Afin d'étudier la mort cellulaire suite à l'interaction du CD154/CD40, nous avons utilisé les Ramos, un modèle de cellules B immatures exprimant constitutivement le CD40 à leur surface. Étant insensibles à la mort, nous avons évalué la possibilité de stimuler cette réponse par un traitement à la PMA. Nos résultats montrent que les Ramos cocultivées avec la forme résistante du CD154 étaient plus sensibles à la mort cellulaire que celles cocultivées avec le hCD154-WT. Le CD154-EM induit donc une mort cellulaire plus importante au niveau des Ramos, par rapport au CD154-WT. Cependant, des études antérieures, ont montré des effets similaires de ces deux formes, résistante au clivage ou non, dans le déclenchement de l'apoptose et l'arrêt de la croissance des cellules d'adénocarcinome pulmonaire exprimant le CD40 [230]. De même, Masuta et al. ont montré une induction de l'expression des marqueurs d'adhésion et d'activation similaire en utilisant un mutant du CD154 résistant au clivage en comparaison avec sa forme sauvage. [242]. Ces observations contradictoires à nos résultats peuvent être expliquées par le fait que le niveau d'expression du CD40 prédit le destin de la cellule. En effet, un faible niveau d'expression est

associé à une prolifération cellulaire tandis qu'un niveau d'expression élevé est lié à l'apoptose. Donc, notre CD154 résistant au clivage, étant maintenu sur la surface cellulaire induirait une réponse de mort plus importante dans les lignées cellulaires B sensibilisées par rapport au CD154 transmembranaire sauvage.

Pour étudier l'effet de la résistance sur la prolifération des cellules B, des cellules HEK-293 ont été co-cultivées avec des cellules B de donneurs sains marquées au CFSE. Les HEK 293 CD154-EM ont démontré une prolifération des cellule B plus prononcée que celle des cellules cultivées avec les HEK-293 CD154-WT. Lors d'une étude antérieure il a été démontré que le sCD154 présente des capacités de prolifération moins importantes envers les cellules B que le CD154 exprimé à la surface des cellules COS-7 [24]. Pietravalle et al. ont montré que les formes non clivable et clivable du CD154 partagent les même réponses cellulaires des cellules B et que le clivage du CD154 de la surface cellulaire n'est donc pas une condition préalable à ses fonctions prolifératives ou activatrices envers les cellules B [235]. Nous suggérons que ce désaccord avec nos données peut être expliqué par le fait qu'une délétion de 12 acides aminés pourrait probablement changer l'affinité de la liaison du CD154 à son récepteur le CD40 affectant ainsi ses réponses biologiques.

De plus nous savons que l'interaction du CD154 avec le CD40 exprimé sur les cellules B amplifie la commutation de classe des Igs *in-vitro* [39]. En effet, l'importance du complexe CD154/CD40 a été démontrée chez les patients souffrant d'hyper-IgM où la mutation du CD154 affecte l'interaction CD154/CD40 aboutissant à une commutation de classe d'immunoglobulines altérée [97, 98]. Nos données montrent que les niveaux d'IgG, IgM et IgA produits étaient significativement plus élevés dans les surnageants de cellules B cultivées avec la forme résistante au clivage du CD154 que ceux cultivés dans la présence de CD154-WT. Donc le CD154 résistant au clivage est aussi capable de déclencher une production accrue d'Ig par rapport à la forme clivable de CD154. En effet, une étude vient supporter nos résultats montrant que le niveau d'exposition des lymphocytes B au CD154 affecte leur prolifération, leur différenciation ainsi que leur sécrétion d'immunoglobuline [254].

Il ne faut pas oublier que l'interaction CD154/CD40 induit une activation bidirectionnelle donc le maintien de la molécule à la surface de la cellule influencera non seulement les réponses biologiques dans les cellules CD40⁺ mais aussi les fonctions biologiques dans les cellules CD154⁺. En effet, il a été démontré que cette interaction favorise la différenciation des cellules T en cellules T auxiliaires de type Th1 [108]. On pense donc que l'inhibition du clivage du CD154 conduirait à une activation accrue des cellules immunitaires et à leur production de cytokines (IL-12, IL-2, IFN- γ) favorisant la réponse Th1. Cette réponse est très importante dans la lutte contre les cellules tumorales. En effet, les lymphocytes T CD4⁺, exprimant le CD154 à leur surface, vont activer les cellules dendritiques par l'intermédiaire de leur CD40 induisant leur maturation et la présentation antigénique. Ces cellules dendritiques vont à leur tour stimuler les fonctions cytotoxiques des CD8⁺ contre les cellules tumorales.

De nombreuses maladies auto-immunes et inflammatoires sont caractérisées non seulement par des taux accrus de CD154 exprimés à la surface des cellules immunitaires ou non mais également par une concentration élevée du sCD154 dans le sérum des patients. De là, découle notre intérêt pour identifier la source de la forme soluble du CD154 et savoir comment elle est générée. Notre étude décrit la génération d'un mAb anti-CD154 dirigé contre le site du clivage du CD154. En effet, la découverte des mAbs par Milstein et Köhler en 1975 [255] a révolutionné le domaine de l'immunologie. Il a ouvert la porte à des avancées intéressantes dans le traitement de diverses maladies auto-immunes et l'immunothérapie du cancer. Contrairement aux anticorps polyclonaux, les mAbs sont plus spécifiques et peuvent être dirigés contre deux ou trois acides aminés.

Suite à notre génération du CD154-EM résistant au clivage et dans le but de développer des outils pour inhiber le processus de clivage de CD154, nous avons généré un mAb capable de bloquer le clivage du CD154 qu'il soit induit via son interaction avec le CD40 ou libéré spontanément. Il est important de noter que le Clone 8 perd sa capacité de reconnaître le mutant CD154-EM et qu'il n'interfère pas avec l'interaction du CD154/CD40. Il est donc très probable que la liaison du Clone 8 aux résidus E112 et M113 abolit complètement la capacité d'ADAM-10 et -17 à reconnaître la molécule du CD154 exprimée à la membrane.

Plusieurs mAbs anti-CD154 sont disponibles et sont connus pour leur capacité à bloquer l'interaction CD154/CD40. En effet, le BG9588 et l'IDIC131 sont des mAbs dirigés contre le CD154 humain et ont prouvé leur efficacité à bloquer cette interaction dans des modèles animaux de maladies auto-immunes. Cependant les essais cliniques ont été interrompus en raison de complications potentiellement mortelles. Le 5C8, également connu pour bloquer l'interaction CD154/CD40 [4], a été évalué dans des études sur le rejet d'allogreffe [256, 257] et arrêté car il induisait également des complications de nature thrombotique [258]. Contrairement à ces mAbs, le Clone 8 vise à améliorer la disponibilité et donc la fonction immunitaire du CD154 plutôt que d'inhiber son interaction avec le CD40. De plus, l'interaction CD154/CD40 est d'une importance particulière à ce stade, car le CD40 est le seul parmi les récepteurs CD154 capable d'induire le clivage de la molécule, comme précédemment montré par notre groupe [18].

Acteur essentiel dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes, le CD154 a été la cible de nombreuses approches thérapeutiques. A ce sujet, de nombreux anticorps ont été développés contre le CD154, ayant tous une fonction antagoniste vis-à-vis de la molécule et visant à réduire voire bloquer totalement le rôle du CD154 dans la maladie en question. Mais, dans certains états pathologiques, il est nécessaire d'améliorer la fonction du CD154 afin que la maladie soit soulagée, contrôlée ou guérie. En effet, la dyade CD154/CD40 a été impliquée dans les réponses anti-tumorales et donc la cible de plusieurs approches immunothérapeutiques du cancer. Le traitement avec un CD154 recombinant ou avec des anticorps agonistes dirigés contre le CD40, a été évalué dans des modèles animaux ainsi que dans des essais cliniques humains [259-261], cependant il a été démontré qu'ils ont une faible activité par rapport à celle induite par le CD154 [191, 262]. Nos études proposent donc un outil intéressant et probablement très efficace. En effet, cet mAb inhiberait le clivage du CD154 à partir des cellules et maintiendrait la molécule à la surface cellulaire afin d'augmenter sa puissance à induire des réponses immunitaires contre les cellules cancéreuses.

Afin d'évaluer l'effet biologique du Clone 8 et ayant démontré que le mutant CD154-EM résistant au clivage induit une réponse de mort plus prononcée dans les lignées cellulaires B CD40-positives par rapport à la forme clivable CD154-WT de la molécule [233], nous avons évalué le rôle de cet anticorps dans la mort des cellules B. Nos résultats montrent que le Clone 8 agit d'une

façon comparable à celle du mutant CD154-EM résistant au clivage en augmentant la mort des Ramos à un niveau comparable à celui induit par le CD154-EM.

Vu la grande similarité entre le CD154 humain et murin, notre objectif majeur était d'évaluer l'efficacité thérapeutique du Clone 8 mAb dans des modèles de souris. Même si les séquences d'acides aminés montrent 100 % d'homologie au niveau du site de clivage du CD154 humain et murin (¹⁰⁷KENSFEMQ¹¹⁴), nous avons évalué la capacité du Clone 8 à reconnaître le CD154 murin. Nos résultats indiquent clairement que ce dernier reconnaît le CD154 murin exprimé à la surface des cellules, comme le montre l'analyse par FACS et par immunoprécipitation. Ceci nous a permis d'étudier son effet sur les cellules murines. En effet, le Clone 8 s'est avéré capable d'inhiber le clivage de la molécule du milieu intracellulaire comme c'est le cas pour le CD154 humain. Le traitement avec le Clone 8 a inhibé de manière significative la libération spontanée du sCD154 des cellules murines CD154⁺.

Notre étude ouvrira la porte sur la façon d'améliorer l'interaction CD154/CD40 et permettra au clone 8 d'être étudié dans différentes maladies auto-immunes, tel que le Lupus, l'Arthrite rhumatoïde, la Sclérose en plaques et le Cancer. Ainsi, nos résultats permettront le passage de ce dernier au stade des essais cliniques afin de mettre en place un nouveau traitement efficace pour les maladies auto-immunes et le cancer.

Chapitre 7 – Conclusion et perspectives

Lors de ce projet, nous avons réussi à bloquer le clivage enzymatique du CD154 par deux différentes approches. La première consiste en une génération d'une mutation au niveau du site de clivage et la deuxième par un mAb anti CD154 dirigé contre les résidus impliqués. L'inhibition du clivage du CD154 de la surface cellulaire et par conséquent le maintien de son expression membranaire induit une augmentation de son activité biologique. Le CD154 résistant au clivage qui maintient la capacité de se lier au CD40, induit une réponse de mort cellulaire plus prononcée, une prolifération de cellules B importante, et une production plus importante d'immunoglobulines par rapport à la forme clivable du CD154. De plus, il est possible que ce phénomène influence aussi les fonctions biologiques dans les cellules CD154-positives.

Pour les expériences futures, il faudra étudier le rôle du CD154 résistant au clivage dans la maturation et l'activation des cellules dendritiques, un processus de grande importance dans les réponses immunitaires contre le cancer [263, 264]. Afin d'obtenir des cellules dendritiques nous allons isoler les monocytes des PBMC de donneurs sains. Ces derniers seront incubés avec IL-4 et le GM-CSF pour être plus tard cocultivés avec des cellules CD154⁺ +/- Clone 8. Une étude des marqueurs d'activation et de maturation (CD40, CD83, HLA-DR, CD54 et CD86) sera analysée par cytométrie en flux. La production de cytokines, l'IL-12 et l'IL-10, sera aussi évaluée par ELISA. De même il serait intéressant d'étudier l'effet du Clone 8 sur l'activation des monocytes. Comme décrit plus haut une coculture avec des cellules CD154⁺ sera établi et une étude de l'expression du CD16, CD54, CD86, CD163 et CD206 et de la production des cytokines, TNF- α , IL-6, IL-10 et IL-12, sera déterminée.

Étant donné les effets directs apoptotiques et indirects immunostimulants de l'interaction CD154/CD40, et les résultats montrant que le CD154 membranaire est un activateur plus puissant du CD40 que le sCD154 [114, 117], et vu que les réponses induites par le CD40 sont dépendantes de la durée de son exposition au CD154 [265] il est important d'étudier l'effet biologique du Clone 8. Pour étudier le rôle anti-tumoral direct du CD154 non clivé, des cellules T primaires isolées de PBMC de sujets sains seront activées avec anti-CD3/CD28 pour induire une expression optimale

du CD154 sur leur surface. Les cellules T activées seront ajoutées sur les cellules EJ du carcinome de la vessie (CD40⁺) et les cellules HONE du carcinome du nasopharynx (CD40⁻) pré-adhérées. Ces cocultures vont être traitées ou non avec le Clone 8. La prolifération et l'apoptose seront testées par cytométrie en flux (WST-1 et l'AnnexinV).

Pour évaluer les activités anti-tumorales indirectes du CD154 non clivable, une évaluation de sa capacité à induire l'activation des cellules B, à favoriser la différenciation de la lignée M1 des monocytes et à améliorer l'activation et la maturation des cellules dendritiques sera mise en place. Les cellules T de donneurs sains seront co-cultivées avec des cellules B isolées, des monocytes isolés ou avec des cellules dendritiques immatures et stimulées avec un super-antigène, améliorant ainsi l'expression du CD154 à la surface des cellules T. Par la suite l'expression des marqueurs d'activation, de différenciation et de maturation seront évaluées au niveau des cocultures des cellules T/cellules B, cellules T/monocytes ou cellules T/CD immatures, en présence ou en l'absence du Clone 8.

Nos résultats montrent que le Clone 8 reconnaît le CD154 murin exprimé à la surface des cellules. De plus, ce dernier est capable d'inhiber le relargage spontané du CD154 murin. Mais, est ce qu'il sera capable d'inhiber le clivage induit par le CD40 comme c'est le cas pour le CD154 humain? Afin de pouvoir répondre à cette question des 3T3 transfectées avec le mCD154 seront cultivées, en présence ou non du Clone 8, avec une lignée de cellule B exprimant le CD40 (A20). L'inhibition du clivage sera testée par l'analyse de l'expression du CD154 à la surface cellulaire par cytométrie en flux et par le dosage du sCD154 présent dans le surnageant des cellules par ELISA.

Une fois cette inhibition confirmée, il va falloir évaluer l'effet biologique du Clone 8 dans un modèle de cancer murin in-vivo. A ce sujet, des cellules de carcinome du colon MC38 vont être injectées sous cutanée chez des souris C57BL/6 comme décrit précédemment [266]. À partir du jour 4 suivant l'inoculation et tous les 3 jours, les souris seront traitées par voie intrapéritonéale avec un contrôle isotypique, un mAb anti-PD1 murin (comme contrôle positif), le Clone 8, ou une combinaison du Clone 8 et de l'anti-PD1. Les animaux seront observés régulièrement et la taille de la tumeur sera calculée. Les souris seront sacrifiées au jour 15. La tumeur sera excisée et son poids déterminé. On s'attend à ce que le Clone 8 ait une activité antitumorale comparable à celle

de l'anti PD-1. Plusieurs études viennent à l'appui montrant l'efficacité du CD154 membranaire dans le traitement du cancer que ce soit des cellules transfectées ex-vivo avec le CD154 avant leur inoculation chez l'animal ou traitées directement avec un adénovirus codant pour le CD154 [267-270].

Pour étudier le mécanisme d'action de cet anticorps, nous déterminerons les niveaux de cytokines (Th1/Th2) présent dans le sérum de ces souris par cytokine arrays. Des coupes immunohistochimiques des tumeurs et des ganglions seront établis afin d'évaluer les marqueurs des cellules immunitaires.

Afin d'évaluer à la fois l'effet anti-tumoral direct et indirect du Clone 8, des souris seront injectées avec des cellules de mélanome, B16F10, ces cellules expriment le CD40 à leur surface par rapport au carcinome du côlon MC38 qui sont CD40-negative. Nous utiliserons la même approche pour l'implantation et le traitement des tumeurs que celle décrite pour le modèle MC38 ci-dessus. Nous nous attendons à observer une croissance tumorale réduite et des réponses immunitaires améliorées chez les souris traitées avec un le Clone 8 inhibant le clivage du CD154. Nous nous attendons à ce que la réponse anti-tumorale dans les cellules de mélanome B16F10 CD40⁺ soit plus prononcée que celle observée dans les cellules de carcinome du colon MC38 CD40⁻. Dans le cas des cellules B16F10 qui expriment le CD40, nous allons avoir les deux phénomènes direct et indirect. En effet, suite à l'interaction du CD154 avec le CD40 des cellules cancéreuses, la réponse antitumorale est induite directement en arrêtant la croissance des cellules tumorales et en les sensibilisant à l'apoptose. De plus, la croissance tumorale sera aussi affectée indirectement en stimulant le système immunitaire et mettant en place une réponse anti-tumorale à médiation cellulaire. Pour confirmer davantage l'effet du Clone 8, des expériences seront menées sur des souris CD154 KO. Les souris CD154 KO seront traitées comme décrit plus haut et les expériences seront menées en parallèle sur des souris CD154-WT afin de comparer l'effet du Clone 8 sur la tumeur. On s'attend à ce que la croissance tumorale soit beaucoup plus importante chez les souris CD154 KO et que le Clone 8 n'exerce aucun effet comparé au souris CD154-WT où le traitement avec le Clone 8 devrait inhiber significativement la croissance de la tumeur. Ces expériences prouveront donc que l'effet inhibiteur de la croissance tumorale du Clone 8 est spécifique au CD154 et à son inhibition du clivage et non à une toxicité de cet mAb.

Dans le cas de toute complication thromboembolique due à l'utilisation du Clone 8 dans son intégrité, des fragments F(ab) du mAb Clone 8 seront évalués *in vivo* comme ci-dessus.

Les approches immunothérapeutiques impliquant l'interaction CD154/CD40 ont été remises en cause. En effet, un risque accru de toxicité a été observé lors de l'utilisation d'agoniste anti-CD40. De plus, l'utilisation d'un CD154 recombinant s'est avéré d'une faible efficacité dans le traitement anti-tumoral [271] et l'utilisation du CD154 dans la thérapie anti-tumorale n'est pas très réalisable vu le nombre restreint de cellules malignes en circulation et la difficulté de leurs manipulation *ex-vivo* [260]. D'où le besoin d'outils thérapeutiques alternatifs plus performants.

Notre étude fournira donc de nouveaux outils immunothérapeutiques à haut potentiel dans le traitement du cancer augmentant la capacité de survie et améliorant la qualité de vie des patients. Ces données permettront donc le passage du Clone 8 à la phase clinique.

Références bibliographiques

1. Clark, L.B., T.M. Foy, and R.J. Noelle, *CD40 and its ligand*. Adv Immunol, 1996. **63**: p. 43-78.
2. IS, G. and F. RA, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. . Annu Rev Immunol, 1998. **16**.
3. Graf, D., et al., *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(12): p. 3191-4.
4. Lederman, S., et al., *Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help)*. J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 1091-101.
5. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
6. Noelle, R.J., et al., *A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6550-4.
7. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
8. Schönbeck U, M.F., Libby P, *CD154 (CD40 ligand)*. Int J Biochem Cell Biol., 2000. **32**(7): p. 687-93.
9. 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.
10. Gruss, H., 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.
11. Hsu, Y., et al., *Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 911-5.
12. Karpusas, M., et al., *2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand*. Structure, 1995. **3**(12): p. 1426.
13. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses*. Immunol Today, 1996. **17**(9): p. 410-4.
14. Libby, U.S.a.P., *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 2000. **58**,: p. 4-43.
15. Laman, J., E. Claassen, and R. Noelle, *Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L)*. Crit Rev Immunol, 1996. **16**(1): p. 59-108.
16. 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.
17. Fabienne Pietravalle, S.L.-H., et al., *Human Native Soluble CD40L Is a Biologically Active Trimer, Processed Inside Microsomes**. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1996. **271**: p. 5965–5967.

18. Yacoub, D., et al., *CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner*. J Biol Chem, 2013. **288**(50): p. 36083-93.
19. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
20. Tamura, N., et al., *Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis*. J Rheumatol, 2001. **28**(12): p. 2583-90.
21. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1104-11.
22. Kato, K., et al., *The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 947-55.
23. Alaaeddine, N., et al., *CD154: an immunoinflammatory mediator in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 490148.
24. Mazzei, G.J., et al., *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7025-8.
25. Roy, M., et al., *Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 596-603.
26. Søren Skov, M.B., Niels Ødum, and Jeffrey A. Ledbetter, *IL-2 and IL-15 Regulate CD154 Expression on Activated CD4 T Cells*. The Journal of Immunology, 2000. **164**: p. 3500-3505.
27. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
28. Monte M Winslow, J.R.N.a.G.R.C., *Calcium signalling in lymphocytes*. Current Opinion in Immunology, 2003. **15**: p. 299-307.
29. Oxana Dobrovinskaya, I.D.-E., Laura Johanna Quintero-Castro, and R.M.R.-S. Carlos Best-Aguilera, and Igor Pottosin, *Placing Ion Channels into a Signaling Network of T Cells: From Maturing Thymocytes to Healthy T Lymphocytes or Leukemic T Lymphoblasts*. BioMed Research International, 2015. **10.1155**.
30. Iannis Aifantis, F.G., Luca Scorrano, Christine Borowski and Harald von Boehmer, *Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF- κ B and NFAT*. nature immunology, 2001. **2**: p. 403-409.
31. Wu Shu-Fen, C.-B.C., Jui-Mei Hsu, Ming-Chi Lu, Ning-Sheng Lai, Chin Li and Chien-Hsueh Tung, *Hydroxychloroquine inhibits CD154 expression in CD4+ T lymphocytes of systemic lupus erythematosus through NFAT, but not STAT5, signaling*. Arthritis Research & Therapy, 2017. **19**.
32. Leveille, C., et al., *CD40 Ligand Binds to α 5 β 1 Integrin and Triggers Cell Signaling*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(8): p. 5143-5151.
33. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
34. Yoko K. Takada, J.Y., Michiko Shimoda and Yoshikazu Takada, *Integrin Binding to the Trimeric Interface of CD40L Plays a Critical Role in CD40/CD40L Signaling*. J Immunol, 2019. **10.4049**: p. 1383-1391.
35. Takada, Y.K., et al., *Soluble CD40L activates soluble and cell-surface integrin α v β 3, α 5 β 1, and α 4 β 1 by binding to the allosteric ligand-binding site (site 2)*. J Biol Chem, 2021. **296**: p. 100399.

36. Paulie S, E.-H.B., Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P., *Ap50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother* 1985. **20(1)**: p. 23-28.
37. Clark EA, L.J., *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986. **83(12)**: p. 4494-4498.
38. Lafage Pochitaloff, M., et al., *Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2*. *Leukemia*, 1994. **8(7)**: p. 1172-5.
39. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 881-922.
40. Alturaihi, H., et al., *Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals*. *Eur J Immunol*, 2015. **45(2)**: p. 592-602.
41. Hassan, G.S., et al., *Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses*. *Curr Immunol Rev*, 2009. **5**: p. 285-299.
42. Mukundan, L., et al., *CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway*. *Cell Signal*, 2004. **16(3)**: p. 375-84.
43. 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.
44. 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.
45. Nadiri, A., et al., *Involvement of the cytoplasmic cysteine-238 of CD40 in its up-regulation of CD23 expression and its enhancement of TLR4-triggered responses*. *Int Immunol*, 2015.
46. 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. 7799-7806.
47. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W. Mourad, *CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases*. *Immunobiology*, 2011.
48. ETTY N. Benveniste, V.T.N., Duane R. Wesemann, *Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia*. 2004. **18**: p. 7-12.
49. Hongwei Qin, C.A.W., Sun Jung Lee, Xueyan Zhao, and ETTY N. Benveniste, *LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- κ B and STAT-1 in macrophages and microglia*. *Blood*, 2005. **106**: p. 3114-3122.
50. Masahide Tone, Y.T., Jennifer M. Babik, Chun-Yen Lin, and Herman Waldmann, *The Role of Sp1 and NF- κ B in Regulating CD40 Gene Expression*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2002. **277**: p. 8890–8897.
51. V. Nguyen, W.S.W., E.N. Benveniste, *Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor- β* . *Eur. J. Immunol.*, 1998. **28**: p. 2537-2548.
52. V. Nguyen, E.N.B., *Interleukin-4 activated STAT-6 inhibits IFN- γ induced CD40 gene expression in macrophages/microglia*. *J. Immunol.*, 2000. **165**: p. 6235-6243.
53. Brodeur, S.R., et al., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. *Immunity*, 2003. **18(6)**: p. 837-48.

54. 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.
55. Oksjoki R, K.P., Mäyränpää MI, Laine P, Blom AM, Meri S, Pentikäinen MO., *Complement regulation in human atherosclerotic coronary lesions. Immunohistochemical evidence that C4b-binding protein negatively regulates the classical complement pathway, and that C5b-9 is formed via the alternative complement pathway*. Atherosclerosis., 2007. **192**(1): p. 40-48.
56. Lindquist S, C.E., *The heat-shock proteins*. Annu Rev Genet., 1988. **22**: p. 631-77.
57. 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.
58. Aoudjit, F.V., K., *Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance*. Chemother. Res. Pract., 2012. **2012**: p. 283181.
59. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
60. Takada, Y., X. Ye, and S. Simon, *The integrins*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. 215.
61. Gahmberg CG1, F.S., Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M., *Regulation of integrin activity and signalling*. Biochim Biophys Acta., 2009. **1790**(6): p. 431-44.
62. Naci D, V.K., Aoudjit F, *Alpha2beta1 integrin in cancer development and chemoresistance*. 35, 2015. **Semin Cancer Biol.**: p. 145-153.
63. MH, G., *Integrin activation*. BMB Rep., 2014. **47**: p. 655-659.
64. Huang J, L.X., Shi X, Zhu M, Wang J, Huang S, Huang X, Wang H, Li L, Deng H, Zhou Y, Mao J, Long Z, Ma Z, Ye W, Pan J, Xi X, Jin J, *Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting*. J Hematol Oncol. , 2019. **12**.
65. Zhou L, J.M., Shen H, You T, Ding Z, Cui Q, Ma Z, Yang F, Xie Z, Shi H, Su J, Cao L, Lin J, Yin J, Dai L, Wang H, Wang Z, Yu Z, Ruan C, Xia L, *Clinical and molecular insights into Glanzmann's thrombasthenia in China*. Clin Genet., 2018. **94**: p. 213-220.
66. El Fakhry, Y., et al., *Functional Interaction of CD154 Protein with α 5 β 1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to α IIb β 3 Integrin and CD40 Molecules*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 18055-66.
67. Robinson EE, Z.K., Corbett SA, Foty RA., *α 5 β 1 integrin mediates strong tissue cohesion*. Journal of Cell Science, 2003. **116**: p. 377-386.
68. Lim J, H.N., *Signalling mechanisms of the leukocyte integrin α M β 2: current and future perspectives*. Biol Cell., 2012 Nov. **104**(11): p. 631-40.
69. Solovjov DA, P.E., Plow EF., *Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin α M β 2*. J Biol Chem., 2005. **280**: p. 1336-1345.
70. Wolf, D., et al., *Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice*. Circ Res, 2011. **109**(11): p. 1269-79.
71. Horton, M.A., *The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor"*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(5): p. 721-5.
72. Zoppi N, C.N., Ritelli M, Colombi M., *Multifaced Roles of the α v β 3 Integrin in Ehlers-Danlos and Arterial Tortuosity Syndromes' Dermal Fibroblasts*. Int J Mol Sci., 2018. **19**: p. 982.

73. Takada YK, Y.J., Shimoda M, Takada Y., *Integrin Binding to the Trimeric Interface of CD40L Plays a Critical Role in CD40/CD40L Signaling*. J Immunol. , 2019. **203**(5): p. 1383-1391.
74. Yang, G.X. and W.K. Hagmann, *VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration*. Med Res Rev, 2003. **23**(3): p. 369-92.
75. Cox, D., M. Brennan, and N. Moran, *Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(10): p. 804-20.
76. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling*. Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 131-51.
77. Elgueta R1, B.M., de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev., 2009. **229**(1): p. 152-72.
78. Zapata JM, M.-G.V., Lefebvre S, *Phylogeny of the TRAF/MATH domain*. Adv Exp Med Biol., 2007. **597**: p. 1-24.
79. Bradley JR, P.J., *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)*. Oncogene, 2001 Oct 1. **20**(44): p. 6482-91.
80. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 775-86.
81. Lee SY, C.Y., *TRAF1 and its biological functions*. Adv Exp Med Biol., 2007. **597**: p. 25-31.
82. Xu LG, L.L., Shu HB., *TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis*. J Biol Chem, 2004 Apr 23. **279**(17): p. 17278-82.
83. P., X., *TRAF molecules in cell signaling and in human diseases*. J Mol Signal., 2013. **8**.
84. Arron, J.R., et al., *Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 923-34.
85. Xie, P., et al., *Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5388-400.
86. Chand Dakal T, D.B., Agarwal D, Gupta R, Nagda G, Meena AR, Dhakar R, Menon A, Mathur R, Mona, Yadav V, Sharma A, *Mechanistic basis of co-stimulatory CD40-CD40L ligation mediated regulation of immune responses in cancer and autoimmune disorders*. Immunobiology. , 2020. **225**.
87. Bishop GA, S.L., Hostager BS., *TRAF3 as a Multifaceted Regulator of B Lymphocyte Survival and Activation*. Front Immunol., 2018. **9**: p. 2161.
88. Pullen, S.S., et al., *CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14246-54.
89. Davies, C.C., et al., *TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(22): p. 9806-19.
90. Grammer, A.C., et al., *TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1183-93.
91. Georgopoulos, N.T., et al., *A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation*. Cell Death Differ, 2006. **13**(10): p. 1789-801.

92. 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.
93. Hanissian, S. and R. Geha, *Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells*. *Immunity*, 1997. **6**(4): p. 379-87.
94. Dadgostar, H., et al., *Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(3): p. 1497-502.
95. 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.
96. Jabara HH, B.R., Roberts JL, Lefranc G, Loiselet J, Khalil G, Geha RS., *Role of JAK3 in CD40-mediated signaling*. *Blood.*, 1998. **92**: p. 2435-40.
97. Meng X, Y.B., Suen WC, *Prospects for modulating the CD40/CD40L pathway in the therapy of the hyper-IgM syndrome*. *Innate Immun.* , 2018. **24**: p. 4-10.
98. Qamar N, F.R., *The hyper igm syndromes*. *Clinical reviews in allergy & immunology.* , 2014. **46**: p. 120-130.
99. Kawabe T, M.M., Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y., *CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity*. *Nagoya J Med Sci.*, 2011. **73**: p. 69-78.
100. Xu, J., et al., *Mice deficient for the CD40 ligand*. *Immunity*, 1994. **1**(5): p. 423-31.
101. Foy, T., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 591-617.
102. Kawabe, T., et al., *The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 167-78.
103. Karnell JL, R.S., Ettinger R, Kolbeck R., *Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond*. *Adv Drug Deliv Rev.* , 2019. **141**: p. 92-103.
104. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2004. **53**(7): p. 1035-43.
105. van Essen, D., H. Kikutani, and D. Gray, *CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function*. *Nature*, 1995. **378**(6557): p. 620-3.
106. Blotta, M.H., et al., *Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis*. *J Immunol*, 1996. **156**(9): p. 3133-40.
107. Brenner, B., et al., *Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a signalling molecule in T-lymphocytes*. *FEBS Lett*, 1997. **417**: p. 301-6.
108. El Fakhry, Y., et al., *Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 770-9.
109. 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.
110. 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.
111. Leveille, C., et al., *CD40- and HLA-DR-mediated cell death pathways share a lot of similarities but differ in their use of ADP-ribosyltransferase activities*. *Int Immunol*, 1999. **11**(5): p. 719-30.
112. Al-Zoobi, L., et al., *Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface*. *Int Immunol*, 2014.

113. Baxendale, A.J., et al., *Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth*. *Oncogene*, 2005. **24**(53): p. 7913-23.
114. Elmetwali, T., et al., *CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 52.
115. Jundi, M., et al., *CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment*. *Immunobiology*, 2011.
116. Franklin RA, M.J., *Kinases: positive and negative regulators of apoptosis*. *Leukemia*. , 2000. **14**: p. 2019-34.
117. Elmetwali, T., L.S. Young, and D.H. Palmer, *CD40 ligand-induced carcinoma cell death: a balance between activation of TNFR-associated factor (TRAF) 3-dependent death signals and suppression of TRAF6-dependent survival signals*. *J Immunol*, 2010. **184**(2): p. 1111-20.
118. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. *Nat Med*, 2002. **8**(3): p. 247-52.
119. 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. Epub 2003 Sep 30.
120. Loubaki, L., et al., *Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction*. *Mol Immunol*, 2010. **47**(11-12): p. 2112-8.
121. Bachsais M, N.N., Yacoub D, Salti S, Alaaeddine N, Aoudjit F, Hassan GS, Mourad W. , *The Interaction of CD154 with the alpha5beta1 Integrin Inhibits Fas-Induced T Cell Death*. *PLoS One*, 2016.
122. Li, G., et al., *CD40 Ligand Promotes Mac-1 Expression, Leukocyte Recruitment, and Neointima Formation after Vascular Injury*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(4): p. 1141-52.
123. 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.
124. Swaak AJ, A.L., Statius van Eps LW, Feltkamp TE., *Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1979. **(3)**: p. 226-35.
125. Gualtierotti R1, B.M., Penatti AE, Meroni PL., *Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Autoimmun Rev.*, 2010
126. Folzenlogen D1, H.M., Leung DY, Freed JH, Newell MK., *Analysis of CD80 and CD86 expression on peripheral blood B lymphocytes reveals increased expression of CD86 in lupus patients*. *Clin Immunol Immunopathol.*, 1997. **3**: p. 199-204.
127. Desai Mehta, A., et al., *Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(9): p. 2063-73.
128. Grammer, A.C., et al., *Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(10): p. 1506-20.
129. Koshy, M., D. Berger, and M. Crow, *Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(3): p. 826-37.
130. Higuchi, T., et al., *Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease*. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 9-12.

131. Katsiari, C.G., et al., *Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol, 2002. **103**(1): p. 54-62.
132. Goules, A., et al., *Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases*. Journal of Autoimmunity, 2006. **26**(3): p. 165-171.
133. Nagafuchi, H., et al., *Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(1): p. 71-7.
134. Yellin, M., et al., *Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(1): p. 124-34.
135. Delmas, Y., et al., *Activation of mesangial cells by platelets in systemic lupus erythematosus via a CD154-dependent induction of CD40*. Kidney Int, 2005. **68**(5): p. 2068-78.
136. Mohan C, P.C., *Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. Nat Rev Nephrol., 2015. **11**(6): p. 329-41.
137. Early, G., W. Zhao, and C. Burns, *Anti-CD40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of New Zealand black x New Zealand white mice. Response correlates with the absence of an anti-antibody response*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 3159-64.
138. Kalled, S.L., et al., *Anti-CD40 ligand antibody treatment of SNF1 mice with established nephritis: preservation of kidney function*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2158-65.
139. Wang X, H.W., Schiffer LE, Mihara M, Akkerman A, Hiromatsu K, Davidson A., *Effects of anti-CD154 treatment on B cells in murine systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum., 2003. **48**(2): p. 495-506.
140. Perper SJ, W.S., Karman J, Twomey R, Seagal J, Wang R, McRae BL, Clarke SH., *Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus*. J Immunol. , 2019 **203**(1): p. 58-75.
141. Bae SC, L.Y., *Association between CD40 polymorphisms and systemic lupus erythematosus and correlation between soluble CD40 and CD40 ligand levels in the disease: a meta-analysis*. Lupus. , 2019. **28**(12): p. 1452-1459.
142. Xiang Yang, G.J., Peng You-Fan, Huang Hua-Tuo, Lan Yan, Wei Ye-Sheng, *Serum CD154 Level With Systemic Lupus Erythematosus in Chinese Population*. Rheumatol Int, 2017. **37**(8): p. 1287-1294.
143. Firestein, G.S., *The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 471-4.
144. Lai Jenn-Haung, L.S.-F.a.H.L.-J., *Targeting the CD40-CD154 Signaling Pathway for Treatment of Autoimmune Arthritis*. cells, 2019. **8**(8).
145. Cope, A.P., *T cells in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2008. **10 Suppl 1**: p. S1.
146. Panayi, G.S., *B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?* Rheumatology (Oxford), 2005. **44 Suppl 2**: p. ii3-ii7.
147. Harigai, M., et al., *Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes*. J Rheumatol, 1999. **26**(5): p. 1035-43.

148. Pamuk, G.E., et al., *Increased platelet activation markers in rheumatoid arthritis: are they related with subclinical atherosclerosis?* Platelets, 2008. **19**(2): p. 146-54.
149. MacDonald, K.P.A., et al., *Functional CD40 Ligand Is Expressed by T Cells in Rheumatoid Arthritis.* J. Clin. Invest., 1997. **100**(9): p. 2404-2414.
150. Liu, M.F., et al., *Expression of CD40 and CD40 ligand among cell populations within rheumatoid synovial compartment.* Autoimmunity, 2001. **34**(2): p. 107-13.
151. Malik, N., et al., *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases.* J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3952-60.
152. B., B.F.M.a.M.I., *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis.* J Clin Invest., 2008. **118**(11): p. 3537–3545.
153. Durie, F.H., et al., *Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40.* Science, 1993. **261**(5126): p. 1328-30.
154. Tellander, A.C., et al., *Potent adjuvant effect by anti-CD40 in collagen-induced arthritis. Enhanced disease is accompanied by increased production of collagen type-II reactive IgG2a and IFN-gamma.* J Autoimmun, 2000. **14**(4): p. 295-302.
155. Zheng, X., et al., *RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis.* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. R13.
156. García-Bermúdez Mercedes, C.G.-J., Raquel López-Mejías, María Teruel, Alfonso Corrales, José A. Miranda-Filloo, Santos Castañeda, Alejandro Balsa, Benjamín Fernández-Gutierrez, Isidoro González-Álvaro, Carmen Gómez-Vaquero, Ricardo Blanco, Javier Llorca, Javier Martín, and Miguel A. González-Gay *Study of Association of CD40-CD154 Gene Polymorphisms with Disease Susceptibility and Cardiovascular Risk in Spanish Rheumatoid Arthritis Patients.* PLoS One., 2012. **7**(11).
157. Raychaudhuri, S., et al., *Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis.* Nat Genet, 2008. **40**(10): p. 1216-23.
158. Jacobson EM, T.Y., *The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future.* J Autoimmun. , 2007. **28**(2-3): p. 85-98.
159. Kie JH, C.M., Yang WI., *Expression of CD40 and apoptosis related molecules in autoimmune thyroid diseases.* Yonsei Med J, 2001. **42**(5): p. 488-96.
160. Jacobson, E.M., et al., *A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression.* Genes Immun, 2007. **8**(3): p. 205-14.
161. Bruck, W., *The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage.* J Neurol, 2005. **252 Suppl 5**: p. v3-9.
162. Sospedra M1, M.R., *Immunology of multiple sclerosis.* Annu Rev Immunol. , 2005. **23**: p. 683-747.
163. Fillion, L.G., et al., *Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis.* Clin Immunol, 2003. **106**(2): p. 127-38.
164. Grewal, I.S., et al., *Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis.* Science, 1996. **273**(5283): p. 1864-7.

165. Gerritse, K., et al., *CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2499-504.
166. Mariño E, G.S., *A new role for an old player: do B cells unleash the self-reactive CD8+ T cell storm necessary for the development of type 1 diabetes?* J Autoimmun., 2008. **31**(3): p. 301-5.
167. Roep BO, A.M., von Herrath M., *Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes*. Nat Rev Immunol., 2004. **4**(12): p. 989-97.
168. Balasa, B., et al., *CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4620-7.
169. Barbé-Tuana FM, K.D., Ichii H, Berman DM, Coffey L, Kenyon NS, Ricordi C, Pastori RL., *CD40-CD40 ligand interaction activates proinflammatory pathways in pancreatic islets*. Diabetes., 2006. **55**(9): p. 2437-45.
170. Wagner DH Jr, V.G., Sanderson R, Poulin M, Dobbs C, Haskins K., *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.
171. Waid DM, W.R., Putnam A, Vaitaitis GM, Pennock ND, Calverley DC, Gottlieb P, Wagner DH Jr., *A unique T cell subset described as CD4^{lo}CD40⁺ T cells (TCD40) in human type 1 diabetes*. Clin Immunol., 2007. **124**(2): p. 138-48.
172. Gajendran M, L.P., Catinella AP, Hashash JG., *A comprehensive review and update on Crohn's disease*. Dis Mon., 2018. **64**(2): p. 20-57.
173. Senhaji N, K.K., Darif Y, Fadainia C, Zaid Y., *The Contribution of CD40/CD40L Axis in Inflammatory Bowel Disease: An Update*. Front Immunol., 2015. **6**(529).
174. Danese S, d.l.M.C., Sturm A, Vogel JD, West GA, Strong SA, Katz JA, Fiocchi C., *Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients*. Gastroenterology., 2003. **124**(5): p. 1249-64.
175. Ludwiczek O, K.A., Tilg H, *Plasma levels of soluble CD40 ligand are elevated in inflammatory bowel diseases*. Int J Colorectal Dis. , 2003. **18**(2): p. 142-7.
176. Liu, Z., et al., *Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 6005-14.
177. Kasran A, B.L., Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL., *Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther. , 2005. **22**(2): p. 111-22.
178. 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.
179. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 508-19.
180. Mach, F., et al., *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling*. Nature, 1998. **394**(6689): p. 200-3.
181. Lutgens, E., et al., *Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7464-9.

182. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1313-6.
183. Engel, D., et al., *The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 308-12.
184. Bosmans LA, B.L., Kusters PJH, Lutgens E, Seijkens TTP., *The CD40-CD40L Dyad as Immunotherapeutic Target in Cardiovascular Disease*. J Cardiovasc Transl Res. , 2020.
185. Lutgens, E. and M.J. Daemen, *CD40-CD40L interactions in atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(1): p. 27-32.
186. Parker, D.C., et al., *Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9560-4.
187. Larsen, C.P., et al., *Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways*. Nature, 1996. **381**(6581): p. 434-8.
188. Hancock, W., et al., *Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13967-72.
189. Paulie, S., et al., *The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 590-5.
190. Bussolati, B., et al., *Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis*. Int J Cancer, 2002. **100**(6): p. 654-61.
191. Hassan, G.S., J. Stagg, and W. Mourad, *Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(5): p. 431-40.
192. Younes, A., et al., *Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 135-41.
193. Roselli, M., et al., *Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(2): p. 610-4.
194. Mielczarek-Palacz, A., et al., *Imbalance in serum soluble CD30/CD30L and CD40/CD40L systems are associated with ovarian tumors*. Hum Immunol, 2013. **74**(1): p. 70-4.
195. Challa, A., et al., *Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3411-8.
196. Li, D., et al., *Autocrine TNF-alpha-mediated NF-kappaB activation is a determinant for evasion of CD40-induced cytotoxicity in cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(3): p. 467-72.
197. Ho H. Lee, H.D., Qingwen Cheng, Junyan Shu, and Genhong Cheng, *NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**(16): p. 9136-9141.
198. Davies, C.C., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1010-9. Epub 2003 Oct 27.
199. Furman, R.R., et al., *Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2200-6.

200. Hayward, A.R., et al., *Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 977-83.
201. Beatty, G.L., et al., *CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1612-6.
202. French, R.R., et al., *CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 548-53.
203. Eliopoulos, A.G., et al., *CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5503-15.
204. Hirano, A., Longo, D. L., Taub, D. D., Ferris, D. K., Young, L. S., Eliopoulos, A. G., Agathangelou, A., Cullen, N., Macartney, J., Fanslow, W. C., Murphy, W. J., *Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand*. Blood, 1999. **93**: p. 2999–3007.
205. Alex W Tong , M.J.S., *Prospects for CD40-directed Experimental Therapy of Human Cancer*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(1): p. 1-13.
206. Alexandroff AB, J.A., Paterson T, Haley JL, Ross JA, Longo DL, Murphy WJ, James K, Taub DD., *Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours*. Mol Immunol. , 2000 **37**(9): p. 515-26.
207. Carbone, E., et al., *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2053-60.
208. Turner, J.G., et al., *Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 89-94.
209. Luheshi, N., G. Davies, and J. Legg, *Understanding the influence of the tumor microenvironment on macrophage responses to CD40 agonists*. Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27615.
210. Piechutta Manuel, B.A.S., *New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of Cluster of Differentiation 40 (CD40/TNFR5)*. ESMO Open, 2019. **4**(3).
211. Tutt L Alison, O.B.L., Hussain Akmal , Crowther Graham R, French Ruth R, Glennie Martin J *T Cell Immunity to Lymphoma Following Treatment With anti-CD40 Monoclonal Antibody*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2720-8.
212. Liu, Y., et al., *Intratumoral administration of immature dendritic cells following the adenovirus vector encoding CD40 ligand elicits significant regression of established myeloma*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(2): p. 122-32.
213. Ghamande S , H.B.L., Oflazoglu E, Lele S, Fanslow W, Repasky E A, *Recombinant CD40 Ligand Therapy Has Significant Antitumor Effects on CD40-positive Ovarian Tumor Xenografts Grown in SCID Mice and Demonstrates an Augmented Effect with Cisplatin1*. Cancer Res, 2001. **61**(20): p. 7556-62.
214. Bugajska, U., et al., *The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(18): p. 1381-95.
215. Elmetwali T, S.A., Palmer D H *NORE1A Induction by Membrane-Bound CD40L (mCD40L) Contributes to CD40L-induced Cell Death and G1 Growth Arrest in p21-mediated Mechanism*. Cell Death Dis, 2016. **7**(3).
216. Elmetwali T, S.A., Wei W, Hussain SA, Young LS, Palmer DH., *CD40L membrane retention enhances the immunostimulatory effects of CD40 ligation*. Sci Rep., 2020. **10**(1).

217. Law Che-Leung , G.I.S., *Therapeutic Interventions Targeting CD40L (CD154) and CD40: The Opportunities and Challenges*. Adv Exp Med Biol, 2009. **647**: p. 8-36.
218. S E McKenzie , S.M.T., P Malladi, H Yuhan, D L Cassel, P Chien, E Schwartz, A D Schreiber, S Surrey, M P Reilly, *The Role of the Human Fc Receptor Fc Gamma RIIA in the Immune Clearance of Platelets: A Transgenic Mouse Model*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4311-8.
219. Xie Jenny H. , Y.A.P., Borowski Virna , Kuhn Robert, Susulic Vojkan, Sandra Rex-Rabe, Xiaoxia Yang, Xiadi Zhou, Yifan Zhang, Kathleen Gillooly, Ruth Brosius, Rathna Ravishankar, Kimberly Waggle, Kathy Mink, Laura Price, Robert Rehfuss, James Tamura, Yongmi An, Lin Cheng, Bozena Abramczyk, Olga Ignatovich, Philip Drew, Steven Grant, James W. Bryson, Suzanne Suchard, Luisa Salter-Cid, Steven Nadler and Anish Suri, *Engineering of a novel anti-CD40L domain antibody for treatment of autoimmune diseases*. J Immunol. , 2014. **192**(9): p. 4083-4092.
220. Boumpas, D.T., et al., *A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 719-27.
221. Kalunian, K.C., et al., *Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(12): p. 3251-8.
222. Ferrant Janine L. , B.C.D., Anne H. Cutler, Susan L. Kalled, Yen-Ming Hsu, Ellen A. Garber, Donna M. Hess, Renee I. Shapiro, Norma S. Kenyon, David M. Harlan, Allan D. Kirk, Linda C. Burkly, Frederick R. Taylor, *The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge*. 16, 2004. **11**(1583-1594).
223. Kim S C, W.W., Higginbotham L B, Mathews D V, Breeden C P, Stephenson A C, Jenkins J, Strobert E , Price K, Price L , Kuhn R, Wang H, Yamniuk A, Suchard S, Farris A B, Pearson T C, Larsen C P, Ford M L, Suri A, Nadler S, Adams A B *Fc-Silent Anti-CD154 Domain Antibody Effectively Prevents NonHuman Primate Renal Allograft Rejection*. Am J Transplant, 2017. **17**(5): p. 1182-1192.
224. Shock Anthony, B.L., Wakefield Ian, Peters Christopher, Garber Ellen, Ferrant Janine, Taylor Frederick R, Su Lihe, Hsu Yen-Ming, Hutto David, Amirkhosravi Ali, Meyer Todd, Francis John, Malcolm Sarah, Robinson Martyn , Brown Derek, Shaw Stevan, Foulkes Roland, Lawson Alastair, Harari Olivier, Bourne Timothy, Maloney Alison, Weir Neil *CDP7657, an anti-CD40L Antibody Lacking an Fc Domain, Inhibits CD40L-dependent Immune Responses Without Thrombotic Complications: An in Vivo Study*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**(1): p. 234.
225. Chen Jinshui, S.Y., Bojadzic Damir, Tamayo-Garcia Alejandro, Landin Ana Marie, Blomberg Bonnie B, Buchwald Peter., *Small-Molecule Inhibitors of the CD40-CD40L Costimulatory Protein-Protein Interaction*. J Med Chem, 2017. **60**(21): p. 8906-8922.
226. Vonderheide, R.H., et al., *Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients*. J Clin Oncol, 2001. **19**(13): p. 3280-7.
227. Korniluk Aleksandra, K.H., Dymicka-Piekarska Violetta, *Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity*. Tumour Biol. , 2014. **35**(10): p. 9447-9457.
228. Vonderheide, R.H. and M.J. Glennie, *Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1035-43.

229. Malmström Per-Uno , L.A.S.I., Lindqvist Camilla A., Mangsbo Sara M., Fransson Moa, Wanders Alkwin, Gårdmark Truls and Tötterman Thomas H., *AdCD40L Immunogene Therapy for Bladder Carcinoma—The First Phase I/IIa Trial*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3279-87.
230. Xu Wei, L.Y., Wang Xueli, Wang Cuiyu, Zhao Weihong, Wu Jianqing, *Anti-tumor Activity of Gene Transfer of the Membrane-Stable CD40L Mutant Into Lung Cancer Cells*. Jianqing, 2010. **37**(4): p. 935-941.
231. Hassan GS, M.Y., Mourad WM., *CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies*. Trends Immunol., 2009
232. 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.
233. Elmetwali, T., A. Salman, and D.H. Palmer, *NORE1A induction by membrane-bound CD40L (mCD40L) contributes to CD40L-induced cell death and G1 growth arrest in p21-mediated mechanism*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2146.
234. Elmetwali, T., et al., *CD40L membrane retention enhances the immunostimulatory effects of CD40 ligation*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 342.
235. 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.
236. Chambers, J.R. and K. Sauer, *Detection of Cyclic di-GMP Binding Proteins Utilizing a Biotinylated Cyclic di-GMP Pull-Down Assay*. Methods Mol Biol, 2017. **1657**: p. 317-329.
237. Deambrosis, I., et al., *Inhibition of CD40-CD154 costimulatory pathway by a cyclic peptide targeting CD154*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(2): p. 181-97.
238. Vaitaitis, G.M., et al., *A CD40-targeted peptide controls and reverses type 1 diabetes in NOD mice*. Diabetologia, 2014. **57**(11): p. 2366-73.
239. Damir Bojadzic , Jinshui Chen , Oscar Alcazar and Peter Buchwald, *Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Immunomodulatory Small Molecules Targeting the CD40–CD154 Costimulatory Protein-Protein Interaction*. Molecules, 2018. **23**(5) doi:10.3390.
240. Salti S, A.-Z.L., Darif Y, Hassan GS, Mourad W, *CD154 Resistant to Cleavage from Intracellular Milieu and Cell Surface Induces More Potent CD40-Mediated Responses*. J Immunol., 2021. **206**(8): p. 1793-1805.
241. Salti, S., et al., *Monoclonal Antibody Targeting the CD154 Cleavage Site Inhibits CD40-Dependent and -Independent Cleavage of CD154 from the Cell Surface*. Immunohorizons, 2021. **5**(7): p. 590-601.
242. Masuta, Y., et al., *Gene transfer of noncleavable cell surface mutants of human CD154 induces the immune response and diminishes systemic inflammatory reactions*. J Immunother, 2007. **30**(7): p. 694-704.
243. Yellin, M.J., et al., *CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function*. J Immunol, 1994. **152**(2): p. 598-608.
244. Cayabyab, M., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, *CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 1994. **152**(4): p. 1523-31.

245. Brenner, B., et al., *The CD40 ligand directly activates T-lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(1): p. 11-7.
246. Koppenhoefer, U., et al., *The CD40-ligand stimulates T-lymphocytes via the neutral sphingomyelinase: a novel function of the CD40-ligand as signalling molecule*. FEBS Lett, 1997. **414**(2): p. 444-8.
247. Blair, P.J., et al., *CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 651-60.
248. Henn, V., et al., *The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1047-54.
249. Pietravalle, F., et al., *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 5965-7.
250. Jin, Y., et al., *Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets*. J Med Dent Sci, 2001. **48**(1): p. 23-7.
251. Reiss, K. and S. Bhakdi, *The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017. **1864**(11 Pt B): p. 2082-2087.
252. Funakoshi, S., et al., *Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation*. Blood, 1994. **83**(10): p. 2787-94.
253. Hess, S. and H. Engelmann, *A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 159-67.
254. Neron, S., et al., *Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction*. Immunology, 2005. **116**(4): p. 454-63.
255. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
256. Kirk, A.D., et al., *CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8789-94.
257. Kirk, A.D., et al., *Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 686-93.
258. Kawai, T., et al., *Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 114.
259. Gonzalez-Carmona, M.A., et al., *CD40ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 157-68.
260. Wierda, W.G., et al., *A phase I study of immune gene therapy for patients with CLL using a membrane-stable, humanized CD154*. Leukemia, 2010. **24**(11): p. 1893-900.
261. Ruter, J., et al., *Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(10): p. 983-93.
262. Hassan, S.B., et al., *Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014. **36**(2): p. 96-104.
263. Fong, L. and E.G. Engleman, *Dendritic cells in cancer immunotherapy*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 245-73.

264. Huber, A., et al., *Current State of Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Opportunities for in vitro Antigen Loading of Different DC Subsets?* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2804.
265. Lee, B.O., et al., *The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12.* J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 693-704.
266. Stagg, J., et al., *CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis.* Cancer Res, 2011. **71**(8): p. 2892-900.
267. Kikuchi, T. and R.G. Crystal, *Anti-tumor immunity induced by in vivo adenovirus vector-mediated expression of CD40 ligand in tumor cells.* Hum Gene Ther, 1999. **10**(8): p. 1375-87.
268. Kikuchi, T., et al., *Tumor regression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing CD40 ligand and naive dendritic cells.* Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6391-5.
269. Hanyu, K., et al., *Immunogene therapy by adenovirus vector expressing CD40 ligand for metastatic liver cancer in rats.* Anticancer Res, 2008. **28**(5A): p. 2785-9.
270. Sorenmo, K.U., et al., *CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24167.
271. Castro, J.E., et al., *Gene immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia: a phase I study of intranodally injected adenovirus expressing a chimeric CD154 molecule.* Cancer Res, 2012. **72**(12): p. 2937-48.

