

Université de Montréal

**Le rôle biologique de l'interaction du CD40L avec
l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des lymphocytes T**

par

Nadim Naddaf

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Février, 2012

© Nadim Naddaf, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle biologique de l'interaction du CD40L avec
l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des lymphocytes T**

Présenté par :

Nadim Naddaf

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques Thibodeau, président-rapporteur

Dr. Walid Mourad, directeur de recherche

Dre. Nada Alaaddeine, co-directeur

Dre. Naglaa Shoukry, membre du jury

Résumé

Le CD40 ligand (CD40L) est un régulateur important de la réponse immunitaire et un contributeur clé dans les maladies auto-immunes. Nous avons rapporté précédemment que le CD40L se liait à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, toutefois, les conséquences fonctionnelles de cette interaction demeurent inconnues. Les lymphocytes T sont au centre de la pathogénèse des maladies auto-immunes. Ils expriment, lors de celles-ci, des quantités aberrantes d'intégrines $\beta 1$ faisant en sorte que la liaison CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait être d'une haute importance dans les réponses inflammatoires. Dans cette étude, nous avons démontré que la forme soluble du CD40L (sCD40L) se liait aux lymphocytes T primaires ainsi qu'aux cellules Jurkat E6.1 et ce, dépendamment de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. L'interaction du CD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ lymphocytaire a induit l'activation des voies anti-apoptotiques dont les MAPKs (les protéines kinases mitogène activée) et les PI3 kinases (PI3K). La liaison du sCD40L à l' $\alpha 5\beta 1$ n'a pas induit son changement structural ni son adhésion à la FN (fibronectine). Ceci pourrait avoir des conséquences directes sur la survie des cellules T lors de la progression des maladies inflammatoires. Ces résultats soulignent l'impact de l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ sur la fonction biologique des lymphocytes T et ils pourraient expliquer leur survie et leur persistance au niveau des sites d'inflammations durant les maladies auto-immunes.

Mots-clés : Inflammation, intégrine, molécules costimulatrice, survie cellulaire

Abstract

CD40 ligand (CD40L) is a critical regulator of the immune response and a key contributor to autoimmune diseases. We have previously reported that CD40L binds to $\alpha 5\beta 1$, albeit the functional consequences of this interaction remain elusive. T cells are central to the pathogenesis of autoimmune diseases and express high levels of $\beta 1$ integrins in disease conditions, making the CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ interaction a potential axis of significant importance in inflammatory complications. Here, we show that soluble CD40L (sCD40L) binds to freshly isolated primary T cells and to Jurkat E6.1 T cells in a $\alpha 5\beta 1$ -dependant manner. This leads to the activation of key survival proteins, including the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and the Akt PI3 kinase (PI3K). Binding of sCD40L to $\alpha 5\beta 1$ does not induce its conformational change nor allow adherence to fibronectin. These results highlight the impact of the CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ interaction in T-cell function and may explain the link between sCD40L and T-cell survival and persistence in inflammatory diseases.

Keywords : Inflammation, Costimulatory molecules, Integrins, Cell Survival

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des Figures :	vi
Liste des abréviations :.....	vii
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
Introduction.....	2
1. Le CD40L :	3
1.1. Structure du CD40L :.....	3
1.2. Les récepteurs du CD40L :	4
1.2.1. Le récepteur CD40 :.....	4
1.2.1.1. La Structure et l'expression du CD40:.....	4
1.2.1.2. Le Rôle de l'interaction CD40L/CD40:.....	5
1.2.2. CD40L et les autres récepteurs :	7
1.2.2.1. La famille des intégrines :.....	7
1.2.2.1.1. Généralité :.....	7
1.2.2.1.2. La structure des intégrines :	8
1.2.2.1.2.1. La sous-unité α :.....	9
1.2.2.1.2.2. La sous-unité β :.....	10
1.2.2.1.3. Les ligands des intégrines :	11
1.2.2.1.4. La signalisation par les intégrines :.....	12
1.2.2.1.5. Les intégrines et la régulation des fonctions cellulaires :	14
1.2.2.1.5.1. Les intégrines et la migration cellulaire :.....	14
1.2.2.1.5.3. Les intégrines et la survie cellulaire :.....	15
1.2.2.1.5.3.1. Introduction à l'apoptose programmée des cellules :.....	15
1.2.2.1.5.3.2. Le rôle des intégrines dans la survie cellulaire :	16

1.2.2.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$	19
1.2.2.2.1. La structure de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$	19
1.2.2.2.2. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$	20
1.2.2.2.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et les lymphocytes T	21
1.2.2.2.3.1. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la migration lymphocytaire :	21
1.2.2.2.3.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la costimulation des lymphocytes T :	22
1.2.2.2.3.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la survie des lymphocytes T :	23
1.2.2.2.3.3.1. Introduction à l'apoptose lymphocytaire	23
1.2.2.2.3.3.2. Le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la survie des lymphocytes T :	23
1.2.2.2.4. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le CD40L :	24
1.2.2.2.5. CD40L et les autres intégrines :	25
1.2.2.2.5.1. CD40L et l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$:	25
1.2.2.2.5.2. Le CD40L et l'intégrine Mac-1 :	26
Rationnel et hypothèse :	29
Chapitre 2: Matériels et Méthodes	30
2.1. Les réactifs et les anticorps:	31
2.2. Les Lignées cellulaires :	31
2.3. La cytométrie en flux :	32
2.4. L'activation cellulaire :	32
2.5. L'activation des intégrines :	33
2.6. L'adhésion cellulaire :	33
2.7. Western blot :	33
Chapitre 3: Résultats	35
3.1. Le sCD40L lie l' $\alpha 5\beta 1$ exprimée par les lymphocytes T et induit des signaux intracellulaires:	36
3.2. Le sCD40L lie spécifiquement l' $\alpha 5\beta 1$ à la surface des jurkat E6.1 :	36
3.3. L'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ par le CD40L n'induit pas son changement structural : ...	37
Chapitre 4: Discussion et perspectives.....	41

4.1. Discussion : 42

4.2. Perspectives : 46

Bibliographie..... 49

Liste des Figures :

Chapitre 1 :

Figure 1. 1: L'interaction entre le lymphocyte T et les cellules présentatrices d'antigènes. .	2
Figure1. 2: La structure du gène et de la protéine du CD40L.....	3
Figure1. 3: La structure du gène et de la protéine du CD40.	4
Figure 1.4: Le rôle de l'interaction du CD40L avec le récepteur CD40 à la surface des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.	7
Figure1. 5: Les différentes familles d'intégrines.	9
Figure 1. 6: Les différents domaines des sous-unités α et β des intégrines.	11
Figure 1. 7: Les voies de signalisation induites <i>via</i> les intégrines et la fonction biologique correspondante.	13
Figure 1. 8: L'apoptose programmée de la cellule.....	16
Figure 1. 9: L'interaction du CD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ et la réponse cellulaire résultante.....	25

Chapitre 3 :

Figure 3. 1: Le sCD40L lie l' $\alpha 5\beta 1$ exprimée par les lymphocytes T et induit des signaux intracellulaires.	38
Figure 3. 2 : Le sCD40L lie spécifiquement l' $\alpha 5\beta 1$ à la surface des jurkat E6.1	39
Figure 3. 3 : L'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ par le CD40L n'induit pas son changement structural	40

Chapitre 4 :

Figure 4. 1 : schéma représentatif de l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ et le rôle biologique correspondant.	48
--	----

Liste des abréviations :

ACAD	Apoptose autonome des cellules T activées
AICD	Mort induite par l'activation
APRIL	ligand inductible à la prolifération
AR	Arthrite rhumatoïde
BAFF	protéine stimulatrice des lymphocytes B
Cas	Substrat associé à Crk
CDK	Kinase dépendante des cyclines
CD40L	Ligand du CD40
CECL	cellules épithéliales de cornée de lapin
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DR	Récepteur de mort
EGF	Facteur de croissance épidermique
ERK	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
FAK	Kinase de l'adhésion focale
FasL	Ligand de Fas
FN	Fibronectine

FLIP	Protéine inhibitrice de FLICE
FADD	Protéines associées à Fas avec un domaine de mort
Grb2	Protéine couplée aux récepteurs de facteurs de croissance-2
GTP	Guanosine triphosphate
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
ITGF	Facteur de croissance ressemblant à l'insuline
ILK	Kinase liée aux intégrines
IL	Interleukine
INF γ	Interferon gamma
KDa	Kilodalton
MAPK	Protéine kinase à action mitogène
MCP-1	protéine chimiotactique monocytaire-1
MEC	Matrice extracellulaire
(MIP-1 α)	protéine 1 α inflammatoire des macrophages
MMP	Métalloprotéines
PI3-K	Kinase des phosphatidyl-inositols 3
PLC γ	Phospholipase C γ
PMA	Phorbol-12-Myristate 13-Acétate
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

Ras	sarcome du Rat
Rac	Substrat de la toxine C3 botulinium relié à Ras
Rho	homologue des Ras
RGD	Arginine/ glycine/acide aspartique
Shc	protéine contenant une homologie à Src
LES	lupus érythémateux systémique
SOS	“Son of sevenless”
Src	Sarcome de Rous
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF- β	facteur de croissance transformant bêta
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose relié au TNF
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1

*A ma famille, à l'esprit de ma grand-mère et
à Rachel*

Remerciements

Pour toutes les personnes qui m'ont apportées leur aide, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire, je vous suis reconnaissant.

Tout d'abord, Dr Walid Mourad, mon directeur de recherche, pour son encadrement tout au long de ma maîtrise.

Je remercie ensuite les membres du laboratoire, notamment Daniel Yacoub pour sa participation active à la rédaction de l'article.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Nadir Benslimane pour son sens critique et sa contribution scientifique à l'élaboration de ce mémoire.

Et finalement, un grand merci à ma famille et à mes amis pour leur patience et leur encouragement.

Bonne lecture.

Chapitre 1 : Introduction

Introduction

Lors d'une réponse immunitaire, l'activation des lymphocytes T dépend de deux types de signaux. L'interaction du TCR (récepteur des lymphocytes T) avec l'antigène présenté par le CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) des CPA (Cellules présentatrices d'antigènes), constitue le premier signal. Ce dernier, tout seul, ne peut pas assurer l'activation des lymphocytes T et mène à leur anergie. Un second signal, connu par le signal de costimulation, sera nécessaire. Cette costimulation joue un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans la prévention de l'anergie lymphocytaire. Le second signal est assuré par des molécules costimulatrices exprimées à la surface des lymphocytes T et des CPA. A cause de son expression constitutive, la molécule costimulatrice CD28 des lymphocytes T est la première à agir durant la costimulation lymphocytaire. Son interaction avec la molécule B7.1 des CPA augmente la survie des lymphocytes T et contribue, avec les signaux induits *via* le TCR, à l'expression des molécules costimulatrices. Parmi ces molécules on retrouve le CD40L (ligand du CD40). Ce dernier, lie le CD40 des CPA et entraîne une activation bidirectionnelle (Fig. 1).

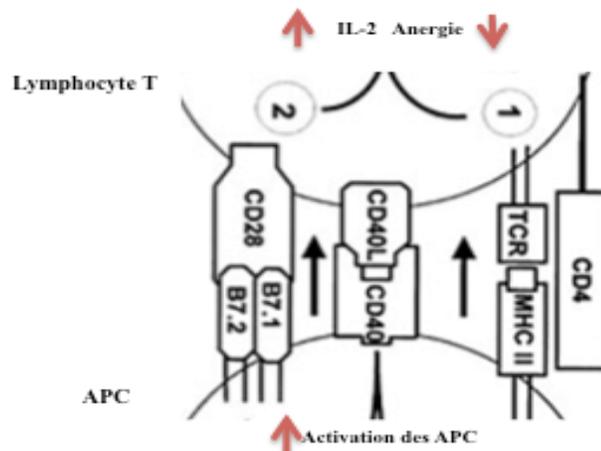


Figure 1. 1: L'interaction entre le lymphocyte T et les cellules présentatrices d'antigènes.

Modifié de Curr. Opin. Rheumatol. (2002).

1. Le CD40L :

1.1. Structure du CD40L :

Le CD40L est une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des TNF (facteurs de nécrose tumorale) [1, 2]. Le gène codant pour le CD40L est situé sur le chromosome X. Il est divisé en 5 exons et 4 introns. La protéine du CD40L est formée de 261 aa (acides aminés) dont 215 aa composant la partie extracellulaire, 24 aa constituant la partie transmembranaire et 22aa formant la queue cytoplasmique (Fig.2). Elle a un poids moléculaire de 39 KDa [3-5]. Le CD40L est exprimé sous forme trimérique à la surface des lymphocytes T activés ainsi que par différentes cellules hématopoïétiques comme les monocytes, les basophiles, les cellules dendritiques et les plaquettes. Il est aussi exprimé par certaines cellules non-hématopoïétiques comme les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [6]. Outre la forme membranaire, le CD40L existe sous une forme soluble. Cette forme est le résultat d'un clivage enzymatique au niveau de la méthionine 113 de la partie extracellulaire du CD40L membranaire. Le CD40L clivé est une molécule de 18KDa, trimérique et biologiquement active [7].

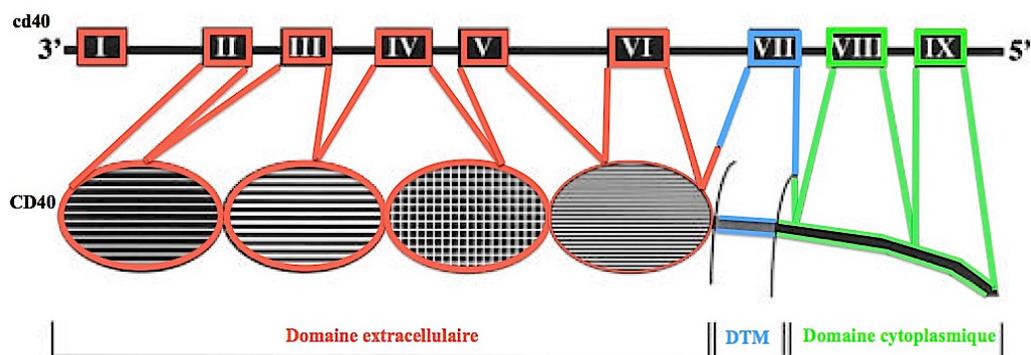


Figure 1. 2: La structure du gène et de la protéine du CD40L.

Cette figure montre les 5 exons du gène cd40l et les parties correspondantes au niveau protéique (DTM : domaine transmembranaire).

(Modifié de Schonbeck, U. et al. 2001) [6].

1.2. Les récepteurs du CD40L :

Le CD40 est considéré comme étant le récepteur principal du CD40L [8]. Récemment, trois autres récepteurs pour le CD40L ont été identifiés : l' α IIB β 3 [9], l' α 5 β 1 [10] et le Mac-1 [11].

1.2.1. Le récepteur CD40 :

1.2.1.1. La Structure et l'expression du CD40:

Le récepteur CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la famille des récepteurs des TNF [12]. Il est codé par un gène situé sur le chromosome 20 et divisé en 9 exons. La protéine CD40, du 43-50 KDa, est constituée de 277 aa dont 171 aa au niveau de la partie extracellulaire, 22 aa au niveau de la partie transmembranaire et 62 aa au niveau de la partie cytosolique (fig. 3) [13, 14]. Le CD40 est exprimé sous forme monomérique et dimérique à la surface cellulaire. Il est exprimé par les CPA comme les lymphocytes B, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Il est aussi exprimé par les plaquettes ainsi que par les lymphocytes T activés. Son expression a été aussi détectée à la surface des cellules non-hématopoïétiques comme les cellules endothéliales, épithéliales, les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules musculaires lisses [15].

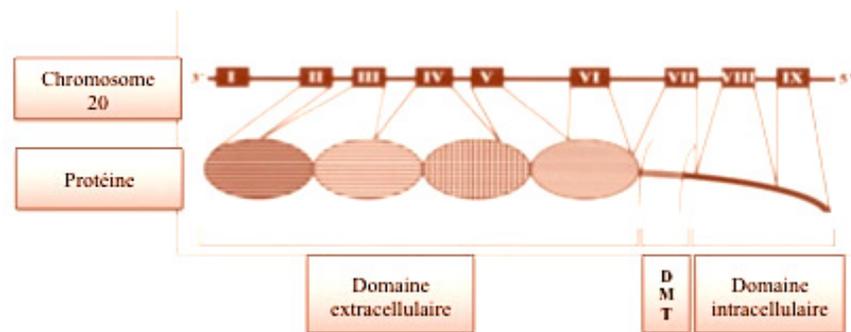


Figure1. 3: La structure du gène et de la protéine du CD40.

Cette figure montre les différentes parties de la protéine CD40 et les exons codants pour ces parties.

(Modifiée de Schonbeck, U. et al. 2001) [6].

1.2.1.2. Le Rôle de l'interaction CD40L/CD40:

Le récepteur CD40 est une protéine dépourvue des domaines kinases qui sont nécessaires à la signalisation cellulaire. L'engagement du CD40 par le CD40L induit sa translocation au niveau des radeaux lipidiques qui sont des micro-domaines riches en protéines adaptatrices. La localisation du CD40 au niveau du lipide raft lui permet d'induire l'activation indirecte de plusieurs voies de signalisation. Cette activation est médiée par des protéines adaptatrices surtout les protéines TRAF et les JAK3.

L'association des TRAFs et des Jak3 à la queue cytoplasmique de CD40 induit l'activation des MAPKs et des PI3K et régule plusieurs réponses biologiques telles que la commutation isotypique, la prolifération, la survie et l'apoptose programmée des cellules [5, 6, 16].

In vivo, le rôle du couple CD40L/CD40 durant la réponse immunitaire est illustré chez les patients atteints du syndrome d'Hyper IgM. Ces patients présentent une concentration normale ou élevée des IgM et un niveau très faible des IgG et des IgE. La diminution de la concentration des IgG et des IgE résulte de l'incapacité des lymphocytes B à induire la commutation isotypique en absence de l'interaction CD40L/CD40. [17].

In vitro, l'engagement du CD40 des lymphocytes B par le CD40L induit la surexpression des protéines CMH-I et CMH-II [18, 19] ainsi que la sécrétion de plusieurs cytokines comme l'IL-6 (IL : interleukine), l'IL-10 et le TNF α [20, 21]. En plus, l'interaction du CD40 des lymphocytes B avec le CD40L des lymphocytes T activés, en présence de certaines cytokines comme l'IL-4, l'IL-2 et l'IL-10, induit leur prolifération et leur différenciation en plasmocytes [22]. De même, la différenciation des lymphocytes B est favorisée par la présence des cellules dendritiques. L'interaction du CD40 dendritique avec le CD40L des lymphocytes T activés augmente l'expression des protéines BAFF (protéine stimulatrice des lymphocytes B) et APRIL (ligand inductible à la prolifération) [23]. De plus, l'activation des cellules dendritiques par le CD40L augmente l'expression des cellules

dendritiques en molécules costimulatrices dont B7-1/B7-2 et CD80/CD86 ainsi que la sécrétion des cytokines IL-12 et IL-10 [24-26]. Ces molécules sont impliquées dans la différenciation des lymphocytes T [27]. En outre, le couple CD40L/CD40 contribue à l'activation des monocytes et des macrophages. En tant que CPA, l'engagement du CD40 des monocytes et des macrophages par le CD40L des lymphocytes T activés induit la sécrétion des plusieurs cytokines comme l'IL-12, IL-1, IL-6, IL-8 et TNF α [28-30] ainsi que le relâchement des MMPs (métalloprotéines) comme les MMP-1, 2, 3 et 9 [31, 32]. De même, cette interaction augmente l'expression monocytaires et macrophagiques en CD40 et en d'autres molécules costimulatrices dont les B7.1 et B7.2 [33].

En plus des cellules hématopoïétiques, l'axe CD40L/CD40 contribue à la réponse biologique des cellules non hématopoïétiques. L'engagement du CD40 des cellules endothéliales par le CD40L augmente le recrutement des monocytes/macrophages et des lymphocytes au niveau de sites d'inflammations. Ce recrutement est favorisé par la sécrétion de plusieurs cytokines comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, de MCP-1 (protéine chimiotactique monocyttaire-1), de MIP-1 α (protéine 1 α inflammatoire des macrophages), des RANTES et par la surexpression d'ICAM-1 (molécules d'adhésion intercellulaires 1) et de VCAM-1 (molécules d'adhésion vasculaires 1) [34, 35]. L'activation du CD40 endothélial déclenche aussi la sécrétion du VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial) et de la COX-2 (cyclooxygénase-2) contribuant ainsi au mécanisme de l'angiogenèse [36, 37]. Par ailleurs, l'engagement du CD40 à la surface des cellules musculaires lisses augmente leur prolifération et leur migration. Cette augmentation résulte de la dégradation de la MEC (matrice extracellulaire) par les MMPs (Fig.4) [38, 39].

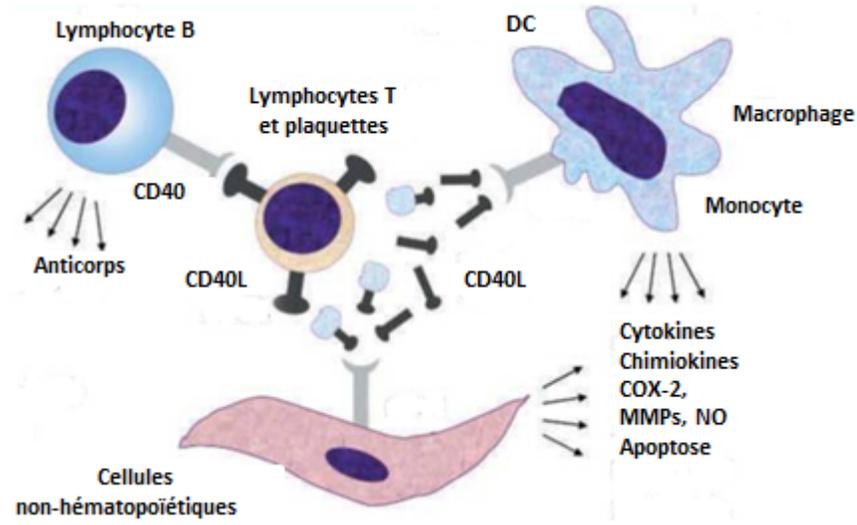


Figure 1.4: Le rôle de l'interaction du CD40L avec le récepteur CD40 à la surface des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.

Inspirée de *Danese, S. et al.* (2004) [40].

1.2.2. CD40L et les autres récepteurs :

En plus du CD40, le CD40L interagit avec trois autres récepteurs appartenant à la famille des intégrines. Ces intégrines sont : l' $\alpha 5 \beta 1$, l' $\alpha \text{IIb} \beta 3$, et le Mac-1.

1.2.2.1. La famille des intégrines :

1.2.2.1.1. Généralité :

La MEC est constituée de plusieurs macromolécules exposant les cellules à leur environnement. Les cellules sont capables de déceler leur environnement extracellulaire grâce à des interactions impliquant un grand nombre de molécules d'adhésion cellulaire. En effet, plusieurs récepteurs membranaires interviennent dans la liaison des cellules à la

MEC favorisant ainsi des interactions structurales et fonctionnelles entre la matrice et les microfilaments d'actine, les microtubules, et les filaments intermédiaires du cytosquelette. Parmi ces récepteurs cellulaires se trouvent les intégrines. Elles permettent l'adhésion des cellules et contrôlent de nombreux processus cellulaires.

1.2.2.1.2. La structure des intégrines :

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires situés à la surface des cellules. L'association entre les sous-unités α et les sous-unités β , constituant l'hétérodimère d'intégrines, confère à ces dernières leur propriété fonctionnelle [41]. À ce jour, 33 sous-unités d'intégrines dont 24 sous-unités α ainsi que 9 sous-unités β ont été découvertes dans le génome humain. Cependant, seulement 18 sous-unités α et 8 sous-unités β se trouvent actuellement catégorisées. Elles sont capables d'hétérodimeriser pour former 24 intégrines différentes [42-44]. Ces sous-unités appartiennent à la famille des protéines transmembranaires de type 1 dont l'extrémité N-terminale est extracellulaire et l'extrémité C-terminale est intracellulaire [45]. En outre, ces protéines transmembranaires sont constituées de trois domaines différents. L'exodomaine comporte entre 700 et 1100 aa, un court domaine transmembranaire contenant de 20 à 30 aa et le domaine cytoplasmique possédant de 30 à 50 aa [45]. Selon leur ressemblance fonctionnelle, les intégrines peuvent être divisées en plusieurs groupes : les intégrines à laminine, les intégrines à collagène, les intégrines leucocytaires et les intégrines reconnaissant les motifs RGD (Arginine/glycine/acide aspartique) (fig.5) [46]. De même, la nature des sous-unités β constitue un autre critère de classification. La famille $\beta 1$ est la plus importante et les intégrines qui y appartiennent possèdent principalement pour ligand des protéines de la MEC [47].

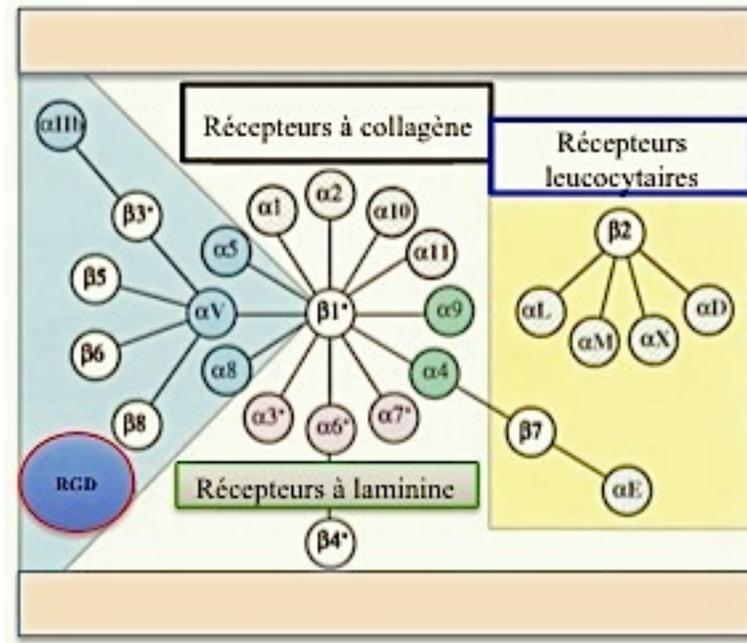


Figure1. 5: Les différentes familles d'intégrines.

Les différentes associations entre les sous-unités α et β ainsi que les récepteurs correspondants sont présentés dans cette figure.

Modifié de *Hynes, R. O.* (2002) [46].

1.2.2.1.2.1. La sous-unité α :

Avec une taille se situant entre 120 et 180 kDa et contenant plus de 940 aa, les sous unités α constituent la partie la plus volumineuse de l'hétérodimère [48, 49]. La séquence des sous-unités α varie non seulement au niveau inter-espèces mais aussi au niveau intra-espèces [49]. Le domaine αA (ou domaine 1), les deux domaines « calf », le domaine « thigh » ainsi que le domaine en forme d'hélice à sept lames, forment les différents domaines de la sous-unité α [50]. Le domaine à sept lames semble être impliqué dans la liaison de l'intégrine à son ligand et également dans l'hétérodimérisation du récepteur [51, 52]. En outre, les cations divalents comme le calcium possèdent des sites potentiels de liaison au niveau de ce domaine et aboutissent à son activation [52]. De même, la liaison

du ligand à la sous-unité α pourrait être favorisée lorsque le domaine I s'y trouve présent [53]. Pour les sous-unités ne contenant pas ce domaine, la sous-unité β ainsi que le domaine à sept lames semblent compenser pour cette absence lors de la liaison du ligand [45]. Le domaine « thigh » et les deux domaines calf 1 et calf 2, arrangés en feuillets β , constituent un site de clivage protéolytique et forment la queue de la sous-unité α [50]. La séquence particulière KXGF-FKR/X où X est un résidu non polaire [49], se situe près du domaine transmembranaire de la sous-unité α . Elle joue un rôle dans l'hétérodimérisation et le maintien de l'intégrine dans son état inactif ainsi que dans son activation [54] (fig.6).

1.2.2.1.2.2. La sous-unité β :

Avec une taille oscillante entre 90 et 115 kDa et avec 640 aa, les sous-unités β sont connues pour leurs petites tailles et la conservation de leur séquence entre les espèces en comparaison avec les sous-unités α [47-49, 55]. L'exodomaine de la sous-unité β comprend 8 domaines différents dont les fonctions n'ont pas été élucidées à ce jour [49]. Le domaine globulaire βA est considéré comme le premier domaine. Une partie de βA est intégrée dans le second domaine nommé domaine hybride qui est engagé dans l'activation de l'intégrine [50]. Le domaine βA substitue le domaine αA de la sous-unité α quant à sa liaison avec le ligand [51, 53]. Le maintien de la forme inactive de l'intégrine est accompli par le troisième domaine ou le domaine PSI qui est riche en résidus cystéines [51]. Un rôle important au niveau de la signalisation *via* les intégrines est assuré par quatre autres domaines également riches en cystéines, les I-EGF 1 à 4 [51]. La fonction du dernier domaine extracellulaire, β TD, est encore mal caractérisée [50]. Finalement, deux séquences très conservées: la séquence de localisation des plaques d'adhésion focales (NPXY) et une autre séquence située près de la queue cytoplasmique de la sous-unité β , contribuent à l'activation des intégrines [56]. Quant à la queue cytoplasmique de la sous-unité β , elle est capable de lier plusieurs protéines cytoplasmiques. Certaines assurent un rôle au niveau de la signalisation telle que la FAK (kinases de l'adhésion focale), l'ILK

(kinases liées aux intégrines), la paxilline et la Grb2 (protéine couplée aux récepteurs de facteurs de croissance-2). D'autres assurent la liaison directe entre les intégrines et le cytosquelette d'actine dont la taline, la filamine et l' α -actinine [57-59] (fig.6).

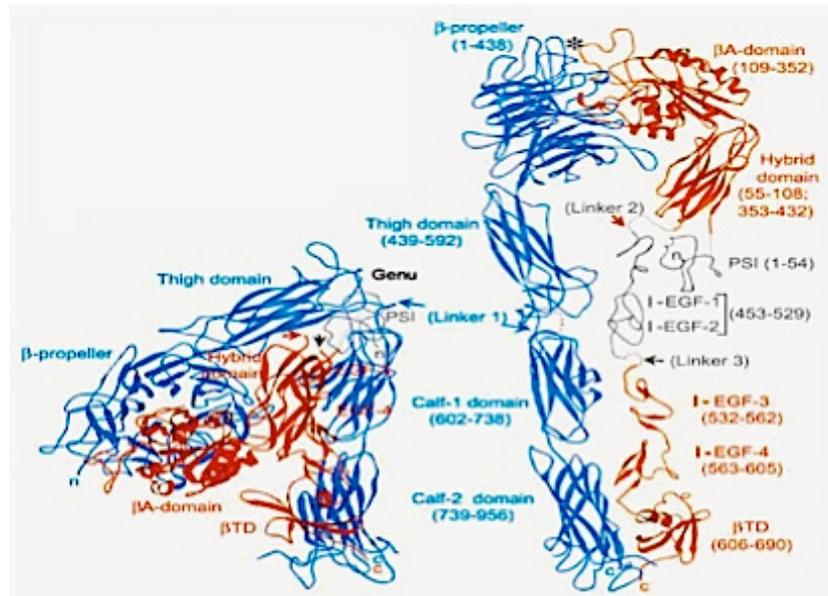


Figure 1. 6: Les différents domaines des sous-unités α et β des intégrines.

La sous unité α est présentée en rouge et la sous unité β en bleu.

Modifié de Hynes, R. O. (2002) [46].

1.2.2.1.3. Les ligands des intégrines :

Les diverses voies de signalisation sont déclenchées et influencées d'une part, selon les différentes associations des sous-unités d'intégrines et d'autre part, selon le ligand auquel elles se lient. La majorité des ligands des intégrines font partie de la MEC et sont responsables dans l'adhésion cellule-substrat [41]. Un ligand se lie à plusieurs intégrines, qui à leur tour, peuvent reconnaître plusieurs ligands [60]. Cette interaction induit un

changement de conformation des intégrines en passant de la forme inactive à la forme active.

1.2.2.1.4. La signalisation par les intégrines :

Les intégrines s'associent avec le cytosquelette suite à leur liaison avec à la MEC, déclenchant une cascade de signalisation à l'intérieur de la cellule [59]. À leur tour, ces signaux intracellulaires provoquent la liaison des intégrines à la MEC [61]. D'où la capacité des intégrines à induire une signalisation bidirectionnelle [62]. Lors de son interaction avec son ligand, la partie cytoplasmique, ou la queue de l'intégrine, se lie au cytosquelette d'actine grâce à son interaction avec plusieurs protéines cytoplasmiques. Ces dernières, considérées comme étant des protéines adaptatrices, sont nécessaires pour déclencher une cascade de signalisation *via* la queue cytoplasmique des intégrines dépourvues cependant d'activité catalytique [46]. Suite à l'interaction avec la MEC, les filaments d'actine se réorganisent, déclenchant une boucle de rétroaction positive et provoquant ainsi l'agrégation des intégrines au niveau de la membrane cytoplasmique. Ce rassemblement forme ainsi le complexe d'adhésion focal. En l'absence de toute interaction, les intégrines redeviennent libres à la surface cellulaire [63, 64]. La propagation du signal implique plus de 50 protéines différentes qui provoquent une cascade de signalisation spécifique [65]. Les propriétés de la MEC, l'activation et l'avidité des intégrines, l'état de contraction du cytosquelette et la spécificité tissulaire et cellulaire du milieu pourraient influencer la signalisation des intégrines [65].

L'interaction des intégrines avec la MEC induit l'activation de plusieurs voies de signalisation. Cette signalisation est médiée par un grand nombre de protéines intracellulaires. Parmi ces protéines intracellulaires on cite : la taline, la vinculine, la filamine, l'ILK, la paxilline et la FAK [66]. La transduction des signaux *via* les intégrines est déclenchée par la liaison de ces seconds messagers à la queue cytoplasmique de la sous unité β [67, 68]. La protéine FAK est la protéine la plus impliquée dans la signalisation des

intégrines. L'autophosphorylation de la protéine adaptatrice FAK induit son association à des protéines kinase de la famille des Src (Sarcome de Rous). Cette association aboutit à l'activation des voies de signalisation PI3-K (Kinase des phosphatidyl-inositols 3), MAPK (Protéine kinase à action mitogène) et Crk/Cas (Substrat associé à Crk) [69, 70]. Outre les kinases Src, la protéine FAK peut se lier à la PLC- γ (phospholipase C γ), à la protéine Shc (protéine contenant une homologie à Src) et à la protéine Grb7, qui activeront, à leur tour, d'autres voies de signalisation [68, 70]. En plus, certaines intégrines peuvent lier des protéines kinase de la famille Src telle que Fyn et Yes, sans la liaison préalable à la protéine FAK. La liaison des protéines tyrosine kinase Fyn et Yes à la queue cytoplasmique des intégrines va recruter les protéines Shc. A leur tour, les Shc vont s'associer au complexe Grb2/SOS (« Son of sevenless ») ce qui induit l'activation des Ras (sarcome du Rat) et de la voie MAPK [69]. L'ensemble de voies de signalisation induites *via* les intégrines contrôle plusieurs fonctions cellulaires dont la survie, la prolifération et la migration (Fig.7).

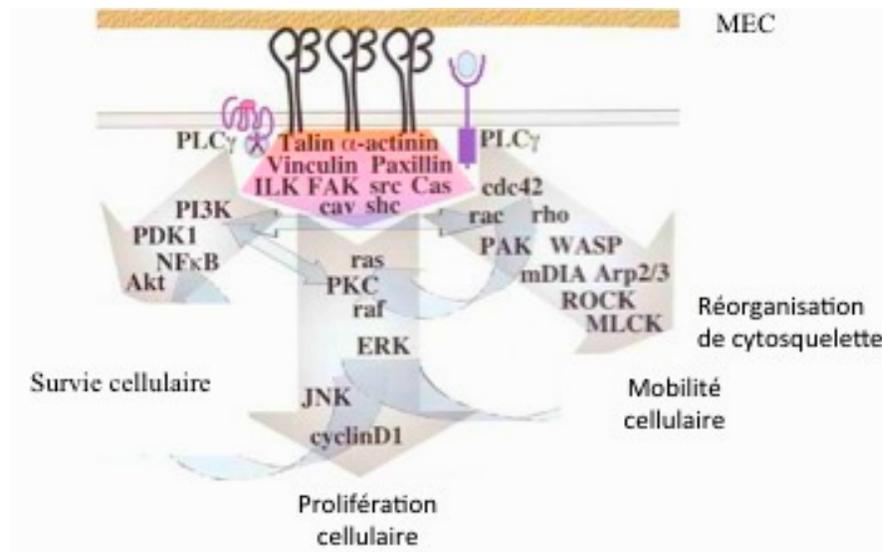


Figure 1. 7: Les voies de signalisation induites *via* les intégrines et la fonction biologique correspondante.

Modifié de Hynes, R. O. (2002) [46].

1.2.2.1.5. Les intégrines et la régulation des fonctions cellulaires :

1.2.2.1.5.1. Les intégrines et la migration cellulaire :

Les signaux intracellulaires induits *via* les intégrines sont responsables de l'organisation du cytosquelette. Cette organisation sert à médier la migration cellulaire notamment la migration transendothéliale des leucocytes ainsi que leur migration et adhésion à travers la MEC. Les signaux induits par les intégrines aboutissent à l'activation de différentes protéines appartenant à la famille des petites GTPases (GTP : Guanosine triphosphate) tels que Rac (Substrat de la toxine C3 botulinum relié à Ras), Cdc42 et Rho (homologue des Ras) [71, 72]. L'extension des lamellipodes, la formation de plaques d'adhésions, la contraction du corps cellulaire et le détachement de la queue, [72] sont les étapes principales durant la migration cellulaire. Ils sont entraînés par une réorganisation des filaments d'actine médiée par les GTPases de la famille Rho. Durant ce processus, Rho est impliqué dans la formation et le maintien des fibres de stress alors que les autres membres de cette famille, Rac et Cdc42, confèrent aux cellules des structures spécialisées, les lamellipodes et les filopodes [71, 72].

1.2.2.1.5.2. Les intégrines et la prolifération cellulaire:

Des études ont montré que les intégrines contribuent à la prolifération cellulaire en coopérant avec les récepteurs de facteurs de croissance [73, 74]. La coopération entre ces deux récepteurs est favorisée par leur colocalisation au niveau des points d'adhésion focaux [75]. Plusieurs études ont montré cette colocalisation. L'une d'entre elles a montré que les intégrines $\beta 1$ se trouvaient en colocalisation avec les récepteurs EGF (facteur de croissance épidermique) à la surface des cellules épithéliales A431 durant l'interaction cellulaire [76]. Une autre a révélé une colocalisation des intégrines $\beta 1$ avec les récepteurs d'ITGF (Facteur de croissance ressemblant à l'insuline) au niveau des cellules cancéreuses prostatiques. Chez ces dernières, le rôle prolifératif induit par les récepteurs ITGF sera inhibé suite à

l'inhibition d'expression de la chaîne $\beta 1$ des intégrines [77]. Les voies de signalisation activées *via* les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance, surtout la voie des MAPK/ERK (kinase régulée par des signaux extracellulaires), régulent la progression du cycle cellulaire en phase G1/S [73, 78]. Une fois activée, la voie MAPK/ERK induira l'activation de plusieurs facteurs de transcription qui sont nécessaires pour la transition de la cellule vers la phase G1/S. Parmi ces facteurs de transcription, on trouve les AP-1 qui vont favoriser la prolifération cellulaire en activant les cyclines D et E. Celles-ci sont responsables de l'activation des CDK (Kinase dépendante des cyclines) [78]. L'induction de la cycline DI, résultant de la synergie entre les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance, nécessite une activité soutenue de la voie de MAPK/ERK [74]. En outre, la voie de MAPK/ERK peut inhiber les protéines p21 et p27 qui sont eux-mêmes des inhibiteurs des CDK favorisant ainsi la prolifération cellulaire [73, 78, 79].

1.2.2.1.5.3. Les intégrines et la survie cellulaire :

1.2.2.1.5.3.1. Introduction à l'apoptose programmée des cellules :

L'apoptose programmée des cellules est un mécanisme qui aide à l'homéostasie tissulaire. Elle est induite par deux voies: la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque, ou bien la voie mitochondriale, est déclenchée par des stimuli externes comme les irradiations UV et les drogues chimiothérapeutiques. L'activation de cette voie rend perméable la membrane mitochondriale et augmente le relargage du cytochrome C. Ce dernier induit la mort cellulaire en activant les protéines pro-apoptotiques, les caspases-3, *via* les caspases initiateuses, les caspase-9 [80].

La voie extrinsèque induit la mort cellulaire en impliquant les récepteurs de morts. Ces récepteurs appartiennent à la famille des TNF, dont le plus étudié est le couple FasL (ligand de Fas)/Fas. L'engagement du Fas avec le FasL induit le recrutement des FADD (Protéines associées à Fas avec un domaine de mort) et de la pro-caspase-8. Ce recrutement déclenche l'activation de la caspase initiateuse, la caspase-8. Celle-ci exerce son effet apoptotique en

activant soit les caspase-3 et soit la protéine Bid, augmentant ainsi le relargage de cytochrome C (Fig.8) [80]

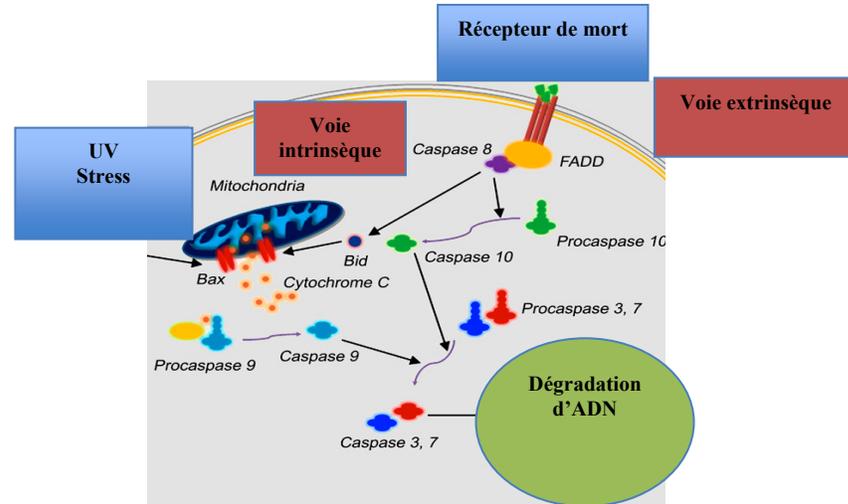


Figure 1. 8: L'apoptose programmée de la cellule.

Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose cellulaire ainsi que les protéines impliquées dans ces voies, sont identifiées dans cette figure.

Modifiée de *Niu, G. et al.* (2010) [80].

1.2.2.1.5.3.2. Le rôle des intégrines dans la survie cellulaire :

Nous savons que la viabilité cellulaire est contrôlée par l'adhésion des cellules *via* les intégrines. Les cellules épithéliales et endothéliales, qui sont des cellules adhérentes, sont régies par ce phénomène. En effet, l'anoïkose, une des formes d'apoptose, est induite par une adhésion inadéquate ou une perte d'adhésion cellulaire [81]. Ce mécanisme est important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire puisqu'il a pour but d'empêcher la colonisation d'autres tissus lorsque les cellules se détachent de leur environnement [81]. Malgré cette organisation qui semble parfaite, les cellules cancéreuses y échappent. Elles survivent et prolifèrent même en l'absence d'adhésion à la MEC, devenant ainsi insensible à l'anoïkose [82, 83]. Les voies classiques, soit les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose, sont aussi impliquées dans l'anoïkose.

Effectivement, la voie extrinsèque de l'apoptose est impliquée dans l'induction du mécanisme de l'anoïkose et ceci fut démontré chez les cellules endothéliales. Il a été observé que leur détachement diminuait l'expression de FLIP (Protéine inhibitrice de FLICE) et augmentait l'expression de Fas et de FasL, ce qui les sensibilisait à l'anoïkose [84]. Aussi, le détachement des cellules épithéliales intestinales contribue à leur apoptose en induisant l'expression de FasL [85]. Chez les kératinocytes, l'anoïkose résultante du blocage de la chaîne $\beta 1$ des intégrines est dépendante de la caspase-8. Par contre, dans ce modèle, l'inhibition de la caspase-9 n'a aucun effet sur l'apoptose [86]. Dans cette même étude, il a aussi été démontré que l'apoptose induite par le détachement est inhibée par la surexpression de FLIP ce qui indique l'implication de la voie extrinsèque dans l'anoïkose [86]. En plus de la voie extrinsèque, il existe un mécanisme d'auto amplification médié par la voie mitochondriale, c'est ce que nous montre la libération du cytochrome C et l'activation tardive de la caspase-9 [86]. Chez les lignées de cellules de cancers colorectaux faiblement métastatiques, l'expression du TRAIL (ligand inducteur d'apoptose relié au TNF) ainsi que de son récepteur de mort DR5 (récepteur de mort) est induite par le détachement des cellules, ce qui, de façon dépendante de la caspase-8, est responsable de leur apoptose [87].

L'anoïkose est également médiée par la voie intrinsèque de l'apoptose. Dans la régulation de ce mécanisme, les protéines de la famille Bcl-2 y jouent un rôle très important. Effectivement, plusieurs études ont montré la capacité qu'ont les intégrines à promouvoir la survie des cellules adhérentes par l'augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 [88, 89]. Par ailleurs, dans les cellules fibroblastiques NIH3T3, l'adhésion permet une inhibition de l'expression des protéines pro-apoptotiques puisque le détachement des cellules augmente l'expression de BIM et induit la dégradation de la MCL-1 [90]. Il a été montré, dans une étude récente, que la mise en suspension des cellules épithéliales réduisait l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et MCL-1 et augmentait l'expression des protéines apoptotiques BAK et BAX ainsi que l'activation de BAD [91]. De plus, il a été démontré que les signaux intracellulaires induits *via* les intégrines de la famille $\beta 1$ jouaient un rôle dans la survie de ces cellules en engageant les voies de

MAPK/ERK et PI3-K/AKT ainsi que le complexe FAK/Src [91]. Le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses provient de leur résistance aux mécanismes de l'anoïkose. Cette résistance s'explique par une forte expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [82, 92].

Non seulement les intégrines sont impliquées dans l'anoïkose, elles le sont aussi dans le développement de la résistance des cellules cancéreuses face aux médicaments chimiothérapeutiques [93]. Par exemple, lorsque les cellules du myélome adhèrent à la FN (fibronectine) par les intégrines $\beta 1$, ceci inhibe leur apoptose normalement provoquée par l'étoposide [94]. Aussi, l'adhérence des cellules cancéreuses du sein à la FN et au collagène par les intégrines, inhibe l'effet du taxol, soit l'apoptose, en activant la voie de PI3-K/AKT [95]. Pour ce qui est du cancer du poumon, ce même phénomène est observé. En effet, les cellules cancéreuses du poumon résistent à l'apoptose provoquée par l'étoposide et la doxorubicine lorsqu'elles adhèrent à la FN, la laminine et le Coli IV [96]. La résistance au daunorubicine et à la cytarabine dans le traitement de la leucémie est due à l'adhérence des cellules leucémiques HL-60 et U937 à la FN. Cette résistance s'associe à la surexpression de Bcl-2 et à l'activation de la voie de PI3-K/AKT [97].

En laboratoire, ceci a été démontré en transférant ces cellules dans des souris SCID pour mimer la leucémie. Le taux de survie de ces souris était de 100%. De plus, si l'administration de la cytarabine était accompagnée d'un anticorps bloquant l'intégrine $\beta 1$, la survie se prolongeait jusqu'au 62^{ième} jour d'observation. Par contre, les souris traitées avec la cytarabine seule, ne survivaient pas plus de 37 jours. Ceci explique le rôle important de l'intégrine $\beta 1$ dans la résistance des cellules leucémiques aux traitements de chimiothérapie [97]. Le volet clinique de cette étude révèle en outre, que les patients atteints de la forme myeloïde de la leucémie, ont, s'ils sont porteurs des cellules cancéreuses n'exprimant pas l'intégrine $\beta 1$, de meilleures chances de survies et font moins de rechute [97].

1.2.2.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

1.2.2.2.1. La structure de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Les deux sous-unités de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont encodées par des gènes différents. La chaîne $\alpha 5$ est une protéine transmembranaire constituée de 1008 aa. Elle s'hétérodimérise seulement avec la chaîne $\beta 1$ [60, 98]. Son partenaire, la chaîne $\beta 1$, est formé de 778 aa [99]. La sous-unité $\alpha 5$ ne possède pas le domaine αA . Le clivage post-traductionnel de la sous-unité $\alpha 5$ résulte en une chaîne lourde et une chaîne légère. Ces deux chaînes sont liées par des ponts disulfures au niveau de la partie extracellulaire [47, 54, 100].

Plusieurs tissus expriment l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dont la peau, le muscle cardiaque, les intestins, les poumons, les amygdales, les vaisseaux sanguins et la rétine [41, 101]. Elle est encore exprimée à la surface des cellules immunitaires comme les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques [102-104].

La FN constitue le principal ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Une mutation au niveau de la séquence RGD de la FN abolit sa liaison avec l' $\alpha 5\beta 1$ [105, 106]. Les aa adjacents à cette séquence jouent un rôle dans la spécificité de liaison. Par exemple, la séquence RGDW se lie préférentiellement à l' $\alpha IIb\beta 3$ tandis que la séquence RGDN se lie spécifiquement à l' $\alpha 5\beta 1$ et à l' $\alpha v\beta 3$ [107]. Trois régions de type III constituent le site de liaison de l' $\alpha 5\beta 1$ sur la FN, III8, III9 et III10. La séquence RGD, essentielle pour sa liaison à l' $\alpha 5\beta 1$, se situe dans la région III10 [108, 109]. La séquence PHSRN ou « le site de synergie » de la région III9 et la séquence VKNEED de la région III8 favorise la liaison de la FN à l' $\alpha 5\beta 1$ ainsi que l'induction de la signalisation intracellulaire [110-112]. Il est suggéré que la séquence RGD lie la sous-unité $\beta 1$ tandis que les régions III8 et III9 lient la sous-unité $\alpha 5$ [111]. L' $\alpha 5\beta 1$ peut également se lier à la séquence RGD du fibrinogène. La liaison de cette intégrine avec la FN et le fibrinogène est favorisée par les ions Mn^{2+} et défavorisée par les ions Ca^{2+} [113, 114].

1.2.2.2.2. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ contribue à la réponse immunitaire en favorisant l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Le taux d'expression de l' $\alpha 5\beta 1$ sera modifiée durant ces processus afin d'améliorer la réponse cellulaire.

La sous-unité $\beta 1$ est exprimée d'une façon constitutive dans plusieurs cellules. La composition de la MEC [115] ainsi que le TGF- β (facteur de croissance transformant bêta) [116] régulent l'expression de cette sous-unité. Contrairement à la sous unité $\beta 1$, la sous unité $\alpha 5$ ne peut s'associer qu'avec le partenaire $\beta 1$. Pour cela, c'est l'expression de la chaîne $\alpha 5$ qui règlera l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [116].

La cytokine TGF- β peut également influencer l'expression de la sous-unité $\alpha 5$. La présence de TGF- β dans des cultures primaires d'ostéoblastes humaines (HOB) augmente la transcription ainsi que la traduction de la sous-unité $\alpha 5$ [117]. De même, cette cytokine exerce un effet positif sur l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ et de la FN dans les cellules de carcinome du colon (Moser) [118]. L'expression de la sous-unité $\alpha 5$ est aussi influencée par un effet synergique de TGF- β et de bFGF (facteur de croissance fibroblastique) [119].

En outre, l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est reliée à l'expression de son ligand, la FN. Dans les cellules de carcinome du colon, le blocage d'expression de FN induit une sous-expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ce blocage empêche aussi l'effet positif de TGF- β sur l'expression de l' $\alpha 5\beta 1$ [118]. D'autres études ont montré qu'une surexpression de la FN entraînait une augmentation d'expression de son récepteur au niveau des nerfs périphériques [120]. De même, la surexpression de la sous-unité $\alpha 5$ par les cellules de la peau aboutit à l'augmentation de production de FN [121]. Cette expression diminue avec la diminution de production de FN au niveau des fibroblastes non adhérents [122].

D'autres molécules peuvent influencer l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) surexprime la sous unité $\alpha 5$. Cette surexpression dépend de la protéine kinase C [123]. L'IL-6 est une autre cytokine stimulant l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les CECL (cellules épithéliales de cornée de lapin). De même, l'expression de cette intégrine augmente à la surface des fibroblastes sous l'effet des glucocorticoïdes [124]. Par contre, le PPAR γ (ligand du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes) et les inhibiteurs de COX-2 diminuent l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ en diminuant la liaison des facteurs de transcription au niveau de son promoteur [125, 126].

1.2.2.2.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et les lymphocytes T

Puisqu'elles sont capables d'ancrer les cellules à la MEC et à induire la signalisation intracellulaire, les intégrines influencent une panoplie de phénomènes cellulaires. Les lymphocytes T, malgré leur caractère circulatoire, expriment plusieurs types d'intégrines. Ceci leur permet, lorsqu'ils se retrouvent dans les tissus, d'interagir avec la MEC, soit lors de maladies inflammatoires chroniques ou lors d'une réponse immunitaire normale.

Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ qui ont pour récepteurs, respectivement, la FN et la collagène, forment le groupe des intégrines $\beta 1$ le plus exprimé à la surface des lymphocytes T naïfs [127]. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été identifiée préférentiellement sur les lymphocytes T mémoires et sur 50% des lymphocytes T du sang périphérique. La surexpression de ces intégrines et l'augmentation de leur activité à la surface des lymphocytes T effecteurs, améliorent l'interaction de ces derniers avec les protéines de la MEC [102].

1.2.2.2.3.1. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la migration lymphocytaire :

Le rôle migratoire et adhésif de ces intégrines sur une matrice de FN et du collagène, a été montré *in vitro* en utilisant plusieurs modèles comme les lymphocytes T, provenant du sang périphérique, et les lignées Jurkat [128, 129]. Ce rôle a été amplifié suite à l'activation de ces modèles par le PMA, l'anti-TCR et par les anticorps activateurs des intégrines de la famille $\beta 1$ [130, 131]. Chez les patients atteints de la DMD (dystrophie musculaire de Duchenne), l'interaction de l' $\alpha 5\beta 1$ avec la FN augmente la migration des lymphocytes T au niveau des muscles contribuant ainsi à la progression de la maladie [132].

L'interaction entre la MEC et les intégrines $\beta 1$ lymphocytaires induit plusieurs signaux intracellulaires. Plusieurs lignées lymphocytaires ont été utilisées afin d'étudier ces signaux intracellulaires surtout les lignées Jurkat et H9 exprimant les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ [133]. Chez les lignées H9, l'activation des intégrines $\beta 1$ aboutit à l'activation de plusieurs protéines cytoplasmiques dont la FAK et la Cas [134, 135]. Chez les lymphocytes T, l'association de la protéine FAK avec la Paxilline crée un lien entre les intégrines et le cytosquelette induisant ainsi l'adhésion de ces cellules à la FN [136]. *In vitro*, la migration des cellules T sur la FN est médiée par l'activation des protéines Cas suite à l'activation des intégrines $\beta 1$ [137].

1.2.2.2.3.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la costimulation des lymphocytes T :

Le rôle costimulateur des intégrines constitue une autre fonction de ces molécules dans la biologie des cellules T [138]. Cette fonction costimulatrice se traduit au niveau des signaux intracellulaires et au niveau de la réponse biologique, surtout la prolifération cellulaire et la production d'IL-2. La prolifération des lymphocytes T, suite à leur activation *via* le complexe TCR/CD3, est amplifiée par la présence de différents ligands d'intégrines $\beta 1$, surtout la FN [104, 139]. L'engagement des intégrines augmente la phosphorylation de FAK induite par le TCR [140]. Chez les lymphocytes T naïfs, cette amplification est aussi suivie d'une augmentation de la production d'IL-2 [141]. En outre, la stimulation des intégrines $\beta 1$ exprimées à la surface des lymphocytes T effecteurs/mémoires, isolés à partir

de la lamina propria, constitue un signal costimulateur augmentant la prolifération de ces cellules et leur production d'IL-2, d'INF γ (interferon gamma) et de TNF α [142]. Chez les patients atteints du LES (lupus érythémateux systémique), l'activation des intégrines $\beta 1$ augmente l'auto-réactivité des lymphocytes T en augmentant leur prolifération et leur expression en CD40L [143]. De même, Chez les patients atteints d'AR (Arthrite rhumatoïde), la surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ augmente l'accumulation des cellules T au niveau du liquide synovial. Cette accumulation amplifie l'activation des lymphocytes T en augmentant leur interaction avec la FN de la MEC [144].

1.2.2.2.3.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la survie des lymphocytes T :

1.2.2.2.3.3.1. Introduction à l'apoptose lymphocytaire

La survie des lymphocytes T est contrôlée par deux mécanismes : L'ACID (Mort induite par l'activation) et l'ACAD (Apoptose autonome des cellules T activées). L'ACID est une apoptose cellulaire programmée due à l'activation des cellules T. Elle est dépendante de la voie extrinsèque de l'apoptose qui est réglée par les récepteurs de mort surtout le couple Fas/FasL. Contrairement à l'ACID, l'ACAD est une apoptose lymphocytaire résultante de la chute de concentration d'IL-2. Cette forme d'apoptose lymphocytaire est contrôlée par la voie intrinsèque d'apoptose et elle est indépendante des récepteurs de mort.

1.2.2.2.3.3.2. Le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la survie des lymphocytes T :

L'activation des intégrines lymphocytaires de la famille $\beta 1$ augmente la survie lymphocytaire en inhibant leur apoptose programmée. L'engagement des intégrines $\beta 1$ induit l'activation de plusieurs voies de signalisation comme les kinases Src (Lck et Fyn), la PLC γ , les MAPK (p38/ERK1/2) et les PI3K/Akt [145].

L'activation de ces voies de signalisation, surtout celle des MAPK et des PI3K, augmente la survie des lymphocytes T en inhibant l'apoptose médiée par le récepteur Fas [146, 147]. Dans les lymphocytes T, la phosphorylation de la voie MAPK inhibe l'activité des protéines pro-apoptotiques comme les caspase-8 et 9 ainsi que les protéines pro-apoptotiques Bid [146, 148]. De même, l'activation de la voie PI3K constitue une autre voie de survie pour les lymphocytes T [147]. Son activation augmente la survie lymphocytaire en inhibant l'action des protéines pro-apoptotiques caspase-9 et Bad [149, 150]. Cette inhibition est suivie par une surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 [151]. Chez les patients atteints d'AR, l'engagement des intégrines $\beta 1$ induit l'activation de la voie p38 MPAK. Cette activation augmente la survie lymphocytaire en inhibant le clivage de la caspase-8 [152]. En outre, l'engagement de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ prévient l'AICD des lymphocytes T CD8⁺ en amplifiant l'effet protecteur du TGF- β [153]. De même, L'activation des intégrines $\alpha 5\beta 1$ à la surface des lymphocytes T extraits de la lamina propria du tissu intestinal augmente le ratio BCL-x /BAX prévenant ainsi l'apoptose lymphocytaire par ACID [142]. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est aussi capable de diminuer l'apoptose des lymphocytes T induite par l'acide butyrique [154].

1.2.2.2.4. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le CD40L :

Récemment, *leveille et al.* ont montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ constituait un nouveau récepteur pour le CD40L. Ils ont montré que le CD40L interagissait avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée par la lignée monocyttaire U937. Cette liaison induit la phosphorylation des ERK1/2 et la surexpression de l'interleukine-8. Contrairement à son ligand naturel, la FN, le CD40L se lie à la forme inactive de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En plus, cette liaison se fait indépendamment des résidus impliqués dans l'interaction du CD40L avec CD40 [10] (Fig.9). Dans une autre étude, il a été montré que chez les sujets asthmatiques, l'interaction du CD40L des lymphocytes T avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des fibroblastes bronchiques augmentait la sécrétion

d'IL-6 par les fibroblastes et par conséquent, l'inflammation au niveau de la muqueuse pulmonaire [155].

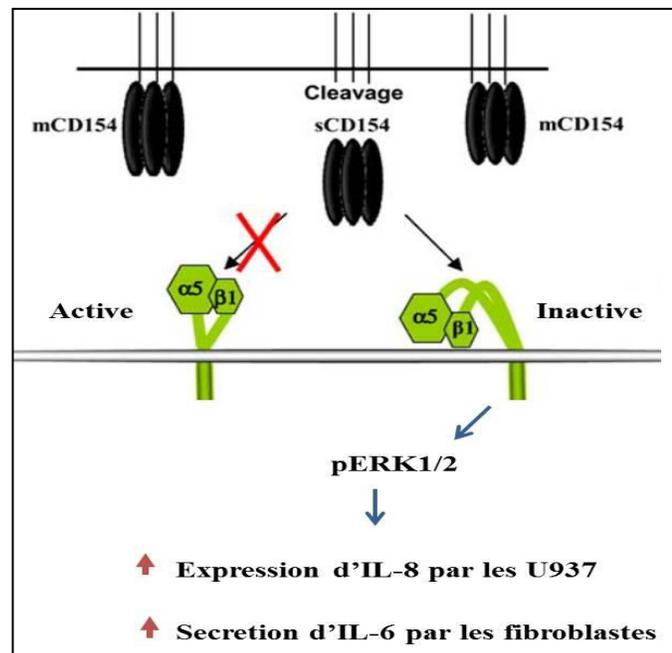


Figure 1. 9: L'interaction du CD40L avec l' $\alpha 5 \beta 1$ et la réponse cellulaire résultante.

Le CD40L induit la phosphorylation des ERK1/2, la surexpression d'IL-8 et la sécrétion d'IL-6.

1.2.2.2.5. CD40L et les autres intégrines :

1.2.2.2.5.1. CD40L et l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$:

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, également connue sous le GP IIb / IIIa, est une intégrine plaquettaire régulant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation de thrombus. La signalisation « inside-out » induite par plusieurs agonistes plaquettaire (thrombine, le collagène, l'ADP, ou épinéphrine), aboutissent au changement de conformation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Ce changement de conformation augmente son affinité à ses ligands naturels dont le fibrinogène, la FN et le facteur von Willebrand [46]. La liaison est médiée par la séquence RGD trouvée sur de nombreux ligands d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Il a été aussi démontré que le CD154 pouvait interagir avec l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, grâce à la séquence RGD présente dans la partie extracellulaire de la molécule CD154. La liaison du CD154 à l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, induit la phosphorylation des résidus tyrosine au niveau du domaine cytoplasmique de la chaîne β3 . Cette phosphorylation est nécessaire pour la stabilité des thrombi artériels [156]. Ces résultats démontrent que le CD154, à travers son interaction avec l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, est un agoniste plaquettaire qui fonctionne d'une manière autocrine pour régler la biologie des plaquettes.

1.2.2.2.5.2. Le CD40L et l'intégrine Mac-1 :

Récemment, le Mac-1 (CD11b/CD18), un membre de la famille des intégrines leucocytaires, a également été identifié comme un récepteur du CD154 [11]. La liaison du CD40L au Mac-1 dépend du motif EQLKKSRTL du domain-I du Mac-1[157]. Comme avec ses ligands classiques, tels que le C3bi, l'ICAM-1 et le fibrinogène, seule la conformation active de Mac-1 peut interagir avec le CD154. Cette liaison accorde au Mac-1 un rôle dans les réponses immunitaires, la coagulation et l'inflammation [158]. En effet, Zirlik et al. ont démontré que le CD154 induit l'adhérence et la migration des monocytes *via* sa liaison avec le Mac-1 monocytaire. De plus, l'inhibition du Mac-1, chez les souris LDLR^{-/-}, atténue le développement de la plaque artérielle et l'accumulation de macrophages au niveau des lésions [11]. Par ailleurs, chez les souris ApoE^{-/-}, qui sont un autre modèle de souris sujettes à l'athérosclérose, Li et al. ont montré que le CD154

régulait l'expression du Mac-1 sur les neutrophiles et améliorait le recrutement des leucocytes ainsi que la formation de la néo-intima, après une blessure artérielle [159].

Rationnel et Hypothèse

Rationnel et hypothèse :

Les lymphocytes T sont le 'chef d'orchestre' du système immunitaire. Au-delà de leur rôle physiologique, leur implication dans les maladies auto-immunes a été bien étudiée. Dans le tissu synovial des patients atteints d'AR, 30 à 40 % des cellules immunitaires sont des lymphocytes T. La survie de ces cellules et leur résistance à l'apoptose programmée, favorisent leur persistance au niveau des sites d'inflammation et contribuent à l'augmentation de la sévérité de la maladie.

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est considérée parmi les intégrines $\beta 1$ les plus étudiées à la surface des lymphocytes T. Son interaction avec son ligand naturel, la FN, joue un rôle crucial dans la migration, la prolifération et la survie des lymphocytes T. Récemment, le CD40L a été identifié comme étant un nouveau ligand pour l' $\alpha 5\beta 1$, mais l'importance biologique de cette interaction n'a pas encore été élucidée. Une expression aberrante de cette intégrine caractérise les lymphocytes T dans plusieurs maladies inflammatoires comme l'AR et le LES. La surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est accompagnée d'une augmentation du taux de CD40L membranaire et soluble d'où notre hypothèse que :

L'interaction du CD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ des lymphocytes T pourrait jouer un rôle dans leur survie et leur résistance à l'apoptose programmée.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons formulé les objectifs suivants :

- 1) Étudier la capacité du CD40L à lier l' $\alpha 5\beta 1$ lymphocytaire
- 2) Identifier les voies de signalisation induites suite à l'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ lymphocytaire par le CD40L.
- 3) Étudier l'effet de ces signaux intracellulaires sur le changement conformationnel de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

2.1. Les réactifs et les anticorps:

Le CD40L soluble et la forme soluble de CD40-Fc ont été générés dans notre laboratoire selon la méthode décrite précédemment. Les anticorps : anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-AKT et anti-AKT ont été obtenus de la compagnie « Cell signaling technology » (Beverly, MA). Les anticorps anti-Mac-1 ont été commandés de la compagnie « BD biosciences » tandis que les anti- $\alpha 5\beta 1$ (le clone JBS5) et les anti- $\alpha II\beta 3$ ont été obtenus de la compagnie « Santa Cruz Biotechnology » (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti-CD40 (le clone G28.5) ont été générés dans notre laboratoire selon la méthode décrite dans le référence [10].

Le marquage des protéines CD40L et avidine avec le fluochrome Alexa-488 a été réalisé en utilisant l'« Alexa Fluor-488 labeling kit » obtenu du « molecular probes » (Eugene, OR) et en suivant les instructions du fabricant. L'agent chimique DTT a été obtenu d'Invitrogène (Burlington, ON). L'anticorps anti-B44 et la forme soluble de l' $\alpha 5\beta 1$ ont été des cadeaux généreux obtenus du Dr. John A. Wilkins ('Manitoba Centre for Proteomics and Rheumatic Diseases', Université de Manitoba, Winnipeg, MB).

2.2. Les lignées cellulaires :

Les lignées lymphoblastiques Jurkat E6.1 (ATCC, Manassas, VA, USA) et BJAB (obtenues du Docteur, J. Menezes, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada) ont été maintenues dans un milieu RPMI 1640 contenant 5% du sérum fœtal bovin (FBS) et 1% de L-glutamine, de pénicilline et de la streptomycine (Bison d'Europe, St-Bruno, QC, Canada). Les lymphocytes T primaires ont été purifiés à partir du sang périphérique des donneurs sains par une sélection négative en utilisant le RobotSep, le 'T cell enrichment kit' et en suivant les instructions du fabricant (Easysep).

2.3. La cytométrie en flux :

L'expression des lignées Jurkat E6.1 et des lymphocytes T primaires en CD40, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ et $\alpha I Ib\beta 3$ a été déterminée par cytométrie en flux. Les cellules ont été incubées pendant 30 min à 4⁰C avec les anticorps G28.5 (1 μ g/5x10⁵ cellules), JBS5 (200 ng/5x10⁵ cellules), anti- $\alpha M\beta 2$ (500 ng/5x10⁵ cellules) et anti- $\alpha I Ib\beta 3$ (200 ng/5x10⁵ cellules) ou bien avec l'isotype contrôle. Ces anticorps ont été suivis par un anticorps secondaire chèvre anti-souris IgG-Alexa488 pour 30 min à 4⁰C.

2.4. L'activation cellulaire :

Les cellules E6.1 et les lymphocytes T primaires ont été incubés à 37⁰c pendant 3h dans un milieu RPMI 1640 sans FBS. Ensuite les cellules ont été activées pendant 2, 5 et 10 min avec le sCD40L (500ng /5x10⁵ cellules) ou bien avec le JBS5 (200 ng/5x10⁵ cellules). L'activation de ces cellules a été arrêtée en ajoutant le tampon de lyse 2x contenant de la SDS, 10% de 2-mercaptoethanol, de la protéase inhibiteur (Roche, Montréal, QC, Canada) et de la phosphatase inhibiteur (Sigma-Aldrich, Oaskville, ON). Finalement, les échantillons ont été lysés à 95⁰c pendant 7 min.

2.5. L'activation des intégrines :

Le changement structural de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ suite à son interaction avec le CD40L a été étudié en analysant l'exposition de l'épitope B44 [160]. Le DTT a été utilisé comme contrôle positif. Les cellules Jurkat E6.1 ont été incubées avec le sCD40L (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour 2 h à 37°C ou bien avec de DTT (10mM) pour 30 min à la température pièce. Le changement structural a été étudié par la cytométrie en flux, en utilisant l'anticorps anti-B44 (FACS Calibur, BD Biosciences, Mountain View, CA).

2.6. L'adhésion cellulaire :

L'adhésion des cellules à une matrice de fibronectine est une autre approche utilisée pour étudier le changement structural de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Le DTT a été utilisé comme contrôle positif. Les cellules Jurkat E6.1 ont été incubées avec le sCD40L (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour 2 h à 37°C ou bien avec de DTT (10mM) pour 30 min à la température de la chambre. L'adhésion des cellules activées à la matrice de fibronectine a été étudiée selon la méthode décrite précédemment.

2.7. Western blot :

Les lysas cellulaires ont été séparés sur un gel d'acrylamide de 10% (SDS-PAGE). Les protéines ont été ensuite transférées sur des membranes polyvinylidene difluoride (Millipore Corporation). Ces dernières ont été bloquées pendant 1h avec une solution de 5% de lait dans du TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween-20). Par la suite, elles ont été incubées 12h à 4°C avec les anticorps: anti-phospho-p38, anti-phospho-ERK1/2 et anti-phospho-AKT. Après un lavage pendant 30 min au TBS-T, les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-IgG1 de souris conjugué au horseradish peroxydase (HRP) pour 1h à température ambiante. Finalement, les membranes ont été révélées par chimioluminescence

ECL plus (GEHealthcare Biosciences). Ces mêmes membranes ont été déshybridées puis incubées et révélées de la même façon en utilisant les anti-P38 total, les anti-ERK1/2total et les anti-AKT total (obtenus de la compagnie « Cell signaling technology » (Beverly, MA)).

Chapitre 3: Résultats

3.1. Le sCD40L lie l' $\alpha 5\beta 1$ exprimée par les lymphocytes T et induit des signaux intracellulaires:

En 2007, nous avons montré que la forme soluble du CD40L est capable de lier l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée à la surface des lignées monocytaires U937 [10]. Due à son expression constitutive à la surface des lymphocytes T, nous avons étudié la liaison du sCD40L à l' $\alpha 5\beta 1$ exprimée à la surface des lignées lymphocytaires Jurkat E6.1 et des lymphocytes T purifiés du sang périphérique. La figure 1A montre que parmi les quatre récepteurs du CD40L, l' $\alpha 5\beta 1$ est le seul récepteur détecté à la surface des cellules T, contrairement au CD40, Mac-1 et $\alpha IIb\beta 3$. Le sCD40L a été capable de lier significativement les deux types cellulaires. Cette liaison a induit l'activation de certaines voies intracellulaires surtout les voies des MAP et PI3 kinases. L'interaction de sCD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ des Jurkat E6.1 et des lymphocytes T primaires a abouti à une activation dépendante du temps des protéines intracellulaires ERK1/2, P38 et AKT (Figure 1C).

3.2. Le sCD40L lie spécifiquement l' $\alpha 5\beta 1$ à la surface des jurkat E6.1 :

Dans le but de démontrer la spécificité de l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$, la liaison de CD40L aux lignées Jurkat E6.1 et Bjab a été faite en présence de l' $\alpha 5\beta 1$ soluble, du sCD40L non marqué ou en présence du sCD40. La pré-incubation des cellules avec le sCD40L non marqué a abolit complètement la liaison du CD40L-Alexa488 aux lignées E6.1 et Bjab. La pré-incubation du sCD40L-alexa488 avec la forme soluble de l' $\alpha 5\beta 1$ a diminué significativement sa liaison aux lignées E6.1 mais elle n'a pas affecté la liaison aux lignées Bjab. Contrairement au $\alpha 5\beta 1$, la pré-incubation du sCD40L-alexa488 avec le sCD40 a abolit la liaison aux cellules Bjab mais elle n'a pas influencés la liaison au lignées E6.1.

Ces résultats démontrent la spécificité de l'interaction du sCD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ des cellules E6.1. En plus, ils suggèrent que les résidus impliqués dans l'interaction du CD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ sont différents de ceux impliqués dans l'interaction avec le CD40.

3.3. L'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ par le CD40L n'induit pas son changement structural :

La famille des intégrines est caractérisée par son changement structural suite à l'activation cellulaire. Ce changement est médié par un ensemble des signaux intracellulaires nommés « inside out » qui à leur tour, augmentent l'affinité des intégrines à leurs ligands naturels [46]. Dans cette étude on a montré que l'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ par le CD40L induit l'activation de plusieurs voies de signalisations. Pour cela, on a voulu étudier l'effet de ces signaux sur le changement structural de l' $\alpha 5\beta 1$. L'exposition de l'épitope B44 et l'adhésion cellulaire à une matrice de fibronectine ont été les deux approches utilisées afin d'étudier cet effet.

Contrairement à l'agent chimique, le DTT (le contrôle positif), l'activation des cellules Jurkat E6.1 par le sCD40L n'a pas induit l'exposition de l'épitope B44. De même, le traitement des lignées Jurkat E6.1 avec le sCD40L n'a pas déclenché leur adhésion à la matrice de fibronectine. Par contre, le traitement de ces lignées avec le DTT a induit une forte adhésion.

Ces résultats montre que la liaison du CD40L à l' $\alpha 5\beta 1$ est capable d'activer les cellules mais elle n'induit pas le changement structural des intégrines $\alpha 5\beta 1$.

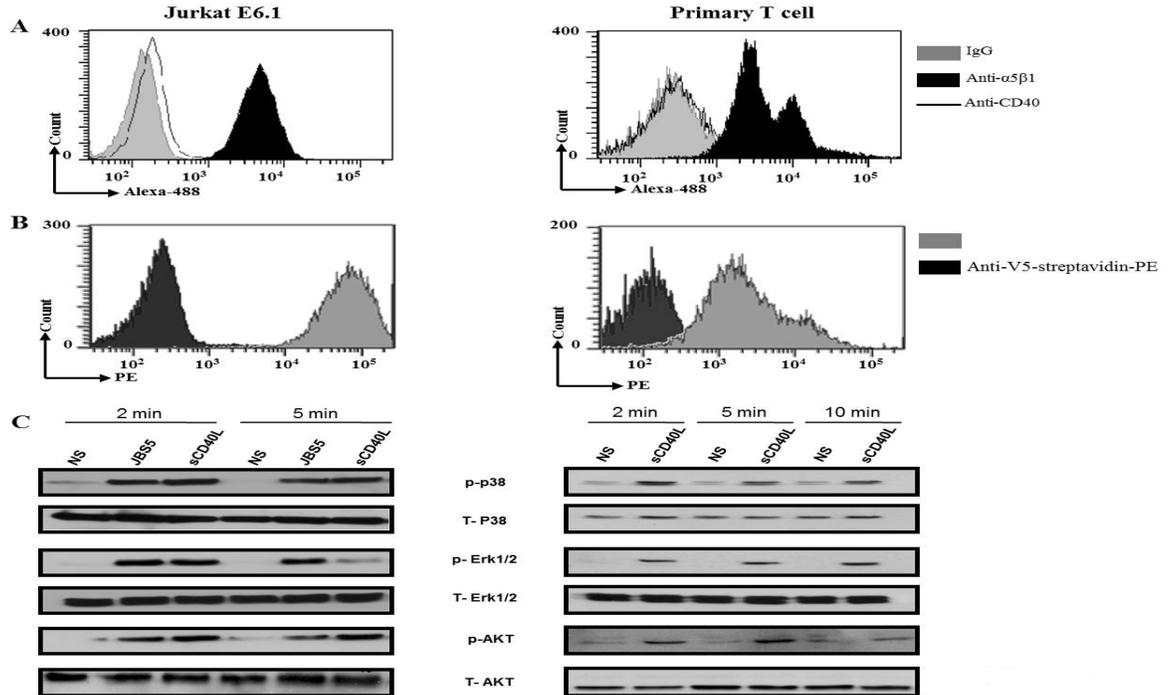


Figure 3. 1: Le sCD40L lie l' $\alpha 5\beta 1$ exprimée par les lymphocytes T et induit des signaux intracellulaires.

(A) L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et du récepteur CD40 à la surface des jurkat E6.1 et les lymphocytes T primaires a été faite par la cytométrie en flux. Les cellules ont été incubées pour 30 min à 4°C , avec l'anticorps JBS5 (anti- $\alpha 5\beta 1$), avec l'anticorps G28.5 (anti-CD40) ou bien avec un isotype contrôle (IgG). (B) La liaison du sCD40L aux Jurkat E6.1 et aux lymphocytes T primaires. Les cellules ont été incubées ou non avec le sCD40L (500 ng/ 5×10^5 cellules) pour 1h à 37°C et suivi de l'anti-V5 et de stréptavidine-PE pour 30 min chacun à 4°C . La liaison du CD40L a été révélée par la cytométrie en flux. (C) les Jurkat E6.1 et les lymphocytes T primaires ont été activés avec le sCD40L (500 ng/ 5×10^5 cellules) ou bien avec l'anticorps JBS5 (200 ng/ 5×10^5 cellules) pour 2, 5, et 10 min à 37°C . L'activation a été arrêtée par l'addition de laemlli buffer (2x) contenant de la protéase inhibitrice. La phosphorylation des protéines p38, ERK1/2 et Akt a été étudiée par western blot. Les expériences ont été répétées trois fois.

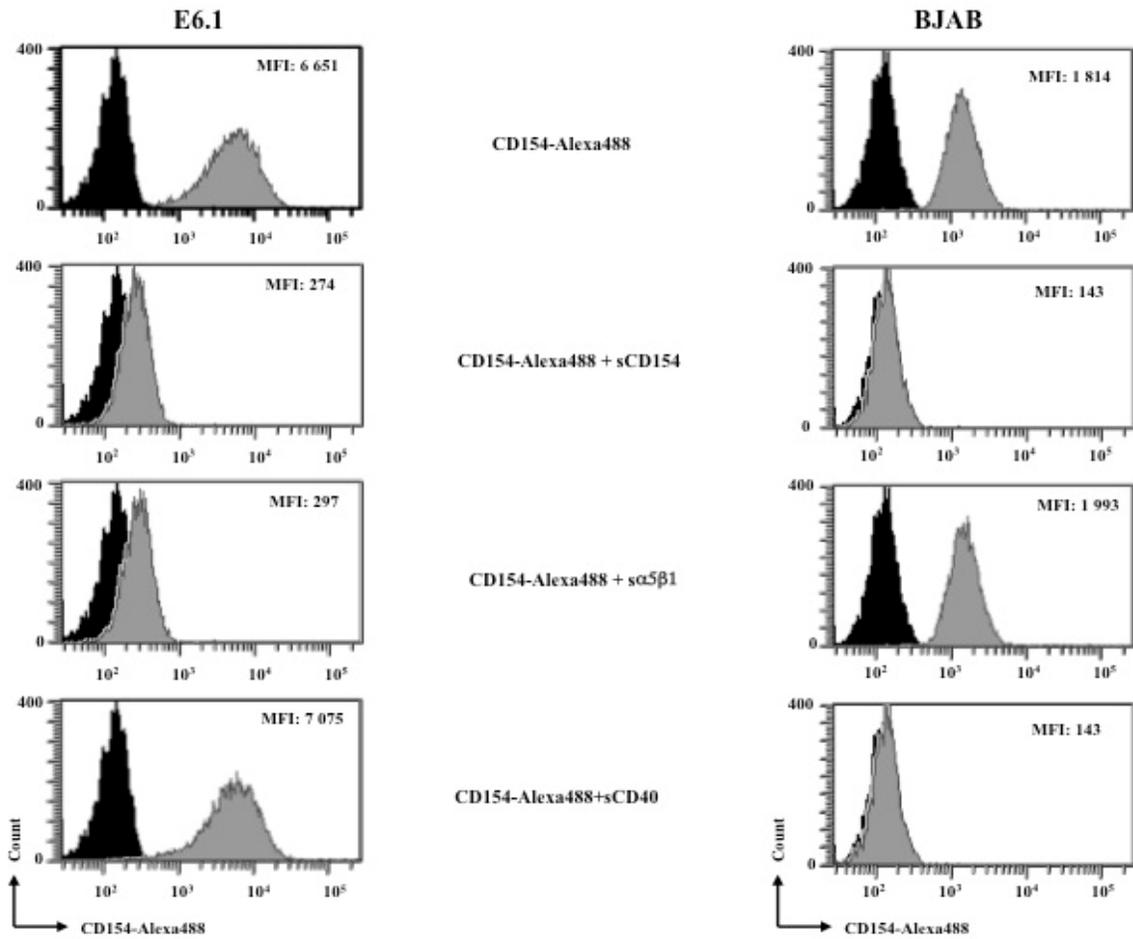


Figure 3. 2 : Le sCD40L lie spécifiquement l' $\alpha 5\beta 1$ à la surface des Jurkat E6.1

Les cellules Jurkat E6.1 ($\alpha 5\beta 1^+ / CD40^- / \alpha M\beta 2^- / \alpha I I b \beta 3^-$) et les Bjab ($\alpha 5\beta 1^- / CD40^+ / \alpha M\beta 2^- / \alpha I I b \beta 3^-$) ont été incubées avec le sCD40L-alexa488 (200 ng/5x10⁵ cellules) en présence ou non du sCD40L non marqué (2 μ g /5x10⁵ cellules), du $\alpha 5\beta 1$ (excès 10 fois molaire de $\alpha 5\beta 1$) ou du sCD40 (excès 10 fois molaire de sCD40). Le sCD40L non marqué a été incubé avec les cellules pour 1h à 37°C avant l'ajout du sCD40L-alexa488. Le $\alpha 5\beta 1$ et le sCD40 ont été pré-incubés avec le sCD40L-alexa488 pour 1h à 37°C avant d'être ajoutés aux cellules. La liaison du CD40L a été évaluée par la cytométrie en flux. Cette expérience a été faite trois fois.

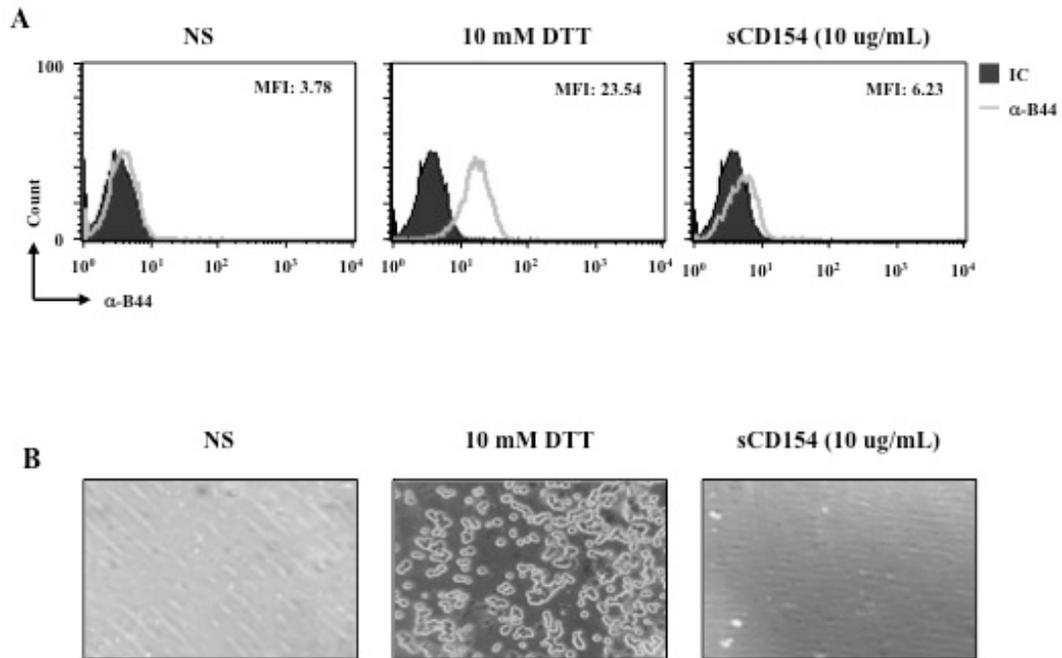


Figure 3. 3 : L'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ par le CD40L n'induit pas son changement structural

Les lignées Jurkat E6.1 ont été stimulées avec le DTT (10 mM) pendant 30 min à la température ambiante ou bien avec le sCD40L (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour 2h à 37⁰C. Le changement structural de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été évalué par la cytométrie en flux en utilisant l'anticorps anti-B44 (500ng/ 5x10⁵cellules) (A) ou bien en étudiant l'adhérence cellulaires sur une matrice de fibronectine (B). Cette expérience a été répétée trois fois.

Chapitre 4: Discussion et perspectives

4.1. Discussion :

Le CD40L joue un rôle crucial durant la réponse immunitaire ainsi que dans le développement de plusieurs maladies auto-immunes. Ce rôle a été associé à son interaction avec le récepteur CD40. Récemment, trois autres récepteurs du CD40L ont été identifiés: le Mac-1 [11], l' α IIb β 3 [9] et l' α 5 β 1 [10]. L'interaction avec le Mac-1 induit l'accumulation des leucocytes durant l'athérogénèse tandis qu'elle joue un rôle dans la stabilité du thrombus avec l' α IIb β 3. L'interaction avec l' α 5 β 1 a été démontrée dans notre laboratoire toutefois son importance biologique n'a pas encore été bien élucidée.

Cette étude porte sur le rôle biologique de l'interaction du CD40L avec l'intégrine α 5 β 1 exprimée par les lymphocytes T. Ces cellules sont connues par leur expression de plusieurs intégrines β 1 incluant l' α 5 β 1. Cette dernière a été identifiée sur les lymphocytes T mémoires et sur 50% des lymphocytes T du sang périphérique [161]. Dans certaines maladies inflammatoires, l'expression des intégrines β 1 à la surface des lymphocytes T, augmente. Chez les patients atteints de l'AR, les lymphocytes T purifiés à partir du liquide synovial, présentent une expression aberrante des intégrines β 1 dont les intégrines α 5 β 1 [144]. Les intégrines β 1 sont aussi surexprimées à la surface des lymphocytes T des patients atteints du LES [143]. En outre, ces maladies auto-immunes (AR et LES) sont caractérisées par une surexpression du CD40L sous sa forme membranaire et sous sa forme soluble active [162, 163]. La co-localisation du CD40L et de son nouveau récepteur l' α 5 β 1 au niveau des sites d'inflammations, augmente la probabilité d'une importante implication de ce couple dans la réponse biologique des lymphocytes T.

Les lignées lymphocytaires Jurkat E6.1 ainsi que les lymphocytes T du sang périphérique ont été utilisés dans cette étude. Afin d'y vérifier leur validité, l'expression de l' α 5 β 1 ainsi que celle des autres récepteurs du CD40L, a été évaluée. Les résultats ont montré que parmi les récepteurs du CD40L, seulement l' α 5 β 1 était exprimée par les lignées lymphocytaires Jurkat E6.1 ainsi que par les lymphocytes T du sang périphérique, contrairement aux CD40, aux Mac-1 et à l' α IIb β 3.

La liaison du CD40L à l' α 5 β 1 a été montrée à la surface des lignées monocytaires : les U937. Pour cela, il était important de vérifier la liaison du CD40L à l' α 5 β 1 lymphocytaire.

Cette dernière a été liée par le CD40L à la surface des Jurkat E6.1 et des lymphocytes T périphériques. Cette liaison est spécifique à l' $\alpha 5\beta 1$ et au CD40L. Elle est aussi indépendante des résidus du CD40L qui sont impliqués dans l'interaction avec le CD40. L'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ lymphocytaire par le CD40L a induit l'activation des voies de signalisation MAPK (ERK1/2 et P38) et PI3K/Akt. Ces mêmes voies de signalisation ont été observées suite à l'interaction des intégrines $\beta 1$ lymphocytaires avec la MEC.

Les intégrines sont connues pour leur changement conformationnel. Le passage de la conformation inactive à la conformation active dépend des signalisations intracellulaires connues par les 'outside-in' et 'inside out'[164]. Dans cette étude, la signalisation 'outside-in' induite par CD40L *via* la forme inactive de l' $\alpha 5\beta 1$, n'a pas abouti à un changement structural de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ce résultat est traduit par l'incapacité du CD40L d'induire l'adhésion des cellules à une matrice de FN. Le changement structural des intégrines $\beta 1$ lymphocytaires joue un rôle essentiel dans l'adhésion et la migration des lymphocytes T, en augmentant leur interaction avec la MEC. L'incapacité de CD40L d'induire un changement conformationnel de l' $\alpha 5\beta 1$, diminue la probabilité d'une implication du couple CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ dans l'adhésion lymphocytaire à la MEC et par conséquent, dans leur migration vers les sites d'inflammations.

L'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K est connue par son effet anti-apoptotique chez les lymphocytes T [147]. La phosphorylation d'ERK1/2 et de p38 chez les lymphocytes T, inhibe l'apoptose cellulaire induite *via* Fas [146, 165]. Les études ont montré que l'activation de la voie lymphocytaire MAPK inhibe l'activité des protéines pro-apoptotiques comme les caspase-8 et les protéines Bid [146, 165]. De même, la voie MAPK peut augmenter la survie des lymphocytes T en inhibant le rôle des caspase-9 [148]. Chez les patients atteints de l'AR, l'augmentation de la phosphorylation des MAPK est directement associée à la survie des lymphocytes T et à leur résistance à la mort cellulaire induite *via* Fas. Chez ces lymphocytes, le P38 phosphorylé forme un complexe avec la caspase-8 inhibant ainsi son effet pro-apoptotique [152]. En plus de la voie des MAPK, l'activation, *via* les intégrines, de la voie PI3K/Akt contribue efficacement à l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T induite *via* Fas. Cette inhibition a été observée chez des

souris transgéniques exprimant une forme active d'Akt sous le contrôle d'un promoteur spécifique pour les lymphocytes T [166, 167]. Plusieurs protéines pro-apoptotiques comme Bad et les caspase-9 ont été considérées comme étant des substrats pour la protéine Akt. La phosphorylation des protéines Bad et des caspase-9 par l'Akt inhibe leur effet pro-apoptotique et augmente la survie cellulaire [149, 150]. L'inactivation des protéines Bad par l'Akt, est aussi suivie par une surexpression des protéines anti-apoptotiques comme les Bcl-x_L et les Bcl-2 [151].

La balance entre la survie et l'apoptose programmée des cellules immunitaires, régule l'homéostasie du système immunitaire et prévient le développement des maladies inflammatoires et auto-immunes. Durant la réponse immunitaire, l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T constitue un mécanisme essentiel pour qu'ils puissent accomplir leur rôle effecteur. Ce même mécanisme est aussi requis pour la différenciation des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoires. Le rôle de survie joué par le CD40L via l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, pourrait avoir des implications physiologiques et physiopathologiques. Le CD40L est connu pour être exprimé puis clivé de la surface cellulaire quelque heures après l'activation des cellules T [168]. Il exercerait ainsi son effet anti-apoptotique au début de la réponse immunitaire ce qui constituerait un nouveau signal de survie indispensable pour l'accomplissement des fonctions effectrices des lymphocytes T. De même, à la fin de réponse immunitaire, la chute de la concentration d'Il-2, implique que la différenciation des lymphocytes T en cellules mémoires sera dépendante des autres signaux de survie. L'interaction du CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait être un des signaux contrôlant la survie des lymphocytes T durant leur différenciation en cellules mémoires.

Contrairement à leur rôle bénéfique durant la réponse immunitaire, les mécanismes de survie cellulaire contribuent à la sévérité de plusieurs maladies auto-immunes. La survie des lymphocytes T ainsi que leur résistance à l'apoptose induite *via* Fas, augmentent l'accumulation et la persistance de ces cellules au niveau du liquide synovial [169, 170]. Ce dernier a été considéré comme étant la source principale des signaux de survie des lymphocytes T. En plus, plusieurs études ont associé la sévérité de l'arthrite rhumatoïde à l'augmentation de la concentration du CD40L soluble au niveau du liquide synovial. Ceci

suggère que la persistance, l'accumulation et la survie des cellules T au niveau des articulations enflammées sont contrôlées en partie par l'effet du couple CD40L/ $\alpha 5\beta 1$.

En se basant sur les caractéristiques anti-apoptotiques des voies de signalisations induites par le CD40L *via* l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et sur la fonction anti-apoptotique des intégrines $\beta 1$ des lymphocytes T, l'interaction du CD40L avec l' $\alpha 5\beta 1$ pourrait constituer un nouveau couple contribuant à la survie des lymphocytes T. D'autres études seront nécessaires pour montrer ce rôle afin de mieux comprendre la contribution de ce couple dans l'homéostasie de système immunitaire ainsi que dans le développement des maladies auto-immunes.

4.2. Perspectives :

Dans cette étude, on a montré que le CD40L liait l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface des Jurkat E6.1 et des lymphocytes T du sang périphérique. L'engagement de l' $\alpha 5\beta 1$ avec le CD40L induit l'activation des voies de signalisations intracellulaires dont les MAPK et les PI3K dans les deux types cellulaires.

Cette étude a identifié le type anti-apoptotique des signaux induits par le CD40L *via* l' $\alpha 5\beta 1$. Par contre, elle n'a pas démontré le rôle anti-apoptotique ni le mécanisme par lequel le couple CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ exercerait son effet anti-apoptotique.

Tout d'abord, l'effet anti-apoptotique de l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ devrait être étudié chez des lignées cancéreuses lymphoblastiques telle que les Jurkat E6.1. Ensuite, des études utilisant les lymphocytes T du sang périphérique, seront importantes afin d'évaluer la pertinence physiologique de cette fonction anti-apoptotique. En outre, les lymphocytes T primaires constituent une population de cellules très hétérogènes. Plusieurs sous-populations de lymphocytes T ont été découvertes; on cite : les CD4 (Th1, Th2, Treg, Th17) et les CD8. Chacune de ces sous populations est caractérisée par un rôle bien déterminé durant la réponse immunitaire. L'identification de taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface de ces cellules pourrait nous aider à estimer la contribution du couple CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ dans la réponse spécifique de chacune de ces sous populations lymphocytaires.

La survie cellulaire résulte de l'inhibition des protéines pro-apoptotique et de l'activation des protéines anti-apoptotiques. L'effet exercé par l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ sur l'ensemble de ces protéines devrait être évalué. Pour cela, il serait intéressant d'étudier l'effet du CD40L sur l'inhibition des protéines pro-apoptotiques comme les caspases-8, 3 et 9, les Bax, les Bad et les BIM. En plus de son effet inhibiteur sur les protéines pro-apoptotiques, l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait augmenter la survie cellulaire en activant des protéines anti-apoptotiques. Dans les prochaines étapes, il serait important d'étudier l'effet de

l'interaction CD40L/ $\alpha 5\beta 1$ sur l'expression et l'activation des protéines anti-apoptotiques comme les Bcl-2, les Bclx et les FLIP.

En plus, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques des MAPK et PI3K servira à élucider le mécanisme d'action de chacune de ces voies sur l'ensemble des protéines anti- et pro-apoptotiques.

En plus de leur rôle dans la survie des lymphocytes T, les intégrines $\alpha 5\beta 1$, suite à leur interaction avec la FN, ont été considérées comme des signaux costimulateurs favorisant la prolifération cellulaire et la sécrétion d'IL-2. L'impact de leur interaction avec leur nouveau ligand, le CD40L, sur la prolifération ainsi que sur la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T est une question à résoudre dans les études futures.

L'expression du CD40 a été identifiée à la surface des lymphocytes T dans certaines maladies auto-immunes. À la surface de ces cellules, deux récepteurs pour le CD40L seront exprimés. Il sera donc intéressant d'étudier l'effet de la coexistence de ces récepteurs sur la réponse biologique des lymphocytes T, soit sur leur survie, soit sur leur rôle costimulateur. Du point de vue moléculaire, les résidus du CD40L impliqués dans l'interaction avec le CD40, sont différents de ceux intervenant dans l'interaction avec l' $\alpha 5\beta 1$. Ceci suggère que le CD40L trimérique pourrait engager simultanément les deux récepteurs. Cette possibilité est actuellement en étude utilisant la technique du BRET.

Finalement, les résidus du CD40L impliqués dans l'interaction avec l' $\alpha 5\beta 1$ et le Mac-1 ne sont pas encore découverts, contrairement au CD40 (R/Y) et $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (séquence RGD). Une fois identifié, des formes mutées au niveau des résidus du CD40L impliqués dans l'interaction avec chacun de ses récepteurs seront générées. Ces mutants serviront à vérifier la contribution de chacun des récepteurs du CD40L dans la réponse immunitaire et dans le développement des maladies auto-immunes comme l'AR. Certains essais cliniques ont utilisé les anti-CD40L durant le traitement de l'AR. Ces essais ont été associés à des complications thromboemboliques, due à l'activation d' $\alpha \text{IIb}\beta 3$ plaquettaire. Ces mutants

pourraient constituer la base d'une nouvelle approche thérapeutique puisqu'ils sont capables de cibler spécifiquement l'effet de chacun des récepteurs du CD40L.

La figure ci-dessous résume le rôle de l'interaction du CD40L avec l'alpha5 des lymphocytes T.

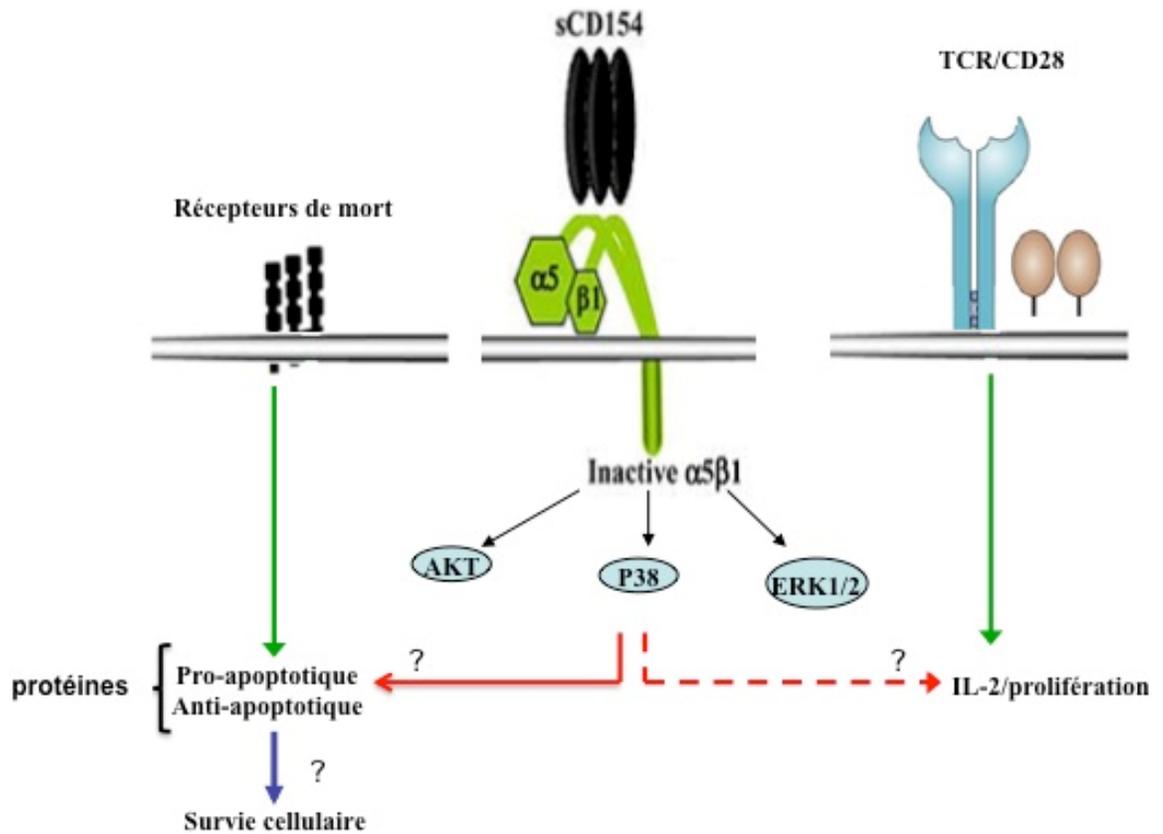


Figure 4. 1 : schéma représentatif de l'interaction CD40L/a5b1 et le rôle biologique correspondant.

Bibliographie

1. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR *et al*: **Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40**. *Nature* 1992, **357**(6373):80-82.
2. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L: **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):1091-1101.
3. Schonbeck U, Mach F, Libby P: **CD154 (CD40 ligand)**. *Int J Biochem Cell Biol* 2000, **32**(7):687-693.
4. Graf D, Korthauer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA: **Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells**. *Eur J Immunol* 1992, **22**(12):3191-3194.
5. van Kooten C, Banchereau J: **CD40-CD40 ligand**. *J Leukoc Biol* 2000, **67**(1):2-17.
6. Schonbeck U, Libby P: **The CD40/CD154 receptor/ligand dyad**. *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**(1):4-43.
7. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA: **The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40**. *Blood* 2001, **98**(4):1047-1054.
8. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A: **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):6550-6554.
9. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD: **CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism**. *Nat Med* 2002, **8**(3):247-252.
10. Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, Reyes-Moreno C, Lapointe R, Merhi Y, Wilkins JA *et al*: **CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling**. *J Biol Chem* 2007, **282**(8):5143-5151.
11. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A *et al*: **CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1**. *Circulation* 2007, **115**(12):1571-1580.
12. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: **The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology**. *Cell* 2001, **104**(4):487-501.
13. Lafage-Pochitaloff M, Herman P, Birg F, Galizzi JP, Simonetti J, Mannoni P, Banchereau J: **Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2**. *Leukemia* 1994, **8**(7):1172-1175.

14. Tone M, Tone Y, Fairchild PJ, Wykes M, Waldmann H: **Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(4):1751-1756.
15. Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM: **CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies.** *Trends Immunol* 2009, **30**(4):165-172.
16. Grammer AC, Lipsky PE: **CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms.** *Advances in immunology* 2000, **76**:61-178.
17. Hill A, Chapel H: **X-linked immunodeficiency. The fruits of cooperation.** *Nature* 1993, **361**(6412):494.
18. Khanna R, Cooper L, Kienzle N, Moss DJ, Burrows SR, Khanna KK: **Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells.** *J Immunol* 1997, **159**(12):5782-5785.
19. Klaus SJ, Berberich I, Shu G, Clark EA: **CD40 and its ligand in the regulation of humoral immunity.** *Semin Immunol* 1994, **6**(5):279-286.
20. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE: **Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(15):7007-7011.
21. Grewal IS, Flavell RA: **CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.** *Annu Rev Immunol* 1998, **16**:111-135.
22. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M *et al*: **The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome.** *Cell* 1993, **72**(2):291-300.
23. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A: **DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL.** *Nat Immunol* 2002, **3**(9):822-829.
24. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: **Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.** *J Exp Med* 1996, **184**(2):747-752.
25. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J: **Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking.** *J Exp Med* 1994, **180**(4):1263-1272.
26. Ma DY, Clark EA: **The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells.** *Semin Immunol* 2009, **21**(5):265-272.
27. Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ, Kopf M: **CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(3):876-881.

28. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK: **CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40.** *J Exp Med* 1993, **178**(2):669-674.
29. Wagner DH, Jr., Stout RD, Suttles J: **Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis.** *Eur J Immunol* 1994, **24**(12):3148-3154.
30. Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA: **Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice.** *J Immunol* 1996, **156**(1):8-11.
31. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P: **Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor.** *Circulation* 1997, **96**(2):396-399.
32. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA: **Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases.** *J Immunol* 1996, **156**(10):3952-3960.
33. Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D: **Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes.** *J Immunol* 1995, **155**(10):4917-4925.
34. Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S: **CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease.** *Trends Mol Med* 2008, **14**(12):530-538.
35. Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U: **Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1.** *J Biol Chem* 2002, **277**(28):25032-25039.
36. Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, Mukhopadhyay D, Briscoe DM: **Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo.** *Blood* 2000, **96**(12):3801-3808.
37. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Atkinson E, Levesque E, Herman M, Graber P, Basset P, Libby P: **Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo.** *J Exp Med* 1999, **189**(5):843-853.
38. Horton DB, Libby P, Schonbeck U: **Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **947**:329-336.
39. Newby AC: **Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques.** *Trends Cardiovasc Med* 2007, **17**(8):253-258.
40. Danese S, Sans M, Fiocchi C: **The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease.** *Gut* 2004, **53**(7):1035-1043.
41. Vigneault F, Zaniolo K, Gaudreault M, Gingras ME, Guerin SL: **Control of integrin genes expression in the eye.** *Prog Retin Eye Res* 2007, **26**(2):99-161.

42. Hynes RO: **Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** *Cell* 1992, **69**(1):11-25.
43. Meenan J, Spaans J, Grool TA, Pals ST, Tytgat GN, van Deventer SJ: **Altered expression of alpha 4 beta 7, a gut homing integrin, by circulating and mucosal T cells in colonic mucosal inflammation.** *Gut* 1997, **40**(2):241-246.
44. Vinogradova O, Haas T, Plow EF, Qin J: **A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(4):1450-1455.
45. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK: **Integrin signaling in malignant melanoma.** *Cancer Metastasis Rev* 2005, **24**(2):195-222.
46. Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell* 2002, **110**(6):673-687.
47. Albelda SM: **Endothelial and epithelial cell adhesion molecules.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, **4**(3):195-203.
48. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD: **Structure and function of cell adhesion molecules.** *Am J Med* 1999, **106**(4):467-476.
49. Berman AE, Kozlova NI: **Integrins: structure and functions.** *Membr Cell Biol* 2000, **13**(2):207-244.
50. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP: **Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:381-410.
51. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA: **Conformational regulation of integrin structure and function.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002, **31**:485-516.
52. Humphries MJ, McEwan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Mould AP: **Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**(6):313-320.
53. Shimaoka M, Xiao T, Liu JH, Yang Y, Dong Y, Jun CD, McCormack A, Zhang R, Joachimiak A, Takagi J *et al*: **Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation.** *Cell* 2003, **112**(1):99-111.
54. van der Flier A, Sonnenberg A: **Function and interactions of integrins.** *Cell Tissue Res* 2001, **305**(3):285-298.
55. Shimaoka M, Salas A, Yang W, Weitz-Schmidt G, Springer TA: **Small molecule integrin antagonists that bind to the beta2 subunit I-like domain and activate signals in one direction and block them in the other.** *Immunity* 2003, **19**(3):391-402.
56. Dedhar S, Hannigan GE: **Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**(5):657-669.
57. Juliano RL, Haskill S: **Signal transduction from the extracellular matrix.** *J Cell Biol* 1993, **120**(3):577-585.
58. Schaller MD, Parsons JT: **Focal adhesion kinase and associated proteins.** *Curr Opin Cell Biol* 1994, **6**(5):705-710.
59. Giancotti FG, Ruoslahti E: **Integrin signaling.** *Science* 1999, **285**(5430):1028-1032.

60. Elnér SG, Elnér VM: **The integrin superfamily and the eye.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, **37**(5):696-701.
61. Liddington RC, Ginsberg MH: **Integrin activation takes shape.** *J Cell Biol* 2002, **158**(5):833-839.
62. Danen EH, Sonnenberg A: **Integrins in regulation of tissue development and function.** *J Pathol* 2003, **201**(4):632-641.
63. Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, Winkler J: **The molecular architecture of focal adhesions.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:379-416.
64. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL: **Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.** *Pharmacol Rev* 1998, **50**(2):197-263.
65. Romer LH, Birukov KG, Garcia JG: **Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus.** *Circ Res* 2006, **98**(5):606-616.
66. Nobes CD, Hall A: **Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.** *Cell* 1995, **81**(1):53-62.
67. Lee JW, Juliano R: **Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways.** *Mol Cells* 2004, **17**(2):188-202.
68. Wiesner S, Legate KR, Fassler R: **Integrin-actin interactions.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(10):1081-1099.
69. Giancotti FG: **A structural view of integrin activation and signaling.** *Dev Cell* 2003, **4**(2):149-151.
70. Schatzmann F, Marlow R, Streuli CH: **Integrin signaling and mammary cell function.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003, **8**(4):395-408.
71. Heasman SJ, Ridley AJ: **Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(9):690-701.
72. Ridley AJ: **Rho GTPases and cell migration.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 15):2713-2722.
73. Streuli CH, Akhtar N: **Signal co-operation between integrins and other receptor systems.** *Biochem J* 2009, **418**(3):491-506.
74. Schwartz MA, Assoian RK: **Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 14):2553-2560.
75. Alam N, Goel HL, Zarif MJ, Butterfield JE, Perkins HM, Sansoucy BG, Sawyer TK, Languino LR: **The integrin-growth factor receptor duet.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(3):649-653.
76. Yu X, Miyamoto S, Mekada E: **Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites.** *J Cell Sci* 2000, **113** (Pt 12):2139-2147.
77. Goel HL, Breen M, Zhang J, Das I, Aznavoorian-Cheshire S, Greenberg NM, Elgavish A, Languino LR: **beta1A integrin expression is required for type 1**

- insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts.** *Cancer Res* 2005, **65**(15):6692-6700.
78. Pu QQ, Streuli CH: **Integrin control of cell cycle: a new role for ubiquitin ligase.** *Bioessays* 2002, **24**(1):17-21.
 79. Roovers K, Assoian RK: **Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery.** *Bioessays* 2000, **22**(9):818-826.
 80. Niu G, Chen X: **Apoptosis imaging: beyond annexin V.** *J Nucl Med*, **51**(11):1659-1662.
 81. Chiarugi P, Giannoni E: **Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells.** *Biochem Pharmacol* 2008, **76**(11):1352-1364.
 82. Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD: **Anoikis resistance and tumor metastasis.** *Cancer Lett* 2008, **272**(2):177-185.
 83. Reddig PJ, Juliano RL: **Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival.** *Cancer Metastasis Rev* 2005, **24**(3):425-439.
 84. Aoudjit F, Vuori K: **Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis.** *J Cell Biol* 2001, **152**(3):633-643.
 85. Rosen K, Shi W, Calabretta B, Filmus J: **Cell detachment triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent overexpression of Fas ligand. A novel mechanism of Anoikis of intestinal epithelial cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**(48):46123-46130.
 86. Marconi A, Atzei P, Panza C, Fila C, Tiberio R, Truzzi F, Wachter T, Leverkus M, Pincelli C: **FLICE/caspase-8 activation triggers anoikis induced by beta1-integrin blockade in human keratinocytes.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 24):5815-5823.
 87. Laguinge LM, Samara RN, Wang W, El-Deiry WS, Corner G, Augenlicht L, Mishra L, Jessup JM: **DR5 receptor mediates anoikis in human colorectal carcinoma cell lines.** *Cancer Res* 2008, **68**(3):909-917.
 88. Matter ML, Ruoslahti E: **A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription.** *J Biol Chem* 2001, **276**(30):27757-27763.
 89. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E: **The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(13):6161-6165.
 90. Woods NT, Yamaguchi H, Lee FY, Bhalla KN, Wang HG: **Anoikis, initiated by Mcl-1 degradation and Bim induction, is deregulated during oncogenesis.** *Cancer Res* 2007, **67**(22):10744-10752.
 91. Bouchard V, Harnois C, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Gauthier R, Vezina A, Noel D, Fujita N, Tsuruo T *et al*: **B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms.** *Apoptosis* 2008, **13**(4):531-542.

92. Galante JM, Mortenson MM, Bowles TL, Virudachalam S, Bold RJ: **ERK/BCL-2 pathway in the resistance of pancreatic cancer to anoikis.** *J Surg Res* 2009, **152**(1):18-25.
93. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS: **The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(9):2519-2526.
94. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS: **Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR).** *Oncogene* 2000, **19**(38):4319-4327.
95. Aoudjit F, Vuori K: **Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells.** *Oncogene* 2001, **20**(36):4995-5004.
96. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R *et al*: **Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo.** *Nat Med* 1999, **5**(6):662-668.
97. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M *et al*: **Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia.** *Nat Med* 2003, **9**(9):1158-1165.
98. Argraves WS, Pytela R, Suzuki S, Millan JL, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: **cDNA sequences from the alpha subunit of the fibronectin receptor predict a transmembrane domain and a short cytoplasmic peptide.** *J Biol Chem* 1986, **261**(28):12922-12924.
99. Argraves WS, Suzuki S, Arai H, Thompson K, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: **Amino acid sequence of the human fibronectin receptor.** *J Cell Biol* 1987, **105**(3):1183-1190.
100. Humphries JD, Askari JA, Zhang XP, Takada Y, Humphries MJ, Mould AP: **Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha5beta 1. II. Specificity of arg-gly-Asp binding is determined by Trp157 OF THE alpha subunit.** *J Biol Chem* 2000, **275**(27):20337-20345.
101. Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK: **Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin.** *J Histochem Cytochem* 1997, **45**(4):515-525.
102. Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S: **Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells.** *Nature* 1990, **345**(6272):250-253.
103. Trial J, Baughn RE, Wygant JN, McIntyre BW, Birdsall HH, Youker KA, Evans A, Entman ML, Rossen RD: **Fibronectin fragments modulate monocyte VLA-5 expression and monocyte migration.** *J Clin Invest* 1999, **104**(4):419-430.

104. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S: **Costimulation of proliferative responses of resting CD4⁺ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin.** *J Immunol* 1990, **145**(1):59-67.
105. Pierschbacher MD, Ruoslahti E: **Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**(19):5985-5988.
106. Akiyama SK, Yamada KM: **Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cell-binding domain of fibronectin.** *J Biol Chem* 1985, **260**(19):10402-10405.
107. Rahman S, Aitken A, Flynn G, Formstone C, Savidge GF: **Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of alphaIIb beta3 and alpha5 beta1 integrin complexes. Replacement of elegantin alanine-50 with proline, N-terminal to the RGD sequence, diminishes recognition of the alpha5 beta1 complex with restoration induced by Mn²⁺ cation.** *Biochem J* 1998, **335** (Pt 2):247-257.
108. Ruoslahti E: **RGD and other recognition sequences for integrins.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996, **12**:697-715.
109. Magnusson MK, Mosher DF: **Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, **18**(9):1363-1370.
110. Aota S, Nomizu M, Yamada KM: **The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function.** *J Biol Chem* 1994, **269**(40):24756-24761.
111. Mould AP, Askari JA, Aota S, Yamada KM, Irie A, Takada Y, Mardon HJ, Humphries MJ: **Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit.** *J Biol Chem* 1997, **272**(28):17283-17292.
112. Altroff H, van der Walle CF, Asselin J, Fairless R, Campbell ID, Mardon HJ: **The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain.** *J Biol Chem* 2001, **276**(42):38885-38892.
113. Suehiro K, Gailit J, Plow EF: **Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**(8):5360-5366.
114. Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwanaga S, Farrell DH, Ohtaki S: **Fibrinogen binds to integrin alpha(5)beta(1) via the carboxyl-terminal RGD site of the Aalpha-chain.** *J Biochem* 2000, **128**(4):705-710.
115. Delcommenne M, Streuli CH: **Control of integrin expression by extracellular matrix.** *J Biol Chem* 1995, **270**(45):26794-26801.
116. Cervella P, Silengo L, Pastore C, Altruda F: **Human beta 1-integrin gene expression is regulated by two promoter regions.** *J Biol Chem* 1993, **268**(7):5148-5155.

117. Nesti LJ, Caterson EJ, Wang M, Chang R, Chapovsky F, Hoek JB, Tuan RS: **TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts.** *J Orthop Res* 2002, **20**(5):1042-1049.
118. Rajagopal S, Huang S, Albitar M, Chakrabarty S: **Control of fibronectin receptor expression by fibronectin: antisense fibronectin RNA downmodulates the induction of fibronectin receptor by transforming growth factor beta1.** *J Cell Physiol* 1997, **170**(2):138-144.
119. Collo G, Pepper MS: **Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration in vitro.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 4):569-578.
120. Lefcort F, Venstrom K, McDonald JA, Reichardt LF: **Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve.** *Development* 1992, **116**(3):767-782.
121. Nesbit M, Schaidler H, Berking C, Shih DT, Hsu MY, McBrian M, Crombleholme TM, Elenitsas R, Buck C, Herlyn M: **Alpha5 and alpha2 integrin gene transfers mimic the PDGF-B-induced transformed phenotype of fibroblasts in human skin.** *Lab Invest* 2001, **81**(9):1263-1274.
122. Dalton SL, Marcantonio EE, Assoian RK: **Cell attachment controls fibronectin and alpha 5 beta 1 integrin levels in fibroblasts. Implications for anchorage-dependent and -independent growth.** *J Biol Chem* 1992, **267**(12):8186-8191.
123. Boles BK, Ritzenthaler J, Birkenmeier T, Roman J: **Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **278**(4):L703-712.
124. Lowin T, Straub RH, Neumann E, Bosserhoff A, Vogel C, Moissl C, Anders S, Muller-Ladner U, Schedel J: **Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3623-3632.
125. Han S, Rivera HN, Roman J: **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit alpha5 integrin gene transcription in non-small cell lung carcinoma cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, **32**(4):350-359.
126. Han S, Roman J: **COX-2 inhibitors suppress integrin alpha5 expression in human lung carcinoma cells through activation of Erk: involvement of Sp1 and AP-1 sites.** *Int J Cancer* 2005, **116**(4):536-546.
127. Hemler ME: **VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes.** *Annu Rev Immunol* 1990, **8**:365-400.
128. Hauzenberger D, Klominek J, Holgersson J, Bergstrom SE, Sundqvist KG: **Triggering of motile behavior in T lymphocytes via cross-linking of alpha 4 beta 1 and alpha L beta 2.** *J Immunol* 1997, **158**(1):76-84.
129. Woods ML, Cabanas C, Shimizu Y: **Activation-dependent changes in soluble fibronectin binding and expression of beta1 integrin activation epitopes in T cells: relationship to T cell adhesion and migration.** *Eur J Immunol* 2000, **30**(1):38-49.

130. Seminario MC, Sterbinsky SA, Bochner BS: **Beta 1 integrin-dependent binding of Jurkat cells to fibronectin is regulated by a serine-threonine phosphatase.** *J Leukoc Biol* 1998, **64**(6):753-758.
131. Stoolman LM, Wang TL, Situ R, Varani J: **Regulation of fibronectin and laminin binding activity in cultured human lymphoblastic cell lines.** *J Cell Physiol* 1993, **154**(3):593-600.
132. Pinto-Mariz F, Carvalho LR, de Mello W, Araujo Ade Q, Ribeiro MG, Cunha Mdo C, Voit T, Butler-Browne G, Silva-Barbosa SD, Savino W: **Differential integrin expression by T lymphocytes: potential role in DMD muscle damage.** *J Neuroimmunol*, **223**(1-2):128-130.
133. Iwata S, Ohashi Y, Kamiguchi K, Morimoto C: **Beta 1-integrin-mediated cell signaling in T lymphocytes.** *J Dermatol Sci* 2000, **23**(2):75-86.
134. Nojima Y, Tachibana K, Sato T, Schlossman SF, Morimoto C: **Focal adhesion kinase (pp125FAK) is tyrosine phosphorylated after engagement of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins on human T-lymphoblastic cells.** *Cell Immunol* 1995, **161**(1):8-13.
135. Nojima Y, Rothstein DM, Sugita K, Schlossman SF, Morimoto C: **Ligation of VLA-4 on T cells stimulates tyrosine phosphorylation of a 105-kD protein.** *J Exp Med* 1992, **175**(4):1045-1053.
136. Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C: **Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK.** *J Exp Med* 1995, **182**(4):1089-1099.
137. Ohashi Y, Iwata S, Kamiguchi K, Morimoto C: **Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte-type is a critical element in TCR- and beta 1 integrin-induced T lymphocyte migration.** *J Immunol* 1999, **163**(7):3727-3734.
138. Miyamoto YJ, Andruss BF, Mitchell JS, Billard MJ, McIntyre BW: **Diverse roles of integrins in human T lymphocyte biology.** *Immunol Res* 2003, **27**(1):71-84.
139. Davis LS, Oppenheimer-Marks N, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Lipsky PE: **Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules.** *J Immunol* 1990, **145**(3):785-793.
140. Maguire JE, Danahey KM, Burkly LC, van Seventer GA: **T cell receptor- and beta 1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in human T cells.** *J Exp Med* 1995, **182**(6):2079-2090.
141. Udagawa T, McIntyre BW: **A VLA-4 alpha-chain specific monoclonal antibody enhances CD3-induced IL-2/IL-2 receptor-dependent T-cell proliferation.** *Lymphokine Cytokine Res* 1992, **11**(5):193-199.
142. Stallmach A, Giese T, Pfister K, Wittig BM, Kunne S, Humphries M, Zeitz M, Meuer SC: **Activation of beta(1) integrins mediates proliferation and inhibits apoptosis of intestinal CD4-positive lymphocytes.** *Eur J Immunol* 2001, **31**(4):1228-1238.

143. Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y: **Activation signal transduction by beta1 integrin in T cells from patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(5):1559-1568.
144. Walle TK, Helve T, Virtanen I, Kurki P: **Increased expression of VLA-5 adhesion molecules on synovial fluid T lymphocytes in chronic polyarthritis: a consequence of T-cell activation.** *Scand J Immunol* 1994, **39**(2):189-194.
145. Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA: **Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway.** *J Biol Chem* 2004, **279**(31):33024-33034.
146. Holmstrom TH, Schmitz I, Soderstrom TS, Poukkula M, Johnson VL, Chow SC, Krammer PH, Eriksson JE: **MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly.** *EMBO J* 2000, **19**(20):5418-5428.
147. Su CC, Lin YP, Cheng YJ, Huang JY, Chuang WJ, Shan YS, Yang BC: **Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by integrin-tumor matrix interaction suppresses Fas-mediated apoptosis in T cells.** *J Immunol* 2007, **179**(7):4589-4597.
148. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR: **Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK.** *Nat Cell Biol* 2003, **5**(7):647-654.
149. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell* 1997, **91**(2):231-241.
150. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**(5392):1318-1321.
151. Wu LX, La Rose J, Chen L, Neale C, Mak T, Okkenhaug K, Wange R, Rottapel R: **CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway.** *J Immunol* 2005, **174**(1):180-194.
152. Lin YP, Su CC, Huang JY, Lin HC, Cheng YJ, Liu MF, Yang BC: **Aberrant integrin activation induces p38 MAPK phosphorylation resulting in suppressed Fas-mediated apoptosis in T cells: implications for rheumatoid arthritis.** *Mol Immunol* 2009, **46**(16):3328-3335.
153. Rich S, Van Nood N, Lee HM: **Role of alpha 5 beta 1 integrin in TGF-beta 1-costimulated CD8+ T cell growth and apoptosis.** *J Immunol* 1996, **157**(7):2916-2923.
154. Tahara H, Iwanami N, Tabata N, Matsumura H, Matsuura T, Kurita T, Miyazawa M: **Both T and non-T cells with proliferating potentials are effective in inducing suppression of allograft responses by alloantigen-specific intravenous presensitization combined with suboptimal doses of 15-deoxyspergualin.** *Transpl Immunol* 2004, **13**(1):25-32.

155. Loubaki L, Semlali A, Boisvert M, Jacques E, Plante S, Aoudjit F, Mourad W, Chakir J: **Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction.** *Mol Immunol*, 47(11-12):2112-2118.
156. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR: **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):12367-12371.
157. Wolf D, Hohmann JD, Wiedemann A, Bledzka K, Blankenbach H, Marchini T, Gutte K, Zeschky K, Bassler N, Hoppe N *et al*: **Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSRTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice.** *Circ Res*, 109(11):1269-1279.
158. Anderson DC, Rothlein R, Marlin SD, Krater SS, Smith CW: **Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions.** *Blood* 1990, 76(12):2613-2621.
159. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, Ley K, Sarembock IJ: **CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury.** *Am J Pathol* 2008, 172(4):1141-1152.
160. Ni H, Li A, Simonsen N, Wilkins JA: **Integrin activation by dithiothreitol or Mn²⁺ induces a ligand-occupied conformation and exposure of a novel NH₂-terminal regulatory site on the beta1 integrin chain.** *J Biol Chem* 1998, 273(14):7981-7987.
161. Pilling JE, Galvin A, Robins AM, Sewell HF, Mahida YR: **Expression of alpha5 (CD49e) and alpha6 (CD49f) integrin subunits on T cells in the circulation and the lamina propria of normal and inflammatory bowel disease colonic mucosa.** *Scand J Immunol* 1998, 48(4):425-428.
162. Tamura N, Kobayashi S, Kato K, Bando H, Haruta K, Oyanagi M, Kuriyama M, Kipps TJ, Hashimoto H: **Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis.** *J Rheumatol* 2001, 28(12):2583-2590.
163. Kato K, Santana-Sahagun E, Rassenti LZ, Weisman MH, Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H, Kipps TJ: **The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 1999, 104(7):947-955.
164. Scales TM, Parsons M: **Spatial and temporal regulation of integrin signalling during cell migration.** *Curr Opin Cell Biol*, 23(5):562-568.
165. Engedal N, Blomhoff HK: **Combined action of ERK and NF kappa B mediates the protective effect of phorbol ester on Fas-induced apoptosis in Jurkat cells.** *J Biol Chem* 2003, 278(13):10934-10941.
166. Hausler P, Papoff G, Eramo A, Reif K, Cantrell DA, Ruberti G: **Protection of CD95-mediated apoptosis by activation of phosphatidylinositide 3-kinase and protein kinase B.** *Eur J Immunol* 1998, 28(1):57-69.

167. Parsons MJ, Jones RG, Tsao MS, Odermatt B, Ohashi PS, Woodgett JR: **Expression of active protein kinase B in T cells perturbs both T and B cell homeostasis and promotes inflammation.** *J Immunol* 2001, **167**(1):42-48.
168. Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, Wingett DG: **Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells.** *Cell Immunol* 2006, **241**(1):47-58.
169. Zhang J, Bardos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: **Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis.** *J Immunol* 2001, **166**(8):4981-4986.
170. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ: **Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients.** *J Immunol* 1998, **161**(2):1018-1025.

