

Université de Montréal

**L'implication du CD154 résistant au clivage enzymatique dans  
l'activité anti-tumorale.**

Par

Suzanne SALTI

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

Décembre, 2015

© Suzanne SALTI, 2015

Université de Montréal

**L'implication du CD154 résistant au clivage enzymatique dans  
l'activité anti-tumorale.**

Par

Suzanne SALTI

A été évalué par un jury composé de :

Dr. Guy Delespesse, président-rapporteur.

Dr. Walid Mourad, directeur de recherche.

Dr Tony Abdel Massih, co-directeur.

Dr Jean François Gauchat, membre du jury.

## **Résumé :**

Le CD154, connu aussi sous le nom de CD40 ligand (CD40L) ou gp39, est une glycoprotéine transmembranaire de type II, de 33-39 KDa, appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF). Elle est exprimée d'une façon transitoire à la surface de différents types cellulaires telles que les lymphocytes T activés, les plaquettes activées, monocytes, cellules dendritiques, basophiles, éosinophiles et également sur des cellules non hématopoïétiques telles que les fibroblastes, cellules endothéliales vasculaires et cellules des muscles lisses. Le CD154 membranaire se trouve à la surface de ces cellules sous une forme trimérique. Cet homotrimère devient soluble suite à un clivage enzymatique par les métalloprotéinases (ADAM-10, ADAM-17).

Le CD40 est le récepteur principal de CD154, la liaison du CD154 avec le CD40 est à la base de l'interaction des lymphocytes T avec les lymphocytes B, primordiale à la prolifération, différenciation et commutation isotypique des immunoglobulines chez les lymphocytes B. Le CD154 interagit aussi avec trois autres récepteurs appartenant tous à la classe des intégrines : l'interaction du CD154 avec l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 au niveau des plaquettes, induit la stabilisation du thrombus plaquettaire, l'interaction du CD154 avec l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (sous forme inactive) au niveau des cellules phagocytaires, induit une production d'IL-8 par ces cellules et l'interaction du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 (sous forme active) induit une activation cellulaire, adhésion et une migration des cellules inflammatoires. Des études récentes de notre laboratoire ont révélé que l'interaction du CD154 avec ses quatre récepteurs induit une activation bidirectionnelle. Cependant, à notre grande surprise nous avons observé que le clivage du CD154 de la membrane cellulaire reste une propriété spécifique au CD40.

Le travail illustré dans ce mémoire, consiste à la génération des anticorps monoclonaux (mAbs) capables d'inhiber le clivage du CD154, ainsi que des protéines CD154 mutantes résistantes au clivage. Ceci nous a permis d'étudier le rôle biologique de l'inhibition du clivage du CD154 *in vitro* et l'évaluation de l'efficacité de nos mAbs bloquants dans un modèle de cancer *in vivo*. Nos résultats montrent que l'inhibition du clivage induit une régression des tumeurs (MC38) chez les souris C57BL/6 suite l'administration du mAb *in vivo*.

**Mots-clés :** CD154, CD40, mAb, cancer.

## **Abstract:**

CD154, also known as CD40 ligand (CD40L) or gp39, is a type II glycoprotein, belonging to the tumor necrosis factors (TNF) with a molecular weight of 33-39 KDa. The CD154 is expressed in a transitory way on different cell types such as activated T cells, activated platelets, monocytes, dendritic cells, basophils, eosinophils, and also on non-hematopoietic cells such as fibroblasts, vascular endothelial cells and smooth muscle cells. Like other members of the TNF superfamily, the CD154 forms a non-covalently linked homotrimer. This trimer becomes soluble after a proteolytic cleavage, requiring the implication of the metalloproteinases ADAM-10 and ADAM-17.

The binding of the CD154 with its classical receptor, CD40, is the basis of the T-B cell interaction and it is crucial for B proliferation, differentiation and isotype switching. In addition to CD40, CD154 was shown to bind to three additional receptors, belonging to the integrin family,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and  $\alpha$ M $\beta$ 2. Binding of CD154 to the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 plays an important role in platelet thrombus stabilization. The interaction with the inactive form of the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 leads to the activation of MAPK/ERK1/2 and IL-8 production. The active form of the  $\alpha$ M $\beta$ 2 interacts with the CD154 and induces cellular activation, adhesion and migration of inflammatory cells. Recent studies of our laboratory have revealed that the interaction of CD154 with its different receptors induces bidirectional activation. However, its cleavage remains a property to CD40.

The presented work shows the generation of monoclonal antibody (mAb) capable of inhibiting the cleavage of the CD154 as well as the generation of CD154 mutant protein resistant to cleavage. This will allow us to study the biological role of the inhibition of the CD154 cleavage in vitro and evaluate the efficiency of our blocking mAbs in a cancer model in vivo. Our results show that inhibition of cleavage induced tumor regression in C57BL/6 mice, following the administration of the mAb in vivo.

**Keywords:** CD154, CD40, mAbs, cancer.

# **Table des matières :**

<b><u>Résumé :</u></b> .....	i
<b><u>Liste des tableaux :</u></b> .....	v
<b><u>Liste des figures :</u></b> .....	vi
<b><u>Liste des abréviations :</u></b> .....	vii
<b>Dédicace:</b> .....	ix
<b>Remerciements</b> .....	x
<b><u>Chapitre 1: Introduction.</u></b> .....	1
1.1. <b><u>Structure du CD154 et de ses différents récepteurs :</u></b> .....	3
1.1.1. Le CD154 :.....	3
1.1.2. Les récepteurs du CD154.....	5
1.1.2.1. Le CD40.....	5
1.1.2.2. Les Intégrines.....	8
1.1.2.2.1. L'intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3.....	10
1.1.2.2.2. L'intégrine $\alpha$ 5 $\beta$ 1.....	11
1.1.2.2.3. L'intégrine $\alpha$ M $\beta$ 2.....	11
1.2. <b><u>Rôle biologique de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs :</u></b> .....	12
1.2.1. Interaction du CD154 avec le CD40.....	12
1.2.2. Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3.....	17
1.2.3. Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1.....	18
1.2.4. Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2.....	19
1.3. <b><u>Le rôle anti-tumoral de l'interaction du CD154 avec le CD40.</u></b> .....	20
<b><u>Chapitre 2: Rationnel et Hypothèse.</u></b> .....	23

<b><u>Chapitre 3: Matériels et Méthodes.</u></b> .....	25
3.1. <u>Les lignées cellulaires :</u> .....	26
3.2. <u>Anticorps et Réactifs :</u> .....	26
3.3. <u>Production des anticorps monoclonaux dirigé contre le hCD154 :</u> .....	27
3.4. <u>Mutagenèse dirigée et transfections :</u> .....	28
3.4.1. <u>Mutagenèse dirigée:</u> .....	28
3.4.2. <u>Transfection des cellules par la méthode Calcium Phosphate:</u> .....	29
3.5. <u>Cytométrie en flux et tri cellulaire :</u> .....	30
3.6. <u>Quantification du sCD154:</u> .....	31
3.7. <u>Le traitement <i>in-Vivo</i>:</u> .....	32
<b><u>Chapitre 4: Résultats.</u></b> .....	33
4.1. <u>Les anticorps monoclonaux :</u> .....	34
4.2. <u>Inhibition de la liaison du CD154 avec ses récepteurs par les mAbs.</u> .....	34
4.3. <u>Définir la spécificité des mAbs pour le site du clivage :</u> .....	35
4.4. <u>Les mutants générés sont résistants au clivage:</u> .....	36
4.5. <u>Le Clone 8 reconnaît le CD154 de souris :</u> .....	37
4.6. <u>Inhibition du clivage par le Clone 8 :</u> .....	37
4.7. <u>Étudier l'activité anti-tumorale du Clone 8:</u> .....	38
<b><u>Chapitre 5: Discussion.</u></b> .....	53
<b><u>Chapitre 6: Conclusion et Perspectives.</u></b> .....	60
<b>Bibliographie:</b> .....	63

## **Liste des tableaux :**

### **Chapitre 3: Matériels et Méthodes.**

<b>Tableau 1:</b> Les différents primers.....	29
-----------------------------------------------	----

### **Chapitre 4: Résultats.**

<b>Tableau 2:</b> Caractérisation des différents mAbs nouvellement générés.....	39
---------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tableau 3:</b> Liaison du CD154 avec ses différents récepteurs en présence des différents mAbs.....	40
--------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tableau 4:</b> Caractérisation des différents mAbs dirigés contre le hCD154.....	41
-------------------------------------------------------------------------------------	----

## **Liste des figures :**

### **Chapitre 1 : Introduction**

<b>Figure 1 :</b> La structure du gène du hCD154.....	3
<b>Figure 2 :</b> La structure du gène et de la protéine du hCD40.....	6
<b>Figure 3 :</b> Les différentes familles des intégrines.....	9
<b>Figure 4 :</b> Formes activée et inactivée des intégrines.....	9
<b>Figure 5 :</b> Les fonctions de l'interaction du CD154 avec le CD40.....	14
<b>Figure 6 :</b> Activité bidirectionnelle de l'interaction du CD154 avec le CD40.....	16
<b>Figure 7:</b> L'interaction du CD154 avec le $\alpha$ Ib $\beta$ 3.....	17
<b>Figure 8:</b> Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1.....	18
<b>Figure 9:</b> Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1).....	19

### **Chapitre 4: Résultats.**

<b>Figure 10:</b> La reconnaissance du CD154 par les différents mAbs nouvellement générés.....	42
<b>Figure 11 :</b> Les différents mutants du hCD154.....	43
<b>Figure 12 :</b> Niveau d'expression du hCD154 à la surface des HEK 293 triées.....	44
<b>Figure 13 :</b> Les mAbs perdent la capacité de reconnaître le hCD154 dépendamment de la mutation son niveau.....	45
<b>Figure 14 :</b> Concentration du sCD154.....	46
<b>Figure 15 :</b> Le CD40 lie les différents mutants du hCD154.....	47
<b>Figure 16 :</b> Homologie entre le hCD154 et le mCD154.....	48
<b>Figure 17 :</b> Le clone 8, un mAb dirigé contre le hCD154, reconnaît le mCD154.....	49
<b>Figure 18 :</b> Inhibition du clivage.....	50
<b>Figure 19 :</b> Le Clone 4 (C4) et le Clone8 (C8) ne compétitionnent pas avec le 5C8.....	51
<b>Figure 20 :</b> Modèle animal.....	52



## **Liste des abréviations :**

**a.a:** acides aminés.

**AR:** arthrite rhumatoïde.

**CD154 WT:** CD154 wild-type.

**CD40L :** CD40 ligand.

**CMH-II :** complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

**CPA :** cellules présentatrices d'antigène.

**D117 :** acide aspartique.

**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium.

**FBS:** Fetal Bovine Serum.

**GAM:** Goat Anti Mouse.

**GAH:** Goat Anti hamster.

**GM-CSF:** granulocyte-monocyte colony stimulating factor.

**hCD154:** CD154 humain.

**hCD40:** CD40 humain.

**HEK 293:** Human Embryonic Kidney.

**hIgG:** IgG humaine.

**ICAM-1:** molécules d'adhésion intracellulaire 1.

**Ig:** immunoglobuline.

**IL-1 :** interleukine 1.

**IL-12 :** interleukine 12.

**IL-3 :** interleukine 3.

**IL-6:** interleukine 6.

**IL-8 :** interleukine 8.

**INF $\gamma$ :** l'interféron  $\gamma$ .

**Jak3:** Janus kinase 3.

**KGD:** Lysine-glycine-acide aspartique.

**HAT:** Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine.

**LED :** lupus érythémateux disséminé.

**mAb:** anticorps monoclonaux.

**mCD154**: CD154 murin.

**mCD40**: CD40 murin.

**MEC** : matrice extracellulaire.

**mIgG** : IgG de souris.

**MIP-1 $\alpha$** : macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ .

**N151** : Asparagine 151.

**NK**: Natural killer.

**PEG** : polyéthylène glycol.

**PSG** : Pénicilline, Streptomycine et L-Glutamine.

**PTK**: protéine tyrosine kinase.

**Q166** : Glutamine 166.

**R203** : Arginine 203.

**RGD** : arginine- glycine-acide aspartique.

**sCD154**: soluble CD154.

**SP**: sclérose en plaque.

**Sub<sup>110</sup>SFEMQKG<sup>116</sup>** : substitution des résidus<sup>110</sup>SFEMQKG<sup>116</sup> par 7 Alanines.

**Sub<sup>111</sup>FEMQ<sup>114</sup>** : substitution des résidus <sup>111</sup>FEMQ<sup>114</sup> par 4 Alanines.

**Sub<sup>112</sup>EM<sup>113</sup>** : substitution des résidus<sup>112</sup>EM<sup>113</sup> par 2 Cystéines.

**TBAM**: T-B activating molecule.

**TCR** : récepteur des lymphocytes T.

**TNF**: tumour necrosis factor.

**TNFRs**: TNF receptor superfamily.

**TRAP**: TNF-related activation protein.

**VCAM-1** : molécules d'adhésion vasculaire 1.

**Y154**: Tyrosine 145.

$\Delta^{110}$ SFEMQKG<sup>116</sup> : délétion des résidus <sup>110</sup>SFEMQKG<sup>116</sup>.

$\Delta^{111}$ FEMQ<sup>114</sup> : délétion des résidus <sup>111</sup>FEMQ<sup>114</sup>.

*Je dédie ce mémoire à ceux qui m'ont dédié toute leur vie :  
Mes chers et respectueux parents,*

***Abdul Gattar & Khaldiyeh.***

*A ma sœur d'amour :*

***Souhair.***

*À mon petit Bébé :*

***Saly.***

*Ainsi qu'à mon beau-frère :*

***Khaled.***

## **Remerciements**

*Je voudrais tout particulièrement adresser mes profonds remerciements à mon directeur de recherche, Dr Walid Mourad, Ph.D, qui a cru en moi et qui m'a accueilli au sein de son équipe. Grand merci pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer, pour sa patience et pour ses conseils qui m'étaient nécessaires et qui ont contribué à alimenter ma réflexion pour la réussite de ce travail. Sans sa rigueur, son exigence et sa motivation persévérante, je ne serais pas la personne scientifique dont je suis actuellement. Dr Walid, veuillez trouver l'expression de mon profond respect et de ma haute considération.*

*Mes sincères remerciements s'adressent aussi à mon co-directeur, Tony Abdel Massih, université Saint Joseph, Liban, ainsi qu'à tous les membres du jury. Merci d'avoir accepté d'en faire part.*

*Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent au membre du laboratoire. Merci pour vos encouragements et pour l'ambiance magnifique et extrêmement agréable qu'on partage au laboratoire. Vous étiez toujours là pour me soutenir et me pousser dans mes moments les plus difficiles. Ce projet fut un succès, en grande partie, grâce à vous et spécifiquement à toi Youssef Darif. J'adresse aussi mes remerciements au Dr John Stagg et à Bertrand Allard pour leur implication dans le modèle in-vivo.*

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude à mes chers parents, Abdul Sattar et Khaldieh. Vraiment aucun remerciement ne saurait exprimer mon attachement, mon amour et mon affection. Ce modeste travail n'est qu'un petit témoignage pour tous vos sacrifices et l'immense soutien tout au long de ces 25ans. Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes sœurs, Souhair et Saly qui m'ont apporté leur support moral et leur présence tout au long de ces deux ans malgré la distance qui nous sépare. Chère famille que dieu vous garde et vous procure santé et bonheur.*

*Mes sincères remerciements s'adresse aussi à mes amis, à Ahmad et à sa famille qui de près comme de loin m'ont aidé à la réalisation de ce mémoire et encouragé aux moments opportuns.*

*Enfin, je tiens à remercier, du fond du cœur, l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire.*

Merci à vous tous !!!!!

Thank You!

# ***Chapitre 1: Introduction.***

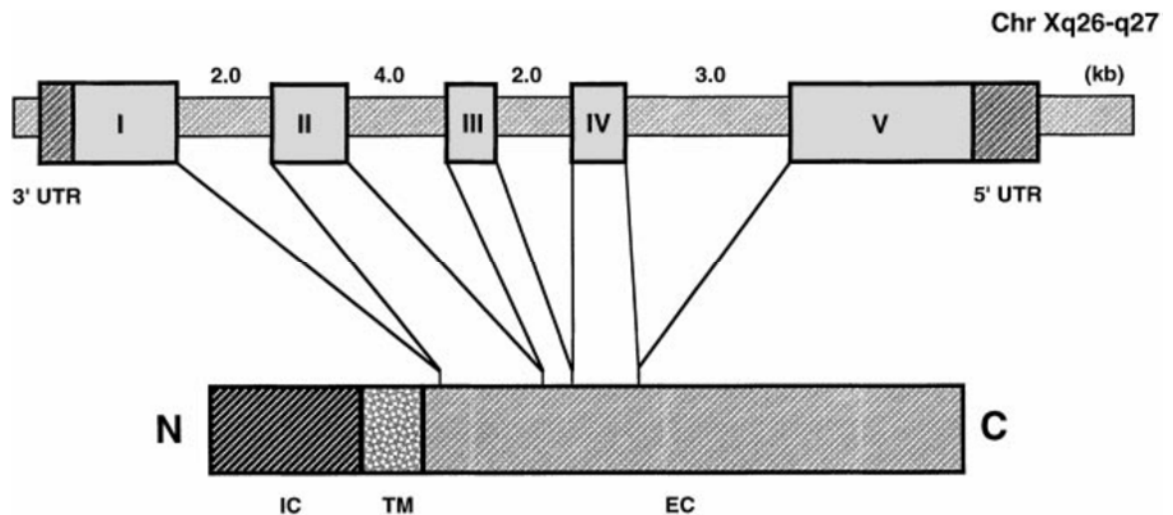
Nous vivons dans un monde rempli d'agents infectieux et microbiens, le corps doit leur faire face pour pouvoir y échapper. En effet, ceci est assuré par le système immunitaire. Ce système est constitué de plusieurs types cellulaires, de différentes substances ainsi que de différents organes. Pour lutter contre un corps étranger, ces derniers vont entrer en action dès la détection du signal de danger. La première ligne de défense se fait rapidement et d'une façon non spécifique, c'est l'immunité innée ou l'immunité naturelle. Une deuxième ligne de défense, l'immunité adaptative, est plus spécifique et génère des cellules effectrices agissant contre un signal étranger. Cette dernière repose sur une immunité à médiation cellulaire, faisant intervenir principalement les cellules T ; et une immunité à médiation humorale, faisant intervenir les cellules B. Or, pour qu'elles puissent intervenir ces cellules doivent subir une activation. Cette activation nécessite deux signaux, le premier consiste en l'interaction entre le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et le récepteur des lymphocytes T (TCR) ; le second étant un signal de costimulation initialisé par une interaction entre le CD28 des cellules T et le B7.1 des CPA. Suite à l'engagement du TCR, l'expression d'autres molécules de costimulation va avoir lieu. Parmi elles on trouve le CD154 qui va s'exprimer à la surface des cellules T et va pouvoir interagir avec ses récepteurs exprimés d'une façon constitutive à la surface des CPA. L'interaction du CD154 avec ses récepteurs est d'une grande importance puisqu'elle est impliquée dans différentes maladies infectieuses, auto-immunes, cardiaques et même dans le cancer.

## 1.1. Structure du CD154 et de ses différents récepteurs :

### 1.1.1. Le CD154 :

Le CD154, préalablement connu sous le nom de CD40 ligand (CD40L), glycoprotéine 39 (Gp39), *TNF-related activation protein* (TRAP) ou *T-B activating molecule* (TBAM), a été découvert en 1992 [1-4]. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type II, possédant donc un domaine carboxyle extracellulaire, appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) [5].

Le CD154 humain (hCD154) est formé de 261 acides aminés (a.a) dont 21 forment sa partie cytoplasmique, 24 sa partie transmembranaire et les 215 a.a restant composent sa partie extracellulaire. Alors que le CD154 murin (mCD154) est constitué de 260 a.a dont 22 cytoplasmiques, 24 transmembranaires et 214 extracellulaires. Il existe 80% d'homologie entre le hCD154 et le mCD154 [6]. Le CD154 possède un poids moléculaire de 33-39 KDa, ayant deux sites de glycosylation, et son gène codant, divisé en cinq exons et quatre introns, est situé sur le chromosome X au niveau de la région q26.3 et q27.1 [6, 7].



**Figure 1 : La structure du gène du hCD154.**

Le gène codant pour le CD154 humain est localisé sur le chromosome X, et composé de 5 exons et 4 introns. (VanKooten, Jan 2000) [6].

Outre sa forme membranaire, le CD154 existe sous une forme soluble (sCD154) ayant une activité biologique et une capacité d'interagir avec son récepteur principal, le CD40 [8]. Cette forme soluble peut provenir aussi bien d'un relargage intracellulaire que d'un clivage membranaire. En effet, le sCD154 est le résultat d'un clivage enzymatique par les métallo-protéinases entre l'acide glutamique 112 (E112) et la Méthionine 113 (M113) générant ainsi un fragment de 18 KDa [9]. Même si le phénomène reste mal connu, des études ont montré que cette forme soluble peut aussi être relarguée du milieu intracellulaire sans qu'elle soit exprimée à la surface des cellules [10].

Récemment, notre équipe a démontré que le clivage du CD154 membranaire se faisait suite à sa liaison avec le CD40 et spécifiquement par l'intervention d'ADAM-10 et ADAM-17 [9]. De plus, les études ont démontré que la forme soluble peut interagir avec le CD40 des cellules B, induisant ainsi leur prolifération, leur activation, la production des centres germinatifs et même une bonne commutation isotypique [10, 11].

Comme tous les membres de la famille des TNF, le CD154 aussi bien soluble que membranaire, forme un homotrimer, où les trois molécules sont reliées entre elles par des liaisons non covalentes [12]. Cette trimérisation est primordiale pour son activité biologique, et elle est médiée par 2 Tyrosines, 2 Histidines et une Leucine. Le CD154 possède en plus un *TNF Homology Domain* qui va lui permettre de se lier au CD40 [12].

Lors de sa découverte, on a pensé que le CD154 s'exprimait uniquement et d'une façon transitoire à la surface des cellules T activées [1, 4]. Cependant, des études plus récentes ont clairement démontré que cette protéine est aussi exprimée à la surface d'autres cellules hématopoïétiques telles que les monocytes, les macrophages, les basophiles et les cellules dendritiques, ainsi qu'à la surface des cellules non hématopoïétiques comme les plaquettes activées, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [13, 14].



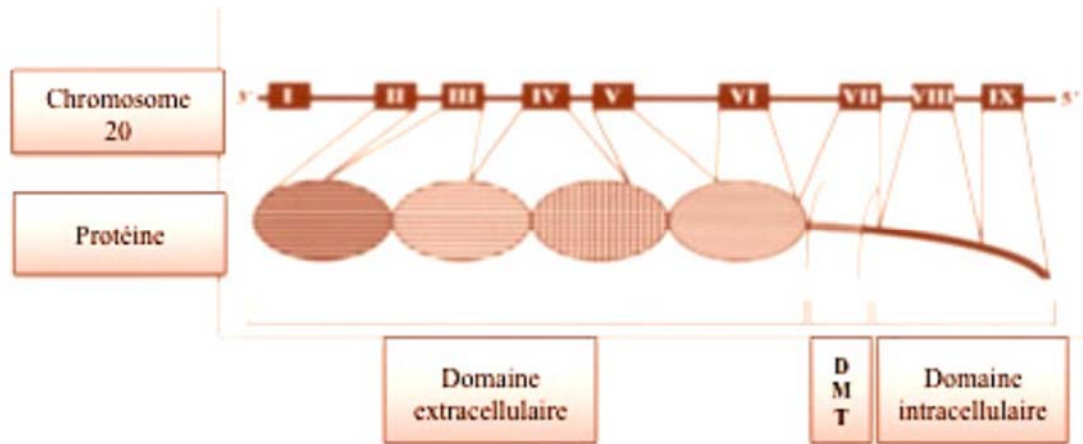
## **1.1.2. Les récepteurs du CD154.**

Depuis la découverte du CD154, le CD40 était considéré comme étant son seul récepteur [1]. Cependant de nouvelles études ont montré l'existence de trois nouveaux récepteurs :  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 [13],  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 [15], et  $\alpha$ M $\beta$ 2 [16], appartenant à la famille des intégrines.

### **1.1.2.1. Le CD40.**

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de 45-50 KDa, appartenant à la famille des récepteurs des TNF (TNFRs) [5]. Le CD40 humain (hCD40) est codé par un gène localisé au niveau du chromosome 20 entre la région q12 et q13.2. Ce dernier est formé de 9 exons et 8 introns. Il est constitué de 277 a.a, dont 62 constituent la partie cytoplasmique, 22 la partie transmembranaire et 193 la partie extracellulaire. Comme tous les membres de la famille des TNFRs, le domaine extracellulaire du hCD40 est riche en cystéines, capables de former des ponts disulfures permettant ainsi un repliement de la molécule [17].

Le CD40 murin (mCD40) est codé par un gène localisé au niveau du chromosome 2, et composé de 305 a.a avec 193 a.a extracellulaires, 22 a.a transmembranaires et 90 a.a intracellulaires. Il existe une homologie de 62% avec le hCD40, les 22 cystéines extracellulaires nécessaires pour le repliement de la molécule sont conservées [6].



**Figure 2 : La structure du gène et de la protéine du hCD40.**

Le gène codant pour le CD40 humain est localisé sur le chromosome 20. Le hCD40 est constitué de 9 exons. Les exons 2, 3, 4, 5 et 6 constituent le domaine extracellulaire ; l'exon 7 le domaine transmembranaire et les exons 8 et 9 constituent le domaine intracellulaire. (U. Schonbeck, et al. 2001) [14].

En 1989, *Braesh-Andersen et al* ont démontré lors de leur étude biochimique qu'une partie (1-3%) du CD40 exprimé à la surface de certaines cellules tumorales et certaines cellules transformées à l'EBV, peut exister sous forme dimérique [18]. Ce dimère semble être médié par un pont disulfure, cependant, le rôle biologique de ce dernier n'a été étudié que récemment. Quelques années plus tard, *Baker et al* ont démontré que la formation du dimère est la conséquence d'une activation cellulaire [19]. Afin de comprendre la nature et le rôle biologique de ce dimère, notre équipe a généré des cellules transfectées avec différents mutants du CD40. Nous avons démontré qu'un faible pourcentage (2-3%) du CD40 membranaire est exprimé à la surface des cellules sous forme dimérique [20]. L'engagement du CD40 avec des anticorps jumelés à un anticorps secondaire ou avec le CD154 trimérique, augmentait significativement la dimérisation du CD40 à la surface des cellules. Cette dernière est dépendante de l'intégrité des radeaux lipidiques et médiée par la cystéine 238 de la partie cytoplasmique. Cette dimérisation est nécessaire pour certaines voies de signalisation impliquées dans la réponse biologique (voir plus bas) [21, 22].

Le CD40 est exprimé à la surface de divers types cellulaires, qu'elles soient hématopoïétique ou pas, tels que les lymphocytes B, les monocytes, les plaquettes, les basophiles, les cellules endothéliales et les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules du muscle lisse vasculaire [23]. De plus, différentes cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1), IL-3, l'interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), le TNF- $\alpha$  et le facteur de stimulation des colonies granulo-monocytaires (GM-CSF) ont démontré leur capacité à induire l'expression du CD40 à la surface de nombreux types cellulaires [24].

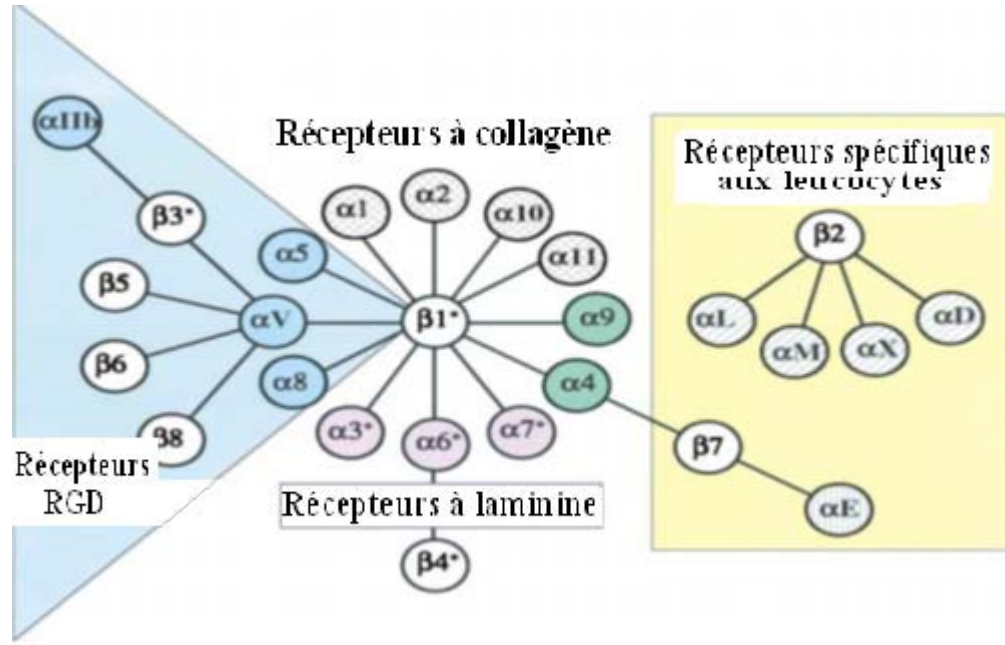
Le domaine intracellulaire du CD40 ne possède pas d'activité enzymatique et n'est pas lié à une kinase/phosphatase [25]. C'est pourquoi pour induire un signal il doit se lier à des protéines intracellulaires telles que les molécules adaptatrices, *TNFR associated factors* (TRAFs) ou la protéine tyrosine kinase (PTK) ou le *Janus kinase3* (Jak3) activant ainsi plusieurs cascades de signalisation comme celles du NF- $\kappa$ B, PI-3K, JNK, et des MAPKs. En effet, plusieurs membres de la famille des TRAFs (TRAF-2, 3 et 6) vont s'associer à la queue cytoplasmique du CD40 via des résidus spécifiques. Cette association joue un rôle important dans l'activation, la survie, la prolifération, et même dans l'apoptose dans certains cas tels que les tumeurs [26].

Suite aux études de liaison et la génération des mutants du CD154, *Bajorath et al* ont démontré que le CD154 peut interagir avec le CD40 via les résidus Tyrosine 145 (Y154) et Arginine 203 (R203) du CD154 [27, 28]. Ces observations ont été confirmées récemment par une étude de la cristallographie de l'interaction CD154/CD40 [29].

### **1.1.2.2. Les Intégrines.**

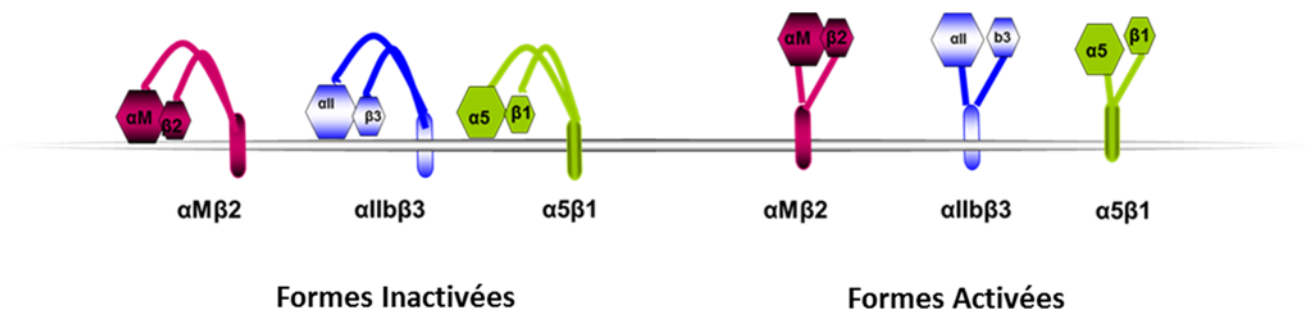
Certaines cellules de l'organisme humain possèdent la capacité d'adhérence et le passage rapide de l'état circulant à l'état adhérent, tel que les cellules phagocytaires et les plaquettes. Ce phénomène se fait grâce aux récepteurs d'adhérence nommés les intégrines qui sont des glycoprotéines transmembranaires contribuant à l'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC). Il existe 24 intégrines chez les mammifères, chacune d'elles possède un rôle spécifique. Elles sont constituées de 2 sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , associées de façon non covalente. A ce jour, 8 sous-unités  $\beta$  et 18 sous-unités  $\alpha$  ont été catégorisées (voir figure 3) [30]. Ces molécules possèdent un mécanisme de contrôle qui leur permet d'être dans une conformation active ou inactive. Ce mécanisme dépend d'une part de la configuration du site de liaison au ligand, et d'autre part des informations provenant du cytoplasme. Dans son état inactif, l'intégrine est repliée sur elle-même et forme un coude, le site de liaison au ligand devient inaccessible, l'activation se fait sur deux étapes : 1- le priming où l'intégrine acquiert la faculté de se lier au ligand c'est-à-dire le moment où le domaine de liaison est exposé et 2- l'activation proprement dite où l'intégrine est liée à son ligand (voir figure 4).

Richard O. Hynes a défini les intégrines comme étant des récepteurs d'adhésion transmembranaires qui lient les molécules de la MEC, tel que le collagène, la laminine, la fibronectine; ainsi que les microfilaments d'actine, un des constituants intracellulaires. 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) (voir figure 3) [30].



**Figure 3 : Les différentes familles des intégrines.**

Cette figure montre les 24 différentes associations possibles entre les 18 sous unités  $\alpha$  et les 8 sous unités  $\beta$ , constituant ainsi 24 différentes intégrines. Ces intégrines sont classées en 4 familles différentes dépendamment de la nature de leurs récepteurs. (Modifiée de R.O. Hynes, 2002) [30].



**Figure 4 : Formes activée et inactivée des intégrines.**

Modèle des changements conformationnels subis par les intégrines lors de liaison à un ligand extracellulaire.

Ces intégrines assurent un transfert bidirectionnel d'information jouant un rôle important dans l'adhésion cellule-cellule ainsi que dans la transduction du signal vers le cytosquelette activant ainsi différentes voies de signalisations intracellulaires. En effet, une signalisation *inside-out* va permettre le passage du message intracellulaire activant ainsi l'intégrine, et une signalisation *outside-in* va transmettre le message de prolifération ou de survie en fonction du ligand de la MEC [31]. Elles jouent un rôle important dans la thrombose, la réponse immunitaire, l'hémostase, la migration cellulaire ainsi que dans le développement du cancer [32].

### **1.1.2.2.1. L'intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3.**

L' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 aussi connue sous le nom de GPIIb/IIIa ou CD41/CD61, est une glycoprotéine exprimée exclusivement à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes [30, 33]. Une fois activée, elle se lie à la fibronectine, fibrinogène, la vitronectine ainsi qu'au facteur de von Willebrand permettant l'agrégation et l'adhérence des plaquettes au niveau de la lumière du vaisseau sanguin [30]. Ainsi l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 joue un rôle important dans l'hémostase. Effectivement, en 1997, *Kato et al* ont démontré que les hémorragies et les problèmes d'hémostase observés chez les patients souffrant de *Glanzman thrombostenia* sont dus à des mutations au niveau des gènes codants pour l' $\alpha$ IIb ou pour le  $\beta$ 3 [34].

En 2002, cette intégrine a été identifiée comme un récepteur pour le CD154 par André et ses collègues [13]. Ce même groupe a démontré que le CD154 est capable de lier la forme active et inactive de l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Cette interaction se fait via les résidus KGD (lysine-glycine-acide aspartique) du CD154 chez l'humain et le RGD (arginine-glycine-acide aspartique) chez la souris [13]. En effet, *El Fakhry et al* ont démontré que la liaison du CD154 à l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 est principalement basée sur le résidu D117 (acide aspartique) du CD154 et qu'une mutation à ce niveau diminue considérablement sa capacité à lier l'intégrine [35].

### **1.1.2.2.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .**

L' $\alpha 5\beta 1$  est une intégrine exprimée à la surface de différents types cellulaires tels que les cellules B, les cellules T, les monocytes, les plaquettes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Comme l' $\alpha \text{IIb}\beta 3$ , elle lie naturellement la fibronectine et la vitronectine au niveau de leurs séquences tripeptidiques RGD [30]. Cette intégrine joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire, la prolifération cellulaire ainsi que dans la survie de différents types cellulaires.

En 2007, *Léveillé et al* ont démontré que le CD154 était capable de se lier à des monocytes  $\text{CD40}^+/\alpha \text{IIb}\beta 3^+$ , et que cette liaison se faisait via l' $\alpha 5\beta 1$  [15]. Le CD154, contrairement aux ligands naturels de l' $\alpha 5\beta 1$ , lie la forme inactive de l' $\alpha 5\beta 1$ . En effet, il a été démontré que cette liaison est perdue suite à l'activation de cette intégrine par le  $\text{Mn}^{2+}$  ou par le dithiothréitol. Cette interaction est dépendante des résidus Asparagine 151 (N151) et Glutamine 166 (Q166) du CD154 [36]. De plus, *Léveillé et al* ont aussi démontré que le CD154 lie l' $\alpha 5\beta 1$  indépendamment des résidus impliqués dans l'interaction du CD154 avec le CD40. D'où leur conclusion que le CD154 peut interagir simultanément avec le CD40 ainsi qu'avec l' $\alpha 5\beta 1$ .

### **1.1.2.2.3. L'intégrine $\alpha \text{M}\beta 2$ .**

L' $\alpha \text{M}\beta 2$  aussi nommée Mac-1 ou CD11b/CD18, est une intégrine appartenant à la famille des intégrines  $\beta 2$ . C'est une intégrine leucocytaire exprimée abondamment à la surface des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des neutrophiles. Cette intégrine comme les autres, lie naturellement le fibrinogène [37] et la vitronectine [38] et lie également le C3bi [39], les molécules d'adhésions telles qu'ICAM-1 [40] et l'héparine. Sa fonction principale est l'adhésion et la transmigration des leucocytes vers le site inflammatoire [41].

En 2007, *Zirlik et al* ont démontré que l' $\alpha$ M $\beta$ 2 était elle aussi capable d'interagir avec le CD154 [16]. Comme ses ligands naturels, le CD154, se lie uniquement à la forme active de l' $\alpha$ M $\beta$ 2. Cette liaison se fait via la séquence EQLKKSKTL du domaine-I de l' $\alpha$ M $\beta$ 2 [41]. Des études récentes de notre laboratoire ont démontré que le CD154 interagit avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 via les même résidus qui sont impliqués dans son interaction avec le CD40 (Y145 et R203) [36]. Il est donc fort possible que le CD154 puisse interagir simultanément avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 et l' $\alpha$ Ib $\beta$ 3 ou l' $\alpha$ M $\beta$ 2 et l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1.

## **1.2. Rôle biologique de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs :**

### **1.2.1. Interaction du CD154 avec le CD40.**

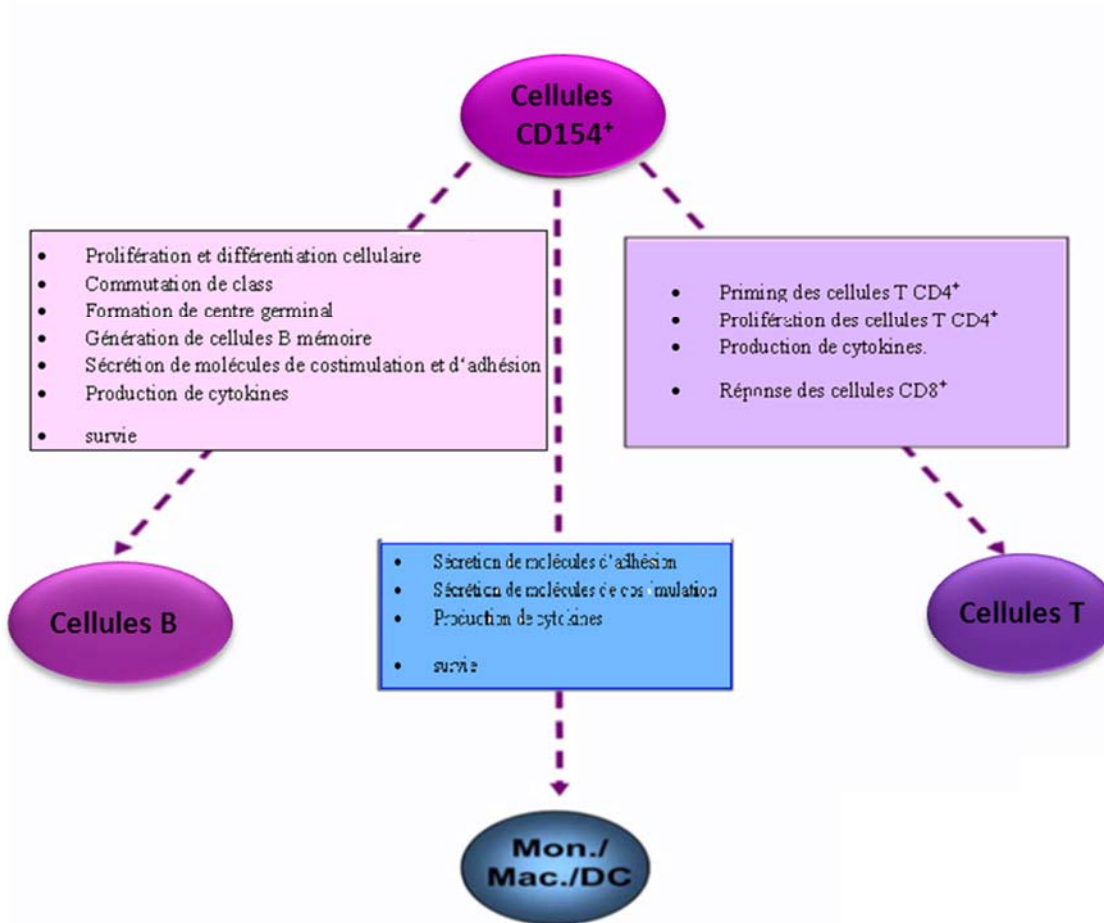
L'importance de l'interaction du CD154 avec le CD40 a été déterminée suite à l'identification de la cause du syndrome de l'hyper IgM lié au chromosome X. Les manifestations cliniques de ce dernier sont des infections répétitives dues à une incapacité à produire des anticorps capables d'initier une bonne réponse immunitaire humorale permettant le contrôle des infections, malgré que les patients ont un niveau relativement normal d'IgM, d'IgD et de lymphocytes B et T [42]. Différentes mutations ont été caractérisées soit au niveau du gène codant pour le CD154 soit au niveau de celui codant pour le CD40 [43]. La résultante de ces mutations est un empêchement de la liaison ou une diminution d'affinité entre le CD154 et le CD40, rendant ainsi les lymphocytes B incapables d'effectuer une commutation de classe. C'est pourquoi, chez ces patients on observe des niveaux élevés d'IgM comparés à ceux des IgG, IgE et IgA. [44].

En effet, l'interaction du CD154 avec le CD40 est fortement impliquée dans la réponse immunitaire humorale, elle induit la prolifération des cellules B, la production des immunoglobulines (Ig) et la commutation de classe, la survie des cellules B, la



formation des centres germinatifs et la génération de cellules B mémoires [45]. Cette interaction joue aussi un rôle dans les réponses adaptatives incluant l'expansion de cellules T spécifiques à l'antigène ainsi que l'activation des cellules présentatrices en stimulant l'expression des molécules costimulatrices et adhésives telles que l'IL-8, *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ), TNF- $\alpha$  (voir figure 5)[23].

Vu l'expression du CD40 à la surface des cellules non hématopoïétiques, l'interaction du CD154 avec le CD40 contribue aussi à la réponse biologique à ce niveau. En effet, l'engagement du CD40 exprimé à la surface des cellules endothéliales va induire le recrutement des monocytes, des macrophages et des lymphocytes T au niveau du site inflammatoire. Ce recrutement est favorisé par la sécrétion d'IL-1, IL-6, IL-8, par la surexpression d'ICAM-1 (molécules d'adhésion intracellulaire1) et VCAM-1 (molécules d'adhésion vasculaire 1). L'activation du CD40 endothélial va déclencher la sécrétion de différents facteurs contribuant à l'angiogenèse. De plus, l'engagement du CD40 à la surface des cellules musculaires lisses, va induire la sécrétion de différentes cytokines, chimiokines et métalloprotéinases (MMP1, 2, 3 et 9) (voir figure 5) [33].



**Figure 5 : Les fonctions de l'interaction du CD154 avec le CD40.**

Cette figure montre l'importance de l'interaction du CD154 avec le CD40. En effet, cette interaction possède différentes fonctions impliquant non seulement des cellules B mais aussi des monocytes (Mon), des macrophages (Mac), des cellules dendritiques (DC) ainsi que des cellules T. (Modifiée de G.S.Hassan et al, 2009) [23].

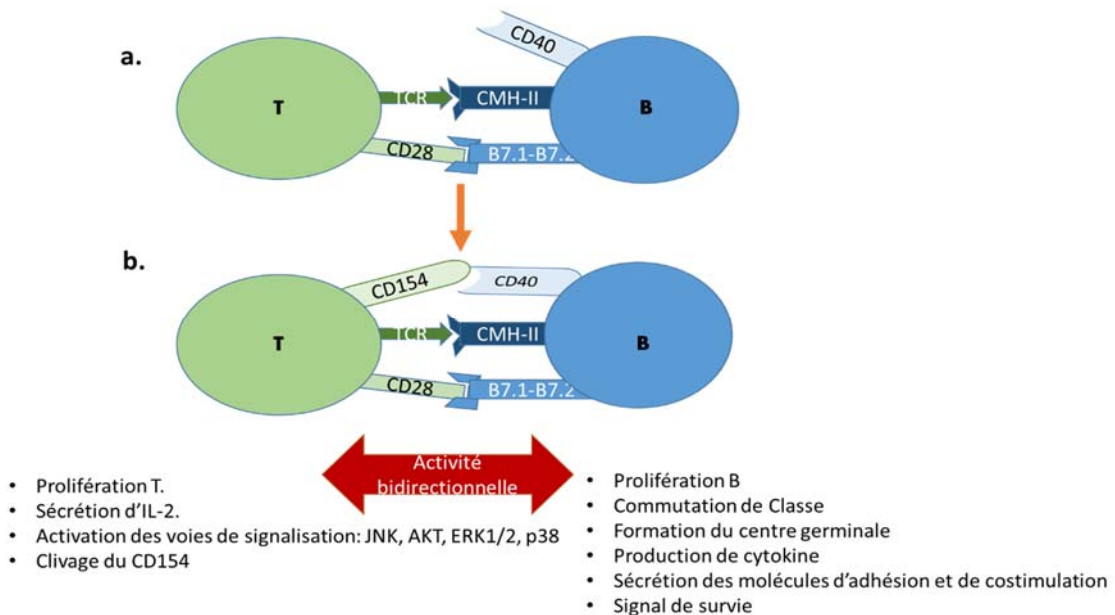
En plus de son implication dans la réponse immune normale, plusieurs études ont démontré que l'interaction du CD154 avec le CD40 est impliquée dans le développement et la progression des maladies inflammatoires et auto-immunes. À ce propos, l'augmentation de l'expression du CD40 et du CD154 a été observée chez les patients souffrant des complications cardiovasculaires [46], de l'arthrite rhumatoïde (AR) [47], du lupus érythémateux disséminé (LED), et de la sclérose en plaque (SP)

[48]. Dans ces maladies, les cellules T activées du sang périphérique, et le sCD154 libéré par les plaquettes et les cellules T activées, vont interagir avec les cellules exprimant le CD40 stimulant ainsi le couple du CD154 avec le CD40 et amplifiant son rôle biologique.

Dans le cas d'AR, des études ont montré que l'administration d'anticorps dirigés contre le CD154 chez la souris inhibe l'inflammation articulaire et l'érosion du cartilage à ce niveau [49]. Dans le cas de LED, l'administration d'anticorps dirigés contre le CD154 chez les souris atteintes d'un syndrome semblable à la LED prolonge significativement la survie et atténue les symptômes y compris l'inflammation. Une inhibition de la production des auto-anticorps a été observée suite à l'administration de CTLA4-Ig combiné à des anticorps contre le CD154 [50]. De plus, l'administration d'anticorps anti-CD154 chez les souris souffrants d'une encéphalomyélite allergique expérimentale, une condition mimant la SP chez l'humain, diminue les symptômes cliniques et inhibe la production d'auto-anticorps [48]. Une fois combiné avec le CTLA-4, l'effet des anticorps contre le CD154 est plus prononcé induisant un arrêt complet de l'infiltration cellulaire [51].

En plus, cette interaction, CD154/CD40, induit un signal bidirectionnel aussi bien via le récepteur, CD40, que via le ligand, CD154. La première évidence concernant le signal transmis via le CD154 a été décrite en 1995, suite à la formation de centres germinatifs chez des souris CD40<sup>-/-</sup> suivant leur immunisation avec le CD40 sous sa forme soluble [52]. En effet, l'activation des cellules T nécessite la présentation des antigènes étrangers par les CPA, donc l'engagement du TCR des cellules T avec les CMH-II présents à la surface des CPA, représente le premier signal d'activation des cellules T. Cette liaison doit être solidifiée par l'interaction des molécules d'adhésion, tel que ICAM-1, ICAM-2. Or ce signal n'est pas suffisant pour engager l'activation des cellules T, c'est pourquoi un second signal doit avoir lieu, la costimulation. Les premières molécules de costimulation qui vont entrer en contact sont le CD80-CD86 (B7.1-B7.2) des CPA, et le CD28 des cellules T. Suite à ce contact, les cellules T vont s'activer et vont exprimer le CD154 qui lui va entrer en contact avec le CD40 des CPA. Suite à cette interaction un signal de prolifération et une production d'IL-2 vont

avoir lieu modélisant ainsi les fonctions des cellules T [53]. Suite à l'étude de *Van Essen*, il a été démontré que l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre le CD154 induit l'activation d'une variété de voies de signalisation, parmi elles JNK et p38 [54]. De plus, notre équipe a démontré que la stimulation du CD154 par le sCD40 était capable de déclencher différents événements modulant les fonctions cellulaires, tel que l'activation des protéines kinase, l'activation d'AKT, d'ERK1/2 et du p38 [55]. Nous avons aussi démontré que la localisation du CD154 dans les radeaux lipidiques était nécessaire pour l'activation du p38 et la sécrétion d'IL-2 [9, 55, 56]. Récemment, nous avons démontré que le CD154 joue le rôle d'une molécule transductrice du signal non seulement via sa liaison avec le CD40 mais aussi via son interaction avec ses trois autres récepteurs,  $\alpha$ Ib $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et  $\alpha$ M $\beta$ 2 [36]. Nous avons prouvé que, suite à la stimulation des cellules CD154<sup>+</sup> par la forme soluble de l' $\alpha$ Ib $\beta$ 3, de l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1 ou de l' $\alpha$ M $\beta$ 2, une activation des protéines kinase et plus spécifiquement p38 et ERK1/2 va avoir lieu.



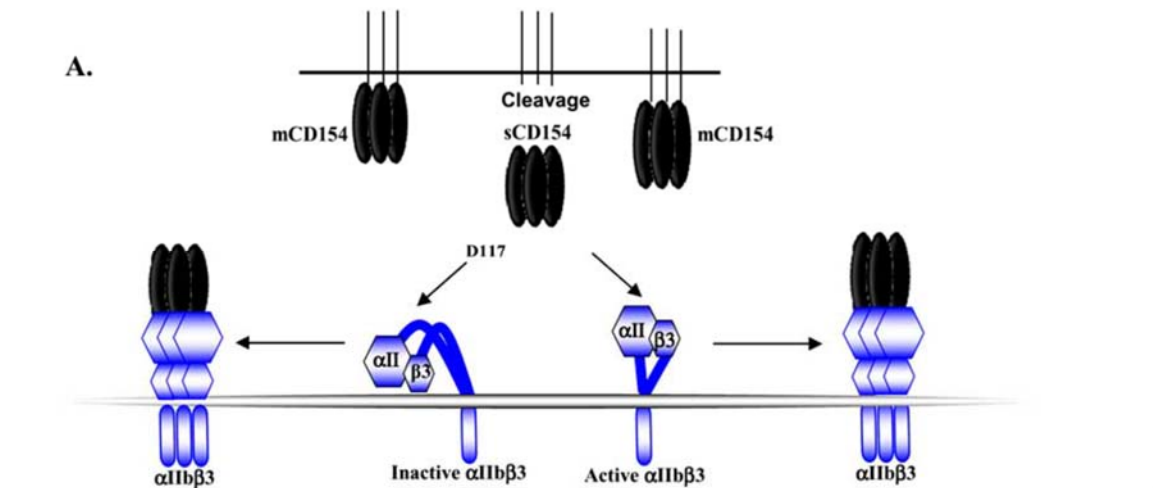
**Figure 6 : Activité bidirectionnelle de l'interaction du CD154 avec le CD40.**

a. Une cellule T entre en contact avec une cellule B (ou une CPA en général) suite à l'interaction de son TCR avec les molécules du CMH-II des cellules B. Cette interaction est suivie par la liaison entre le

CD28 des T avec les B7.1-B7.2 des B. **b.** Suite à ces deux interactions, une induction de l'expression du CD154, à la surface des cellules T va avoir lieu. Le CD154 va entrer en contact avec le CD40 et cette interaction va engendrer un signal d'activation bidirectionnel, autant via le CD154 que via le CD40.

### 1.2.2. Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ I**II** $\beta$ 3.

*André et al* ont montré que le sCD154 est capable de se lier à la surface des plaquettes activées via l' $\alpha$ I**II** $\beta$ 3 induisant ainsi l'agrégation plaquettaire et stabilisant le thrombus [13]. La liaison du CD154 à l' $\alpha$ I**II** $\beta$ 3 induit la phosphorylation des résidus Tyrosines au niveau de la partie intracellulaire de la chaîne  $\beta$ 3. Cette phosphorylation stabilise le thrombus artériel [57]. L'administration de sCD154, chez des souris CD154<sup>-/-</sup> souffrant de thrombose, réduisait considérablement le stade de la maladie et pouvait même corriger ce défaut [58]. Cette même équipe a démontré que le CD154 était capable de jouer le rôle d'un agoniste plaquettaire et d'activer ainsi ces cellules. En effet, le CD154 suite à sa liaison avec l' $\alpha$ I**II** $\beta$ 3 induit un effet bien spécifique et direct sur les plaquettes. L'utilisation de l'integrilin, un antagoniste de l' $\alpha$ I**II** $\beta$ 3, inhibe l'activation des plaquettes, alors que l'utilisation d'anticorps bloquant l'interaction du CD154 avec le CD40 n'affecte ni leur activation, ni la formation des microparticules plaquettaires [57].

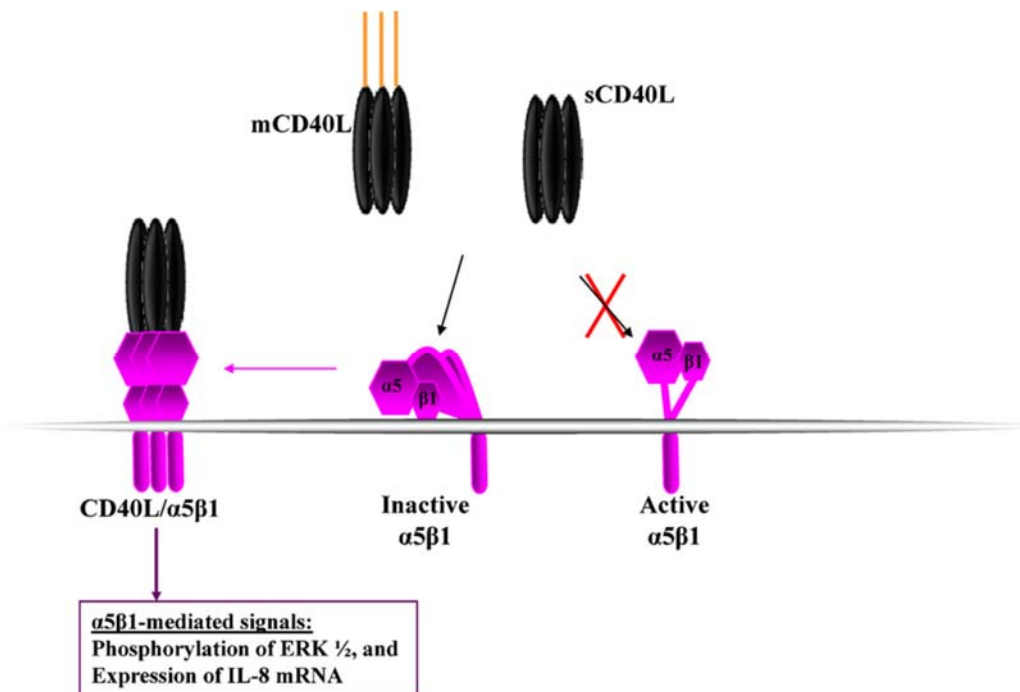


**Figure 7: L'interaction du CD154 avec le  $\alpha$ I**II** $\beta$ 3.**

Le CD154 interagit avec la forme active et inactive de l'intégrine  $\alpha$ I**II** $\beta$ 3 via le résidu D117. (Modifiée de G.S.Hassan et al, 2009) [23].

### 1.2.3. Interaction du CD154 avec l' $\alpha 5\beta 1$ .

Léveillé *et al* ont montré, suite à l'utilisation des U937, une lignée de monocytes n'exprimant pas le CD40, que le CD154 était capable d'interagir avec l' $\alpha 5\beta 1$ , exprimé à la surface de ces cellules [15]. Suite à cette interaction, une surexpression d'IL-8 va avoir lieu, ainsi qu'une phosphorylation d'ERK1/2 [15]. En plus, ils ont démontré que la liaison du CD154 avec l' $\alpha 5\beta 1$  se fait indépendamment de sa liaison avec le CD40, et que le CD154 pouvait lier les deux récepteurs simultanément. Suite à l'interaction simultanée du CD154 avec le CD40 et l' $\alpha 5\beta 1$ , une activation de p38 et ERK1/2 va avoir lieu jouant un rôle lors des maladies inflammatoires des voies respiratoires. En effet, dans le cas d'un asthme, une interaction entre le CD154 et  $\alpha 5\beta 1$ , présent à la surface des fibroblastes, induit une augmentation de la production d'IL-6 et maintient l'inflammation au niveau de la muqueuse pulmonaire [59].

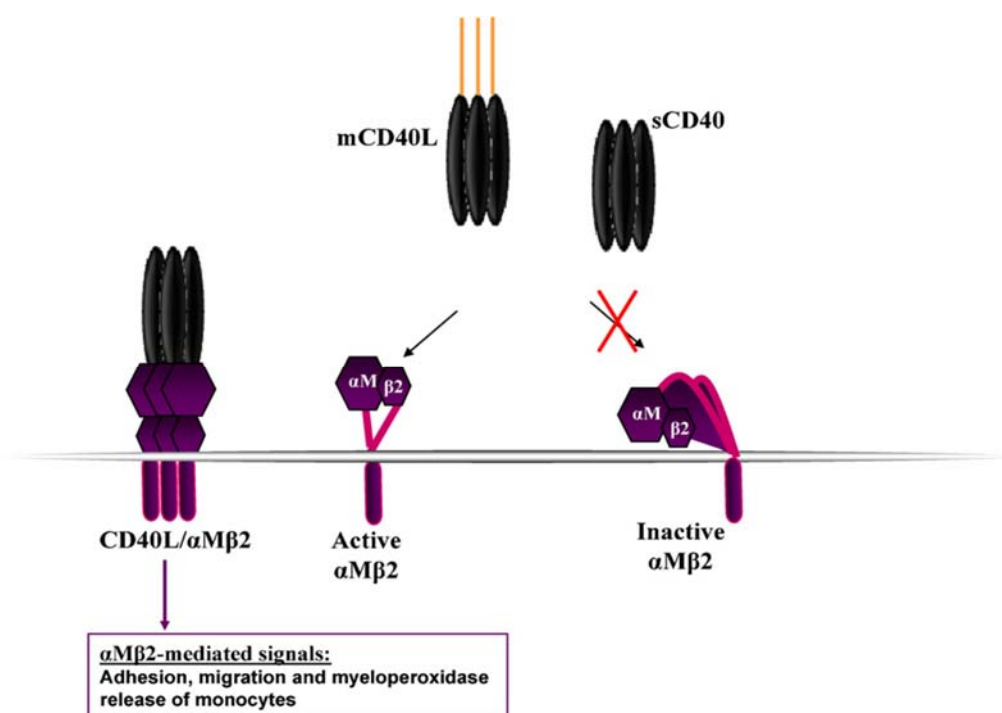


**Figure 8: Interaction du CD154 avec l' $\alpha 5\beta 1$ .**

Le CD154 soluble et membranaire est capable de lier la forme inactive de l' $\alpha 5\beta 1$ . Suite à cette liaison il va y avoir activation d'une cascade de signalisation. (G.S.Hassan, 2012) [33].

### 1.2.4. Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2.

L'interaction du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 contribue et d'une façon importante à l'athérogenèse. En effet, *Zirlik et ses collègues* ont montré que cette interaction induit la migration et l'adhérence des cellules inflammatoires vers le site d'inflammation, un processus très important dans le développement de l'inflammation lors d'une athérosclérose [16]. De plus, en 2011, *Wolf et al* ont démontré qu'une inhibition de la liaison du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 atténue l'accumulation des monocytes et réduit considérablement la formation d'une plaque d'athérome [41].



**Figure 9: Interaction du CD154 avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1).**

Le CD154 qu'il soit soluble ou membranaire lie uniquement la forme active de l' $\alpha$ M $\beta$ 2. (G.S.Hassan, 2012) [33].

### **1.3. Le rôle anti-tumoral de l'interaction du CD154 avec le CD40.**

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules au sein d'un tissu normal. Cette prolifération anormalement importante est liée à l'échappement d'une cellule, possédant la capacité de se diviser indéfiniment, aux mécanismes de régulation menant ainsi à la formation d'une tumeur. Selon la société canadienne du cancer, il existe trois principaux traitements pour le cancer; la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. D'autres traitements peuvent bien être efficaces dans certains cas tels que l'hormonothérapie, la greffe de cellules souches ainsi que la thérapie biologique telle que l'immunothérapie qui de nos jours devient de plus en plus utilisée. L'immunothérapie anti tumorale est en effet un type de traitement qui consiste à stimuler le système immunitaire pour pouvoir faire face au développement du cancer.

Le CD154 joue un rôle dans les événements pathogéniques qui mènent au cancer. Son rôle dans le développement du cancer a été proposé suite à l'observation d'une co-surexpression du CD154 et du CD40 à la surface des tumeurs [60]. En outre, les études portant sur différents types de cancer, tels que le cancer des poumons [61], des ovaires [62], d'une leucémie [63], ont montré des concentrations anormalement élevées du sCD154 sérique chez les patients. Et, qui dit concentration élevée de la forme soluble du CD154, dit diminution du niveau d'expression du CD154 membranaire. D'où l'interaction du CD154 avec le CD40 est down-régulée et un signal de prolifération et de survie, des cellules cancéreuses, est engagé [64].

Cependant, cette protéine présente aussi des fonctions anti-tumorales pouvant mener au contrôle de la croissance de la tumeur [65]. En effet, comme décrit plus haut, l'interaction du CD154 avec le CD40 est fortement impliquée dans la maturation des cellules dendritiques et l'activation des macrophages. Ces deux événements sont importants pour la réponse anti-tumorale spécifique, pouvant mener à l'activation de l'immunité adaptative et à la destruction de la tumeur [66]. En effet, le CD154 va



activer les cellules du système immunitaire et va permettre leurs migration au niveau de la tumeur. Son effet anti-tumoral est engagé suite à l'activation des cellules dendritiques, exprimant le CD40, par les cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant le CD154. Suite à cette activation, les cellules dendritiques vont sensibiliser les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi que les *Natural Killers* (NK) [67], capables de lutter contre les cellules tumorales ; c'est ainsi qu'une réponse anti-tumorale à médiation cellulaire peut être générer [68]. De plus, suite à son engagement avec les monocytes et les macrophages, le CD154 est capable d'induire la sécrétion de molécules costimulatrices ainsi que la sécrétion d'IL-12, favorisant ainsi la différenciation en *cellule T helper 1* (TH1) [69].

Il a été démontré que suite à l'engagement du CD40, exprimé à la surface des cellules tumorales, la régulation de la survie de ces cellules est subdivisée en deux voies. En effet, le CD154, suite à son interaction avec le CD40 des cellules tumorales, est capable d'initier une réponse immune anti-tumorale ; a) directement en arrêtant la croissance des cellules tumorales et en les sensibilisant à l'apoptose [70]; b) d'une façon indirecte en induisant une réponse immune, causée par l'interaction du CD154 avec le CD40 des cellules immunitaires. Cette voie indirecte repose sur l'élimination des cellules cancéreuses par les cellules du système immunitaire [71]. L'administration du CD154 chez des modèles animaux cancéreux ainsi que chez des patients souffrant d'une leucémie chronique lymphoblastique (ex-vivo) montrent bien l'efficacité de ce traitement et la réduction de la croissance de la tumeur [72, 73].

Le rôle que joue le CD154 lors d'un cancer n'est pas une propriété exclusive à l'une de ses deux formes, membranaire ou soluble. En effet, les deux formes sont capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales. Le sCD154 peut induire la mort des cellules cancéreuses uniquement lorsqu'il y a ajout de protéine inhibitrice de synthèse ou d'inhibiteurs des voies de signalisation de survie [74]. Cependant, la liaison du CD154 membranaire au CD40 des cellules cancéreuses induisait la mort de ces dernières sans l'ajout de ces inhibiteurs [26].

En se basant sur ces découvertes, *Elmetwali et al*, ont généré un CD154 mutant résistant au clivage dû aux métalloprotéinases. En effet, ce CD154 possède une séquence avec le site de clivage, <sup>110</sup>SFEMQKG<sup>116</sup>, manquant. Leur résultat d'ELISA montre une concentration en sCD154 dix fois moins élevée lorsque les cellules sont transfectées avec l'adénovirus codant pour la protéine résistante que celui codant pour le CD154 wild-type (wt). En outre, la génération du CD154 résistant, a augmenté significativement l'apoptose des cellules cancéreuses exprimant le CD40 à leurs surfaces [75]. En effet, ces derniers ont utilisé différentes lignées de cellules cancéreuses, deux exprimant le CD40 : les EJ (cellules provenant d'un carcinome de la vessie) et les AGS (d'un carcinome gastrique), et comme contrôle, des cellules CD40<sup>-/-</sup> provenant d'un carcinome de l'épithélium basal alvéolaire, les Hela. Toutes ces cellules ont été transfectées avec l'adénovirus codant pour la protéine résistante ainsi que pour le CD154 wt. Les résultats montrent que lorsque les cellules sont transfectées avec la protéine résistante, ces dernières sont deux fois plus susceptibles à l'apoptose que celles transfectées avec la forme native du CD154.

## ***Chapitre 2: Rationnel et Hypothèse.***

La fonction anti-tumorale du CD154 induite suite à sa liaison avec le CD40 ouvre de nouveaux horizons pour les travaux, qui évoquent le CD154 comme cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer et des maladies auto-immunes. En effet, l'importance du CD154 dans la réponse anti tumorale, réside dans le rôle important que joue ce ligand dans la maturation des cellules dendritiques, l'activation des macrophages, la sécrétion des différentes cytokines par ces derniers et dans la favorisation de la production des cytokines du types Th1 ou Th2 par les cellules T. Récemment, l'équipe *Elmetwali et al* [75], ont pu observer une augmentation considérable d'apoptose chez des cellules cancéreuses, suite à l'expression de CD154 mutants, résistants au clivage. Ceci nous a conduits à s'intéresser de plus près au rôle biologique du clivage de CD154 membranaire.

À la lumière de ces observations, nous avons émis comme hypothèse que :  
**L'inhibition du clivage du CD154 membranaire joue un rôle primordiale dans la réponse anti-tumorale.**

Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1. Générer des anticorps monoclonaux capables d'inhiber le clivage du CD154 membranaire.
2. Définir la spécificité de ces anticorps monoclonaux (mAbs) en générant des mutants au niveau du site de clivage.
3. Étudier le rôle biologique de l'inhibition du clivage du CD154 *in vitro*.
4. Étudier le rôle biologique de l'inhibition du clivage du CD154 *in vivo* dans un modèle de cancer.

## ***Chapitre 3: Matériels et Méthodes.***

### **3.1. Les lignées cellulaires :**

Les LTK (fibroblastes du tissu conjonctif des souris), les HEK 293 (cellules rénales embryonnaires humaines), les Jurkat E6.1, les Jurkat D1.1 (cellules T humaines lymphoblastiques), les A20 (cellules B de souris), les Bjab (cellules B humaines lymphoblastiques), les U937 (lymphome humain monocyttaire) et les SP2 (cellules B myélomateuses de souris) ont été obtenues d'ATCC (*American Type Culture Collection*) (Manassas, VA, USA). Les 3T3 mCD154 (fibroblastes embryonnaires de souris, obtenus du Dr Rejean Lapointe). Les MC38 (cellules cancéreuses du colon des souris) ont été obtenues du Dr John Stagg (CR-CHUM, Montréal, Canada). Les Jurkat E6.1 hCD154 et vecteurs ont été générées tel qu'on l'a décrit récemment [56]. Les LTK, les HEK293, les 3T3 et les MC38 ont été maintenues dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), les Jurkat, les SP2, les Bjab, et les A20 dans du RPMI 1640. Ces deux milieux ont été supplémentés avec 5% du FBS (*Fetal Bovine Serum*) inactivé (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et 1% de PSG (Pénicilline, Streptomycine et L-Glutamine) (GIBCO, Burlington, ON, Canada). Les cellules T primaires ont été purifiées, suivant un protocole approuvé par le comité d'éthique, à partir du sang périphérique des donneurs sains par une sélection négative utilisant le Robot-Sep et en suivant les instructions du fabricant (Easeysep, Stemcell, Vancouver).

### **3.2. Anticorps et Réactifs :**

Le 5C8, un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le hCD154 (IgG2a) et le MR1, un anticorps monoclonal d'Hamster dirigé contre le mCD154 (IgG1) ont été obtenus d'ATCC (Manassas.VA, USA). Le 6E3, un anticorps monoclonal dirigé contre le SEA, a été générer dans notre laboratoire. L'IgG de souris marqué à la biotine (mIgG-biotine) provient de chez Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA). L'IgG d'Hamster provient de BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). Le chèvre anti

souris marqué à l'Alexa 488 (le GAM-Alexa488), la Streptavidine marqué à l'Alexa 488 et le chèvre anti hamster marqué à l'Alexa 488 (GAH-Alexa 488) proviennent d'Invitrogen Life Technology (Burlington, Ontario, Canada). Le soluble CD40-Fc a été généré dans notre laboratoire selon la méthode décrite en 2010 [55]. L'anticorps 5C8, ainsi que le CD40-Fc et l'IgG humain (hIgG) ont été marqués à la biotine selon la technique proposée par Pierce (Rockford, IL, USA).

### **3.3. Production des anticorps monoclonaux dirigé contre le hCD154 :**

La production des anticorps monoclonaux (mAbs) a été réalisée telle que décrit par César Milsteine et Georges Köhler en 1975. Brièvement, cette méthode consiste à immuniser des souris Balb/c (Jackson Laboratory) à plusieurs reprises avec les LTK transfectées avec notre protéine (hCD154). Au bout de quelques semaines, on sacrifie la souris pour récupérer les cellules spléniques afin de les fusionner avec des cellules myélomateuses immortalisées (SP2). Cette fusion se fait grâce à l'ajout d'un agent inducteur de la fusion membranaire; le polyéthylène glycol (PEG), et en présence d'agent sélectif l' Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine (HAT). Le résultat de la fusion est la génération d'hybridomes capables de se multiplier rapidement, de sécréter des anticorps bien spécifiques et ayant la propriété de se reproduire indéfiniment. Pour pouvoir sélectionner ces hybridomes producteurs d'anticorps, les cellules sont réparties dans des plaques de 96 puits à fond rond. Dix jours plus tard, on récupère le surnageant des puits pour vérifier la production des immunoglobulines (Ig) par ELISA. Les cellules des puits positifs ont été propagées dans des plaques de 24 puits et retestées pour la sécrétion d'Ig. Après une dizaine de jours, les puits positifs ont été testés par cytométrie en Flux pour vérifier leur production des anticorps spécifiques au hCD154. Les hybridomes produisant les anticorps dirigés contre le hCD154 ont été clonés à deux reprises. Après ce clonage, la production des mAbs se faisait par propagation des hybridomes *in vitro*, suivie d'une purification du surnageant de culture de ces derniers. Cette purification est faite à l'aide des colonnes de purification par affinité à la protéine

G et suivant les instructions du manufacturier (GE Healthcare Bio-sciences, Mississauga, ON, Canada).

### **3.4. Mutagenèse dirigée et transfactions :**

#### **3.4.1. Mutagenèse dirigée:**

Le plasmide d'expression pcDNA4-TO-myc-HisA Zeocin (Invitrogen) contenant le gène hCD154 wt (full length) a été généré précédemment au laboratoire. Ce dernier a été utilisé comme plasmide de base pour la génération des différents mutants. La génération des mutants a été établie, selon le protocole du fournisseur "QuickChange directed mutagenesis kit". Brièvement, les amorces contenant les mutations désirées, délétion des résidus  $\Delta^{111}\text{FEMQ}^{114}$ , substitution des résidus  $\text{Sub}^{111}\text{FEMQ}^{114}$ ,  $\Delta^{110}\text{SFEMQKG}^{116}$ ,  $\text{Sub}^{110}\text{SFEMQKG}^{116}$ , et la  $\text{Sub}^{112}\text{EM}^{113}$  représentées dans le tableau 1, ont été conçus avec une  $T_M \geq 78^\circ\text{C}$ , à l'aide de l'application QuickChange. Ensuite, une PCR (*polymerase chain reaction*), est effectuée en utilisant ces amorces, le plasmide matriciel (pcDNA4-TO-myc-HisA-hCD154 wt) et une Taq polymérase à forte fidélité ("pfu-Turbo Taq") selon le programme suivant :

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	30 seconds
2	18	95°C	30 seconds
		55°C	1 minute
		68°C	1 minute/kb of plasmid length*

Le produit de PCR est digéré avec une DpnI, qui clive uniquement les sites méthylés, éliminant ainsi les traces du plasmide non muté (pcDNA4-TO-myc-HisA, hCD154 wt), qui a servi de matrice pour la synthèse des nouveaux plasmides mutés. Le produit de digestion, sert après à transformer les bactéries compétentes XL-1 Blue (livrés avec le kit), qui sont ensuiteensemencées sur un milieu sélectif contenant l'Ampicilline. Finalement, les colonies bactériennes qui ont poussées ont été



amplifiées, puis le plasmide d'intérêt extrait et séquencé. Une fois le séquençage fait et le résultat est positif, on procède à la transfection des HEK 293 en utilisant la méthode de précipitation calcium phosphate (Clontech, Mountain View, Canada).

Mutation	Amorces	Plasmide template
Deletion FEMQ	FW 5'-GAGACGAAGAAAGAAAACAGCAAAGGTGATCAGAATCCTCAA-3' Rv 5'-TTGAGGATTCTGATCACCTTTGCTGTTTTCTTCTTCGTCTC-3'	pcDNA4 <sup>Td</sup> /TO/myc -His (A)-hCD154wt (full length)
Sub.FEMQ/AAAA	FW 5'-AGGAGACGAAGAAAGAAAACAGCGCTGCAGCGGCAAAAGGTGATCAGAATCCTCAAATTG-3' Rv 5'-CAATTGAGGATTCTGATCACCTTTTGCCGCTGCAGCGCTGTTTTCTTCTTCGTCTCCT-3'	pcDNA4 <sup>Td</sup> /TO/myc -His (A)-hCD154wt (full length)
Deletion SFEMQKG	FW 5'-GAGGAGACGAAGAAAGAAAACGATCAGAATCCTCAAATTGCG-3' Rv 5'-CGCAATTTGAGGATTCTGATCGTTTTCTTCTTCGTCTCCTC-3'	pcDNA4 <sup>Td</sup> /TO/myc -His (A)-hCD154wt -deletion FEMQ
Substitution SFEMQKG/7A	FW 5'-GAGACGAAGAAAGAAAACGCCGCTGCAGCGGCAGCAGCTGATCAGAATCCTCAA-3' Rv 5'-TTGAGGATTCTGATCAGCTGCTGCCGCTGCAGCGGCGTTTCTTCTTCGTCTC-3'	pcDNA4 <sup>Td</sup> /TO/myc -His (A)-hCD154wt -sub. FEMQ/4A
<sup>112</sup> EM <sup>113</sup> /CC	FW 5'-GAGACGAAGAAAGAAAACAGCTTTTGCTGCCAAAAAGGTGATCAGAATCCTCAA-3' Rv 5'-TTGAGGATTCTGATCACCTTTTGGCAGCAAAAGCTGTTTCTTCTTCGTCTC-3'	pcDNA4 <sup>Td</sup> /TO/myc -His (A)-hCD154wt (full length)

### Tableau 1: Les différents primers.

Ce tableau montre les différents primers qui ont été utilisés pour générer nos différentes mutations au niveau du CD154, ainsi que le plasmide hôte.

### 3.4.2. Transfection des cellules par la méthode Calcium Phosphate :

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules HEK 293 sontensemencées, à une concentration de  $1.5 \times 10^6$  cellules par boîte de pétri, dans du DMEM supplémenté avec 10 % FBS.

**Préparation du précipité [ADN / phosphate de calcium] :** Pour 500µl de précipité, 62µl d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 2M sont ajoutés à 438µl d'une solution aqueuse des ADN testés (la concentration en ADN est ajustée à 20µg avec un plasmide contrôle). La solution ADN/CaCl<sub>2</sub> est versée goutte à goutte dans 500µl de tampon Hépes (NaCl 280 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM; Hépes 50 mM ; pH 7.15). Après 20 minutes à température ambiante, le précipité d'ADN est ajouté directement sur les cellules sans changer le milieu de culture. Après 6 heures d'incubation à 37°C, un précipité pulvérulent et extrêmement fin se dépose sur les cellules. Les cellules sont alors lavées puis remises à incuber à 37° C dans du DMEM contenant 10 % FBS. 24 heures après, les cellules sont lavées, trypsinisées et ensemencées dans une boîte de pétri en ajoutant 10 ml du DMEM, 10 %FBS. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu DMEM, 10 %FBS auquel nous avons ajouté de la Zéocine à la concentration de 100µg/ml (Invivogen). Le milieu de culture est changé tous les 3-4 jours jusqu'à ce que des foyers de cellules apparaissent. L'expression du gène hCD154 muté est testée périodiquement lors de la transfection transitoire par cytométrie en flux. Les Jurkat E6.1 Vecteurs et les HEK 293 Vecteurs ont été utilisées comme contrôles négatifs dans nos expériences.

### **3.5. Cytométrie en flux et tri cellulaire :**

Afin de vérifier l'expression de hCD154 à la surface des cellules et de tester la spécificité de nos anticorps monoclonaux, les cellules ont été incubées avec les mAbs (1µg/100µL), ou avec le 5C8 comme contrôle positif, pendant 30 min sur glace, ensuite, elles ont été lavées avec du PBS 2% FBS froid puis incubées 30 min avec le GAM-Alexa488 (1µg /1000µL). Les cellules ont été analysées par FACS Calibure (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) et le programme Flowjo (BD Biosciences). L'anticorps 6E3 était utilisé comme contrôle isotypique (1 µg/100 µL).

Pour vérifier la capacité des mAbs à reconnaître le CD154 murin, nous avons utilisé la même approche. Le MR1 a été utilisé comme contrôle positif, l'IgG

d'Hamster comme contrôle isotypique, et le GAH-Alexa 488 comme anticorps secondaire.

Pour étudier la liaison du CD40 avec les différents mutants, nous avons utilisé le CD40-Fc-Biotine et l'hIgG-Biotine comme contrôle isotypique. Les deux protéines ont été utilisées à différentes concentrations, 125ng/100 µL, 62.5ng/100 µL et 32.5ng/100 µL, suivi par la streptavidine-Alexa488 (1µg /1000µL).

Pour déterminer si les différents mAbs (Clone 4, clone 8 et le 5C8) reconnaissent le même épitope, des expériences de compétition ont été réalisées. Ces expériences consistent à pré-incuber les cellules avec (2µg/100 µL) du clone 4, clone8 ou le 5C8 pendant 20min à 4°C, suivi d'une incubation de 30min à 4°C avec le 5C8-Biotine 125 ng/100 µL, puis 30min avec la streptavidine-Alexa488 (1µg /1000µL).

L'inhibition du clivage par le clone 8 a été elle aussi testée par cytométrie en flux en utilisant le 5C8-Biotine (125 ng/100 µL) comme anticorps primaire, le 6E3 (125 ng/100 µL) comme contrôle ; suivis par la Streptavidine-Alexa488 (1µg /1000µL).

Pour s'assurer que les différents mutants utilisés lors de ces études exprimaient le même niveau du hCD154, nous avons trié les cellules en utilisant un cytofluoromètre FACS Aria IIIu trieur de cellules (BD Biosciences, Mississauga, ON). Pour ce faire, nous avons utilisé l'anticorps 5C8 puisqu'il reconnaît un épitope situé loin des résidus mutés.

### **3.6. Quantification du sCD154:**

Pour la détection du sCD154 relargué d'une façon spontanée ou induite via son interaction avec le CD40 des A20 ; les cellules transfectées avec le hCD154 wt ou muté, ont été incubées une heure à 37°C, avec ou sans la présence des A20-CD40 wt. La concentration du sCD154 présente au niveau du surnageant a été mesurée par

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), selon les instructions du fabricant. (R&D, Minneapolis, USA).

### **3.7. Le traitement *in-Vivo*:**

Pour évaluer l'effet des mAbs dans un modèle de cancer, des cellules MC38 ( $1 \times 10^6$  Cellules) ont été injectées en sous-cutané chez des souris C57BL/6 (Jackson Laboratory). Quatre jours après l'inoculation des cellules tumorales, les souris ont été traitées, chaque 3 jours, soit avec l'isotype contrôle comme contrôle négatif, soit avec un anticorps anti-PD1 comme contrôle positif, soit avec notre mAb d'intérêt soit avec une combinaison de ce dernier et de l'anticorps anti-PD1. Chaque groupe était constitué de cinq souris. Les souris ont été observées régulièrement et ainsi la taille des tumeurs notée. Au quinzième jour, et suite au sacrifice des souris, les tumeurs ont été excisées pour calculer leur volume et mesurer leur poids. Le protocole utilisé lors de cette expérience a été approuvé par le comité de protection des animaux du CR-CHUM (4114032WMs).

## ***Chapitre 4: Résultats.***

#### **4.1. Les anticorps monoclonaux :**

Pour tester l'efficacité de ces hybridomes à produire les mAbs, nous avons étudié par cytométrie en flux leur capacité à lier le hCD154 présent à la surface des LTK. La figure 10 montre la capacité des 11 hybridomes à produire des mAbs capables de reconnaître spécifiquement le hCD154 membranaire exprimé par les LTK transfectées avec le hCD154 wt. Cependant, ces mAbs ne reconnaissent pas les LTK transfectées avec le plasmide vide, ce qui confirme bien la spécificité de ces derniers à reconnaître le hCD154 à la surface des LTK.

Dans un deuxième temps, nous avons confirmé que cette reconnaissance est spécifique au hCD154. De la même façon, nous avons testé la spécificité de ces mAbs à reconnaître le hCD154 exprimé à la surface de différents types cellulaires. Les cellules utilisées expriment le hCD154 soit d'une façon constitutive (Jurkat D1.1), soit inducible (plaquettes et cellules T activées) soit transfectée avec le hCD154 (HEK 293 et Jurkat E6.1). Les Jurkat E6.1 et les HEK 293 transfectées avec un vecteur vide ont été utilisées comme contrôle négatif. La spécificité de reconnaissance a été comparée avec celle du 5C8 utilisé comme contrôle positif. Les résultats présentés dans le tableau 2 ont confirmé que les hybridomes sélectionnés pour cette étude produisent des mAbs capables de lier le hCD154 membranaire d'une façon spécifique, à la surface de plusieurs types cellulaires.

#### **4.2. Inhibition de la liaison du CD154 avec ses récepteurs par les mAbs.**

Afin de mieux caractériser les mAbs nouvellement générés, nous avons étudié leur capacité à bloquer l'interaction du hCD154 avec ses différents récepteurs. Pour cela nous avons choisi des cellules U937, exprimant uniquement l' $\alpha 5\beta 1$ , les BJAB, exprimant seulement le CD40, les HEK 293 préalablement transfectées avec l' $\alpha IIb\beta 3$

ou avec la forme active de l' $\alpha$ M $\beta$ 2 (capable de lier le hCD154). Les différents mAbs ont été pré-incubés avec chacune des lignées cellulaires et le couple mAbs/lignée cellulaire est ensuite incubé avec le sCD154 marqué à l'Alexa-488 (sCD154-Alexa 488) puis analysé par cytométrie en flux. L'ajout du sCD154 non marqué à la place des mAbs a été utilisé comme contrôle positif pour le blocage. Les résultats du tableau 3 montrent la capacité des mAbs à bloquer ou non l'interaction du sCD154-Alexa-488 avec ses récepteurs. Plus le signal Alexa-488 mesuré sur les cellules est faible, plus la capacité de blocage du mAb utilisé est forte et vice-versa. En effet, le 5C8 et le Clone 6 sont capables de bloquer l'interaction du CD154 avec le CD40 ainsi qu'avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2. De même ces deux mAbs bloquent partiellement l'interaction avec l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1. Le Clone 14 bloque complètement l'interaction du CD154 avec l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1. L'interaction du CD154 avec l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 est uniquement altérée et même bloquée avec le Clone 4. (Tableau 3). Les clones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11,13 n'altèrent pas la liaison du hCD154 avec ses différents récepteurs.

### **4.3. Définir la spécificité des mAbs pour le site du clivage :**

Afin de déterminer s'il existe parmi les mAbs que nous avons produit, des mAbs dirigés contre le site de clivage du hCD154 membranaire, nous avons généré cinq mutants du hCD154 ( $\Delta^{111}$ FEMQ<sup>114</sup>, Sub<sup>111</sup>FEMQ<sup>114</sup>,  $\Delta^{110}$ SFEMQKG<sup>116</sup>, Sub<sup>110</sup>SFEMQKG<sup>116</sup> et Sub<sup>112</sup>EM<sup>113</sup>). Ces mutants ont été générés en ciblant la séquence décrite dans la littérature commettant le site de clivage. Et en tenant compte de deux considérations: 1) les mutations ne doivent pas affecter l'interaction du hCD154 membranaire avec ses différents récepteurs; 2) les mutations doivent inhiber efficacement le clivage du hCD154 membranaire. C'est dans ce contexte que nous avons procédé premièrement par deux mutations ( $\Delta^{111}$ FEMQ<sup>114</sup>, Sub<sup>111</sup>FEMQ<sup>114</sup>) et lorsque nous avons observé que ces deux mutations n'étaient pas capables de bloquer totalement le clivage, nous avons généré deux autres mutations ( $\Delta^{110}$ SFEMQKG<sup>116</sup>, Sub<sup>110</sup>SFEMQKG<sup>116</sup>) en se basant sur le papier de *Elmetwali et al.* Cependant, malgré la délétion ou la substitution des 7 a.a qui délimitent le site de coupure (EM), nous

avons toujours observé un taux basal de clivage, ceci nous a poussé à générer une cinquième mutation qui touche cette fois seulement le site de coupure (Sub<sup>112</sup>EM<sup>11</sup>) en le substituant par deux cystéines, dans le but de renforcer le site de clivage par une deuxième liaison, type pont disulfure (figure 11).

Suite à la génération de ces 5 mutants, nous avons été capable de définir le ou les résidus du hCD154 impliqué(s) dans la reconnaissance des différents mAbs. Les résultats sont représentés dans le tableau 4. Le 5C8 a été utilisé comme contrôle positif par ce qu'il est dirigé contre la partie C-terminale du hCD154 et capable de bloquer l'interaction du CD154 avec le CD40, donc son site de reconnaissance est situé loin du site de clivage [76]. D'où, sa capacité de reconnaissance n'est pas altérée par les différentes mutations générées. Les résultats montrés dans le tableau 4 montrent bien que les différents mAbs ne sont pas dirigés contre les mêmes résidus. Parmi ces anticorps, deux semblent pouvoir jouer un rôle dans le clivage du hCD154 (clone 2 et clone 8). En effet, d'après l'étude faite par *Yacoub et al*, en 2013, le clivage du hCD154 se fait entre l'acide glutamique 112 (E112) et la méthionine 113 (M113). D'où notre intérêt à aller étudier si ces deux mAbs jouent un rôle dans le clivage ou non. Nous avons utilisé le 5C8 afin de trier le même niveau d'expression des différents mutants du CD154 à la surface des HEK 293 (figure 12). Les cellules triées ont été testées avec les différents mAbs d'intérêts. Les résultats générés (figure 13) montrent bien que seulement le clone 2 et le clone 8 perdent leur capacité de reconnaître le mutant <sup>112</sup>EM<sup>113</sup>. Il est donc fort probable que ces deux mAbs soient capables de bloquer le clivage du CD154 membranaire.

#### **4.4. Les mutants générés sont résistants au clivage:**

Comme on l'a mentionné plus haut, le sCD154 provient d'une source intracellulaire, et d'un clivage membranaire induit suite à l'interaction du CD154 avec le CD40. On a voulu donc en premier lieu évaluer la capacité des mutants à libérer d'une façon spontanée la forme soluble. Pour ce faire, nous avons récupéré le



surnagent des cellules transfectées avec les différents mutants et nous avons dosé la teneur en sCD154. Ces 5 mutations diminuent considérablement le relargage spontané du sCD154. (Figure 14 A).

Dans un second lieu nous avons procédé par un système de co-culture, utilisant les HEK 293 hCD154 wt ou les HEK 293 hCD154 mutées en présence ou en absence des A20 hCD40 wt. Les cellules ont été incubées 1h à 37°C. Les surnageants ont été récupérés et la teneur en sCD154 a été quantifiée par ELISA. La figure 14 B, montre que tous les mutants générés inhibent d'une façon significative le clivage du CD154 induit par son interaction avec le CD40.

Pour confirmer que cette inhibition du clivage n'est pas due à un changement de la conformation du hCD154 ou d'une perte de sa reconnaissance par le hCD40, nous avons testé la capacité du hCD40 à lier le hCD154 muté en le comparant à sa forme wt. Comme le montre la figure 15, toutes ces mutations sont capables de lier le CD40 d'une façon comparable à celle faite par le hCD154 wt.

#### **4.5. Le Clone 8 reconnaît le CD154 de souris :**

Vu l'homologie qui existe entre le hCD154 et le mCD154, 80%, (voir figure 16) nous avons décidé de tester la capacité de ces mAbs de reconnaître le mCD154. A notre grande surprise, un seul mAb était capable de reconnaître la molécule de souris. Effectivement, le Clone 8 est capable de reconnaître le mCD154, et d'une façon comparable à celle du MR1, un anticorps spécifique au mCD154. (Voir figure 17.)

#### **4.6. Inhibition du clivage par le Clone 8 :**

Suite au fait que le Clone 8 est capable de reconnaître le hCD154 ainsi que le mCD154, et vu qu'il reconnaît la molécule au niveau du site de clivage, Nous avons émis l'hypothèse que ce dernier pourrait inhiber le clivage membranaire de la molécule. Et pour étudier ceci, nous avons procédé par un système de co-culture (HEK

293 transfectées avec le hCD154 et les A20 CD40wt). En effet, dans une plaque de 24 puits, nous avons laissé adhérer les HEK 293, puis on les a pré-incubées avec le clone 8 (2µg /100µL) pendant 20min à 37°C. Suite à cette pré-incubation nous avons ajouté les A20 CD40 wt et nous les avons laissées 1h à 37°C ; une fois l'heure écoulée, nous avons récupéré les HEK 293 et on a étudié le niveau d'expression du CD154 à la surface des cellules par cytométrie en flux. Les résultats montrent bien une augmentation du niveau d'expression du CD154 à la surface des HEK 293 lorsqu'elles sont pré-incubées avec le Clone 8 par rapport au contrôle. (Voir figure 18). Cependant, il a fallu vérifier que cette augmentation n'est pas le résultat d'un blocage du site de reconnaissance du 5C8. C'est pourquoi nous avons utilisé un système de compétition entre les différents mAbs, montrant effectivement que la reconnaissance du 5C8 n'est pas affectée suite à la présence du Clone 8. (Voir figure 19)

#### **4.7. Étudier l'activité anti-tumorale du Clone 8:**

Tenant compte que le clone 8 est capable de bloquer le clivage enzymatique du CD154 membranaire et capable de reconnaître le CD154 murin, nous avons vérifié son activité anti-tumorale. Pour ce faire, nous avons injecté à des souris C57BL/6 des MC38 pour développer un cancer en présence ou en absence du Clone 8. L'anti-PD1 a été utilisé comme contrôle positif et un isotype contrôle comme contrôle négatif. Suite au traitement qui a duré 15 jours, les souris ont été sacrifiées ; les tumeurs excisées, leurs tailles ainsi que leurs poids analysés. L'analyse des résultats, Figure 20, montre bien que le traitement avec le Clone 8, mAb dirigé contre le CD154, inhibe significativement la croissance de la tumeur vu la réduction observée au niveau de la taille et du poids. En effet, le Clone 8 était même capable d'inhiber la croissance de la tumeur d'une façon comparable ou même plus importante que celle induite par l'anticorps anti-PD1. La combinaison du Clone 8 et de l'anticorps anti-PD1 induit une réponse additive anti-tumorale.

**Tableau 2:Caractérisation des différents mAbs nouvellement générés.**

<b>mAb Anti-CD154 Nom &amp; activité</b>	<b>Sous classe</b>	<b>Liaison des mAbs aux HEK 293- Vect</b>	<b>Liaison des mAbs aux HEK 293- CD154</b>	<b>Liaison des mAbs aux Jurkat D1.1</b>	<b>Liaison des mAbs aux Jurkat E6.1 Vect</b>	<b>Liaison des mAbs aux Jurkat E6.1- CD154</b>	<b>Liaison des mAbs aux cellules T activées</b>	<b>Liaison des mAbs aux plaquettes activées</b>
<b>contrôle</b>	IgG	-	-	-	-	-	-	-
<b>5C8</b>	IgG2a	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 2</b>	IgG2b	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 3</b>	IgG2b	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 4</b>	IgG2b	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 5</b>	IgG2a	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 6</b>	IgG1	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 7</b>	IgG2a	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 8</b>	IgG2a	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 10</b>	IgG1	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 11</b>	IgG1	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 13</b>	IgG1	-	+++	+++	-	+++	+++	+++
<b>Clone 14</b>	IgG2b	-	+++	+++	-	+++	+++	+++

Les différents mAbs sont spécifiques au hCD154 et non aux LTK contre lesquels ils ont été produits.

Ce tableau nous montre bien que les mAbs sont capables de reconnaître le hCD154 à la surface de n'importe quelle cellule l'exprimant. Le 5C8 est utilisé comme contrôle positif, les HEK 293 Vect et les Jurkat E6.1 Vect utilisées comme contrôle négatif. Les cellules ont été incubées 30min à 4°C avec les différents mAbs suivi de 30min à 4°C avec le GAM-Alexa488.

**Tableau 3: Liaison du CD154 avec ses différents récepteurs en présence des différents mAbs.**

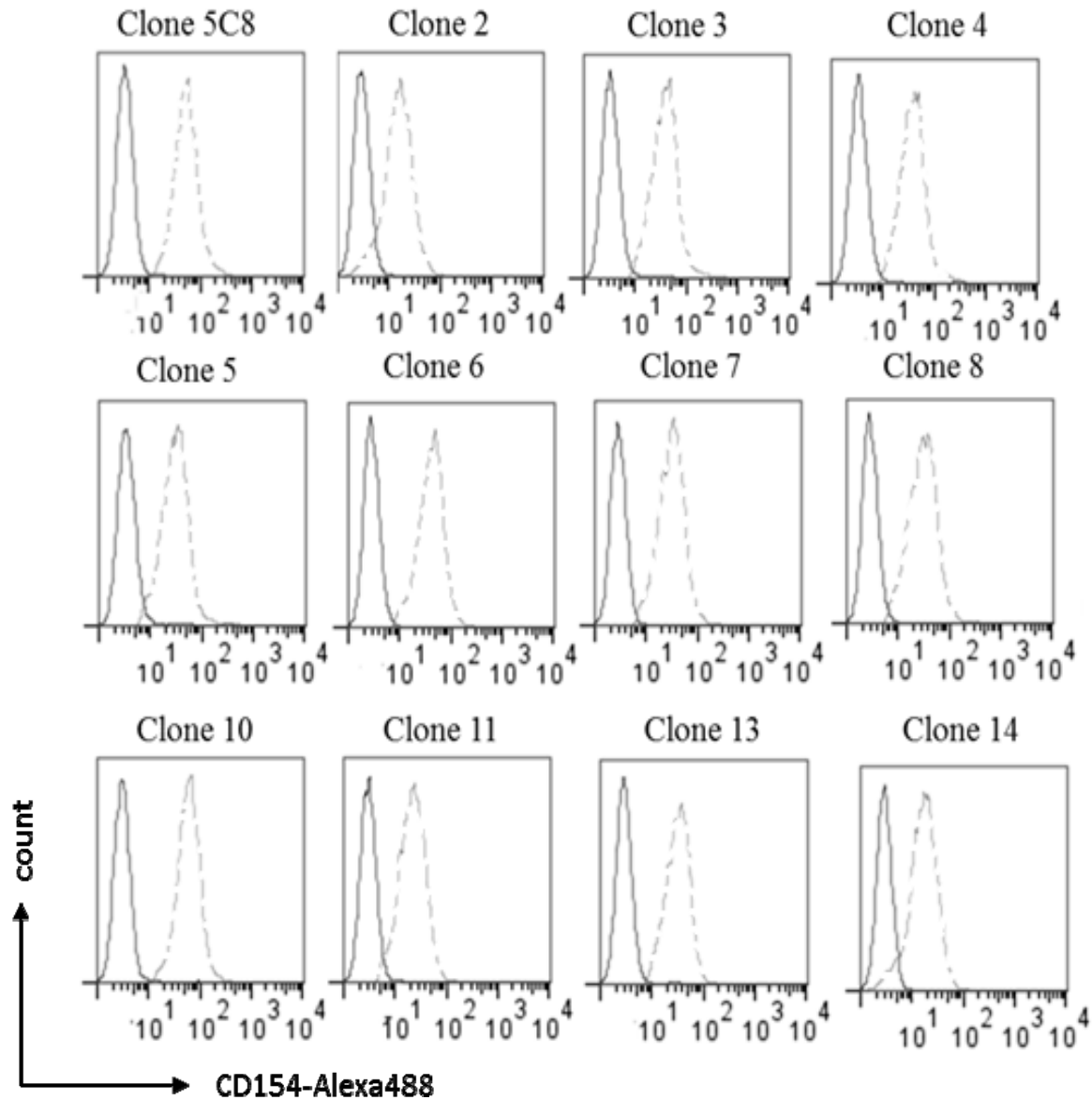
<b>Anti-CD154 Nom &amp; Activité inhibitrice</b>	<b>Liaison du CD154 au CD40</b>	<b>Liaison du CD154 à l'<math>\alpha</math>M<math>\beta</math>2</b>	<b>Liaison du CD154 à l'<math>\alpha</math>5<math>\beta</math>1</b>	<b>Liaison du CD154 à l'<math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3</b>
<b>contrôle</b>	+++	+++	+++	+++
<b>5C8</b>	-	-	+	+++
<b>Clone 2</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 3</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 4</b>	+++	+++	+++	-
<b>Clone 5</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 6</b>	-	-	+	+++
<b>Clone 7</b>	++	++	++	+++
<b>Clone 8</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 10</b>	+++	+++	++	+++
<b>Clone 11</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 13</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 14</b>	+++	+++	-	+++

Ce tableau résume les résultats du FACS qui ont étudié la capacité de blocage de l'interaction du sCD154, couplé à l'Alexa-488, avec ses différents récepteurs.

**Tableau 4: Caractérisation des différents mAbs dirigés contre le hCD154.**

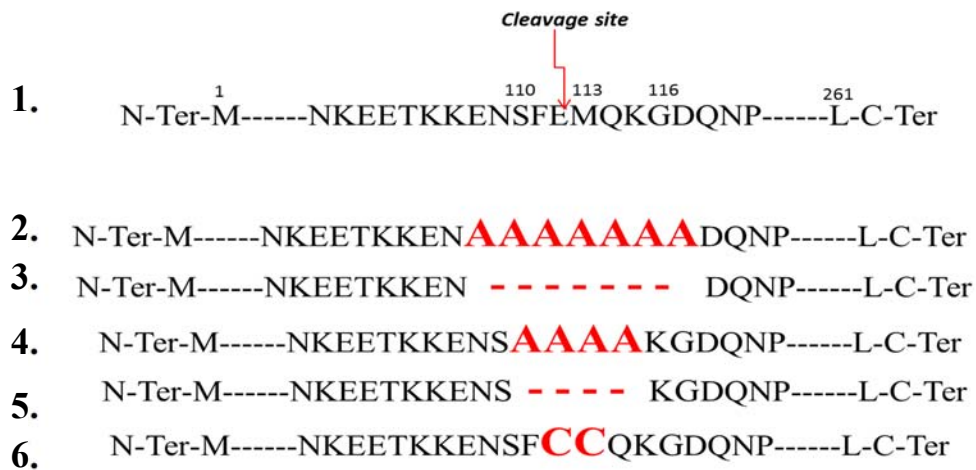
<b>Anti-CD154</b>	<b>Liaison aux</b>	<b>Liaison aux</b>	<b>Liaison aux</b>	<b>Liaison aux</b>	<b>Liaison aux</b>	<b>Liaison aux</b>
<b>Nom &amp; activité</b>	<b>HEK- CD154-WT</b>	<b>HEK- CD154 <math>\Delta</math>SFEMQKG</b>	<b>HEK- CD154 Sub SFEMQKG</b>	<b>HEK- CD154 <math>\Delta</math>FEMQ</b>	<b>HEK- CD154 Sub FEMQ</b>	<b>HEK- CD154 Sub EM</b>
<b>contrôle</b>	-	-	-	-	-	-
<b>5-C8</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 2</b>	+++	---	---	---	---	---
<b>Clone 3</b>	+++	---	---	++	+++	+++
<b>Clone 4</b>	+++	---	---	+++	+++	+++
<b>Clone 5</b>	+++	---	---	+++	+++	+++
<b>Clone 6</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 7</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 8</b>	+++	---	---	---	---	---
<b>Clone 10</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 11</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Clone 13</b>	+++	---	+++	---	+++	---
<b>Clone 14</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+

La reconnaissance du hCD154 wt ainsi que la protéine mutée par les différents mAbs a été testée par FACS. En effet, les HEK 293 ont été incubées 30min à 4°C avec 1µg/100µl des différents mAbs suivi du GAM-Alexa488 (1µg/1000µl). Le niveau de reconnaissance par le 5C8 a été pris comme contrôle.



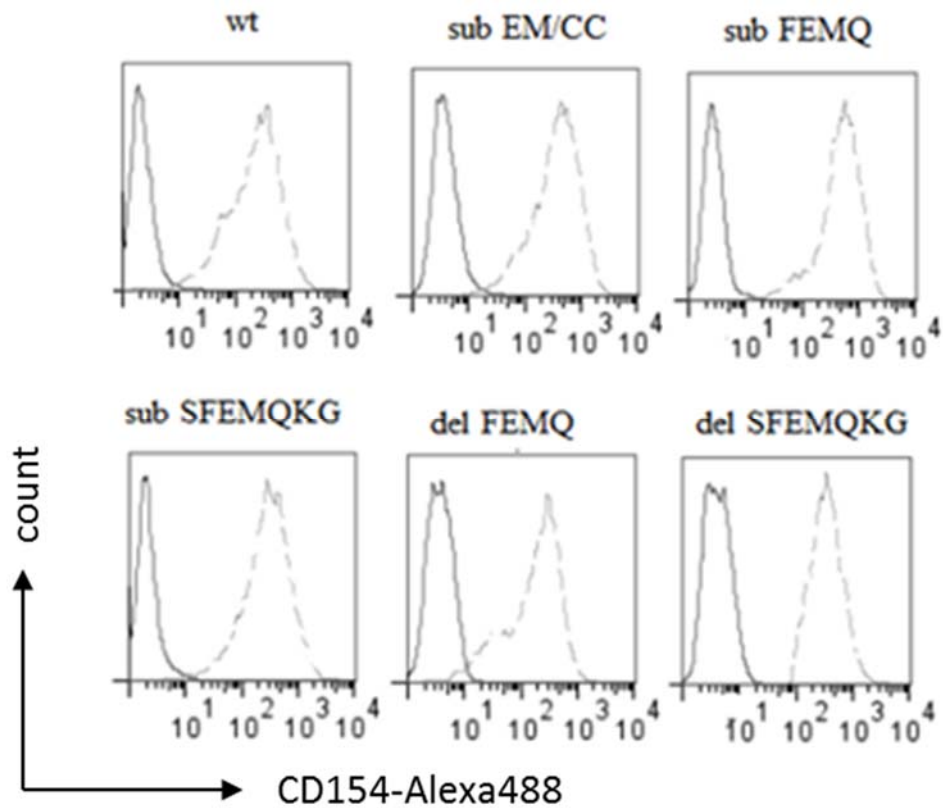
**Figure 10: La reconnaissance du CD154 par les différents mAbs nouvellement générés.**

Analyse par cytométrie en flux de la bonne reconnaissance du CD154 exprimée à la surface des LTK stablement transfectées par le plasmide pcDNA4-TO-myc-HisA Zeocin codant pour le CD154 humain. Le trait plein correspond au LTK, utilisées comme contrôle négatif pour nos LTK hCD154 (trait pointillé). Le 5C8 été utilisé comme contrôle positif pour les mAbs. Les cellules ont été incubées 30min à 4°C avec les différents mAbs suivi par 30min à 4°C avec le GAM-Alexa488. C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.



**Figure 11 : Les différents mutants du hCD154.**

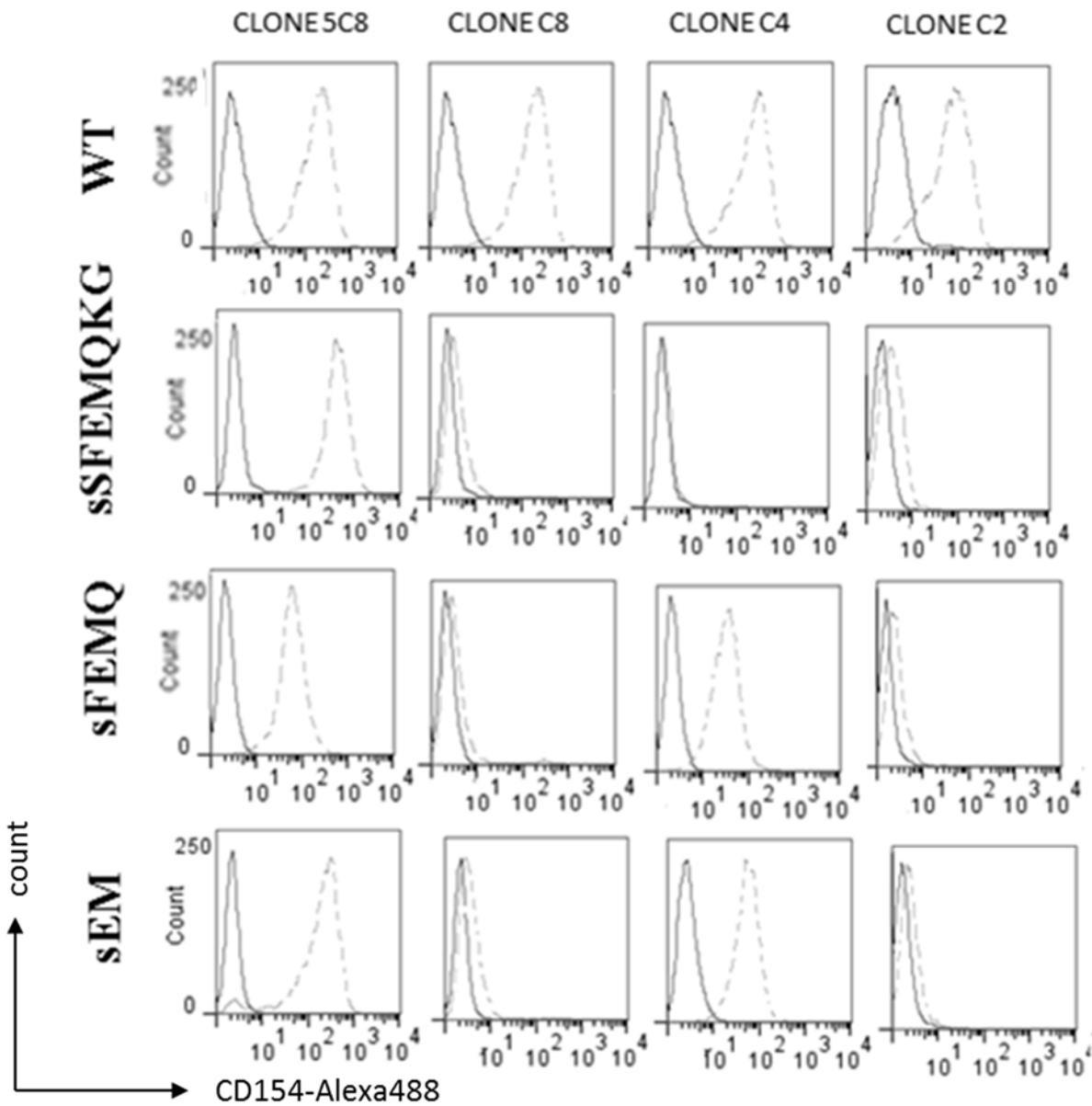
Représentation de la séquence du hCD154 wt ainsi que celle des mutations générées au niveau du site de clivage. En effet, le 1) représente le hCD154 wt, le 2) représente la substitution de 7a.a (SFEMQKG) par 7 alanines, le 3) représente la délétion de ces 7a.a, le 4) est une substitution de 4a.a (FEMQ) par 4 alanines, le 5) représente la délétion de ces 4a.a et finalement le 6) représente la substitution des résidus EM par 2 cystéines.



**Figure 12 : Niveau d'expression du hCD154 à la surface des HEK 293 triées.**

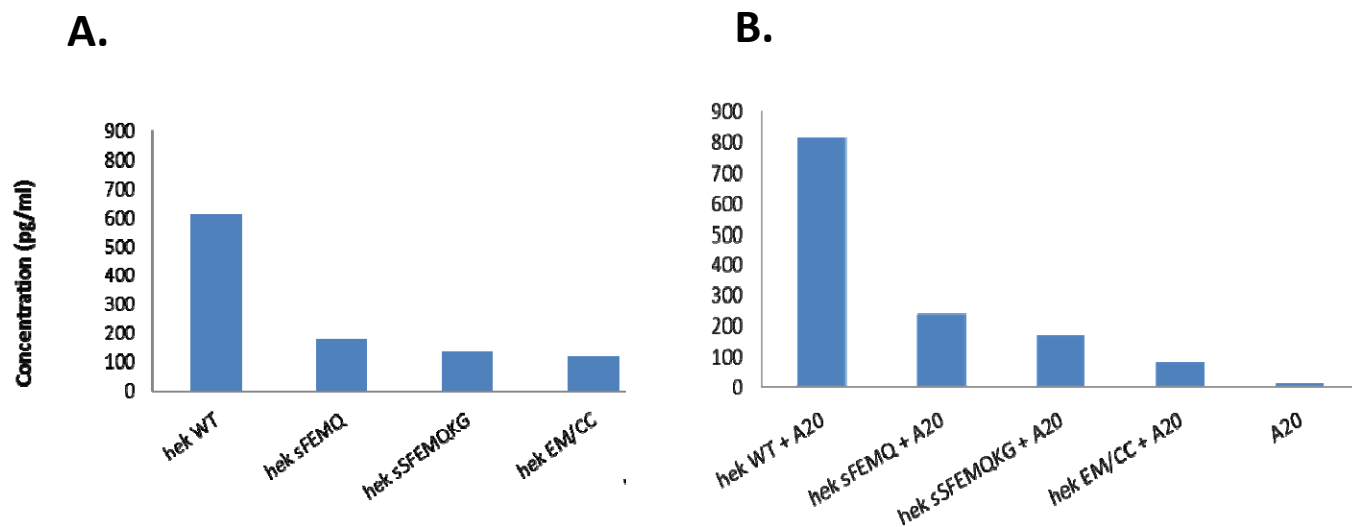
Les HEK 293, stablement transfectées par le plasmide pcDNA4-TO-myc-HisA Zeocin (wt ou muté), ont été incubées 30min à 4°C avec le 5C8 (trait pointillé) suivi d'une incubation de 30min à 4°C avec le GAM-Alexa488. C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.





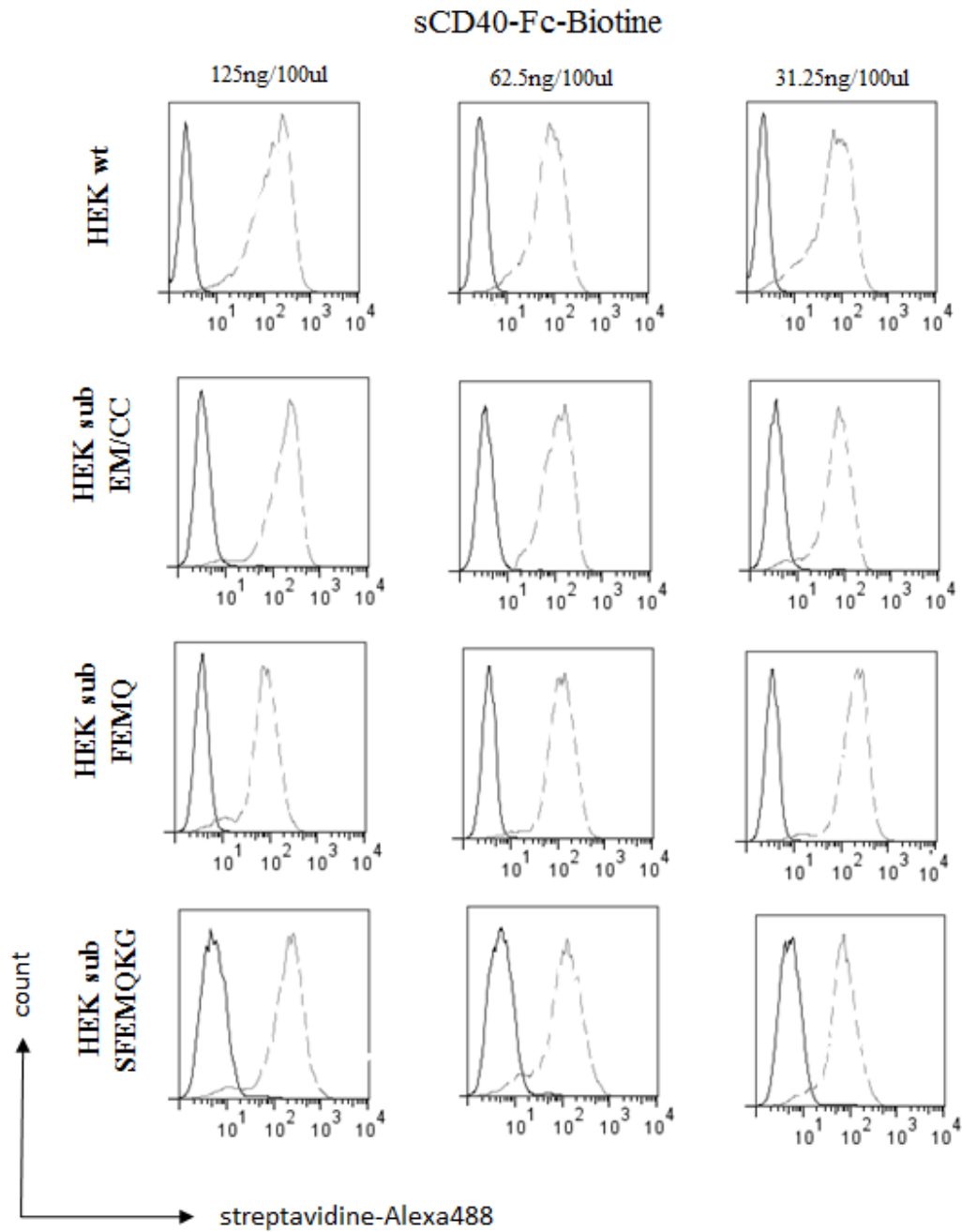
**Figure 13 : Les mAbs perdent la capacité de reconnaître le hCD154 dépendamment de la mutation son niveau.**

Cette figure montre une représentation graphique du niveau de reconnaissance du hCD154 à la surface des HEK 293 stablement transfectées par le hCD154 sous ses différentes formes mutées ainsi que native. Les cellules ont été incubées 30min avec le 5C8 (contrôle positif, trait pointillé), le 6E3 (isotype contrôle, trait plein), le clone 2, le clone 4 et le clone 8 30min à 4°C suivi du GAM-Alexa488. C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.



**Figure 14 : Concentration du sCD154.**

La concentration du sCD154 a été quantifiée par ELISA. Pour le faire, nous avons laissé adhérer  $0.5 \cdot 10^6$  cellules de HEK 293, stablement transfectées avec le hCD154 wt ainsi qu'avec les différentes mutations, auxquelles nous avons ajouté les A20 CD40 wt et que nous avons laissé 1h à 37°C. **A.** Montre le niveau de relargage spontané du CD154 par les HEK 293 pour 1h à 37°C et **B.** montre le niveau du sCD154 induit via son interaction avec le CD40 des A20 suite à une interaction de 1h à 37°C. Les résultats présentés représentent la moyenne d'au moins 3 expériences.



**Figure 15 : Le CD40 lie les différents mutants du hCD154.**

Le CD40 est capable de se lier aux différentes mutations du CD154. Cette figure montre bien que les différentes mutations n'affectent pas l'interaction CD154/CD40. Les cellules ont été incubées 30min à 4°C avec différentes concentrations du sCD40-Fc-Biotine (trait pointillé) suivi d'une coloration avec la Streptavidine Alexa488 (30min à 4°C). C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.

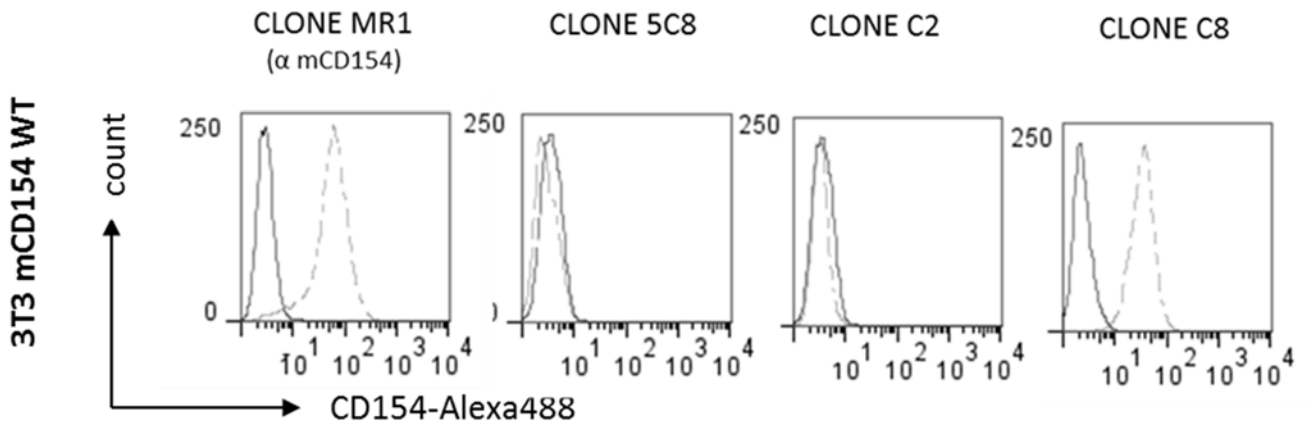
```

      *           20           *           40           *           60
h-CD40L : MIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEEDERNLH : 60
m-CD40L : MIETYSQES PRSVATGLPASMKIFMYLLTVFLITQMIGSVLFAVYLHRRLDKVBEBEVLNH : 60
      MIETY Q SPRS ATGLP SMKIFMYLLTVFLITQMIGS LEAVY HRRLDK E E N H
                                     M113
      *           80           *           100          *           120
h-CD40L : EDFVFMKTIQR CNTGERSL SLLNCEEIKSQFEGFVKDILNKKEETKKENSFEMQKGDQNP : 120
m-CD40L : EDFVFIKLLKRCNKGECSL SLLNCEEMRRQFEDLVKDIPLNKEE-KKENSFEMQRGDEDP : 119
      EDFVF K   RCN GE SL SLLNCEE   QFE   VKDI LNKEE KKENSFEMQ GD P
                                     M113
      *           140          *           160          *           180
h-CD40L : QIAAHVISEASSKTT SVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRGLYYIY AQVTFCSN : 180
m-CD40L : QIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYTMSNLVWLENGKQLTVKREGLYYVYTVQVTFCSN : 179
      QIAAHV SEA S   SVLQWA KGYT M   NLV LENGKQLTVKR GLYY Y QVTFCSN
      *           200          *           220          *           240
h-CD40L : REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQOSIHLGGVFELQPGASV FVN : 240
m-CD40L : REASSQRPFIVGLW LKPSGSSERILLKAANTHSSSQLCEQOSVHLGGVFELQAGASV FVN : 239
      RE SSQ PFI L LK   ERILL AANTHSS   C QQS HLGGVFELQ GASV FVN
      *           260
h-CD40L : VTDEPSQVSHGTGFTSFGLLKL- : 261
m-CD40L : VTEASQVIHRVGFSSFGLLKL- : 260
      VT SQV H   GF SFGLLKL

```

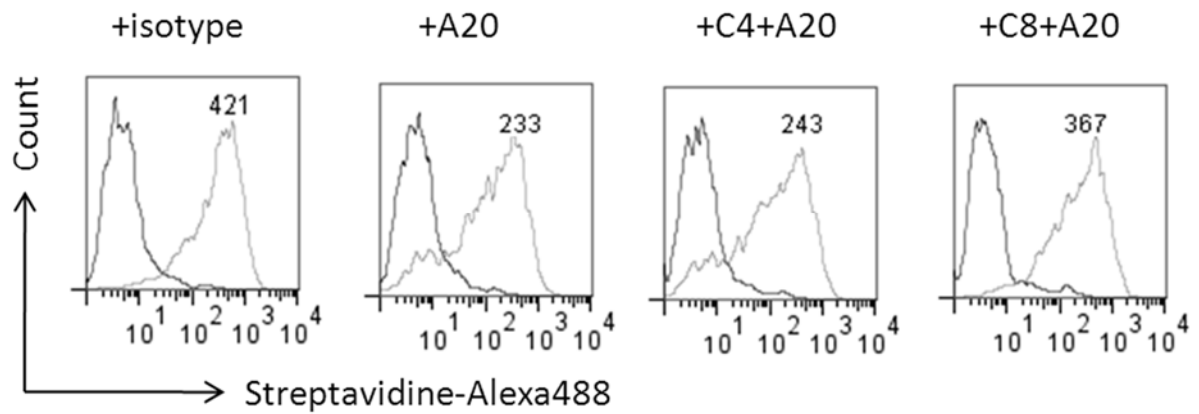
**Figure 16 : Homologie entre le hCD154 et le mCD154.**

Cette figure montre bien qu'il existe une grande similitude, 80%, entre la molécule humaine et souris. Les zones noires montrent les parties identiques pour les deux espèces. De plus, on peut bien remarquer que la région autour du site de clivage est très similaire.



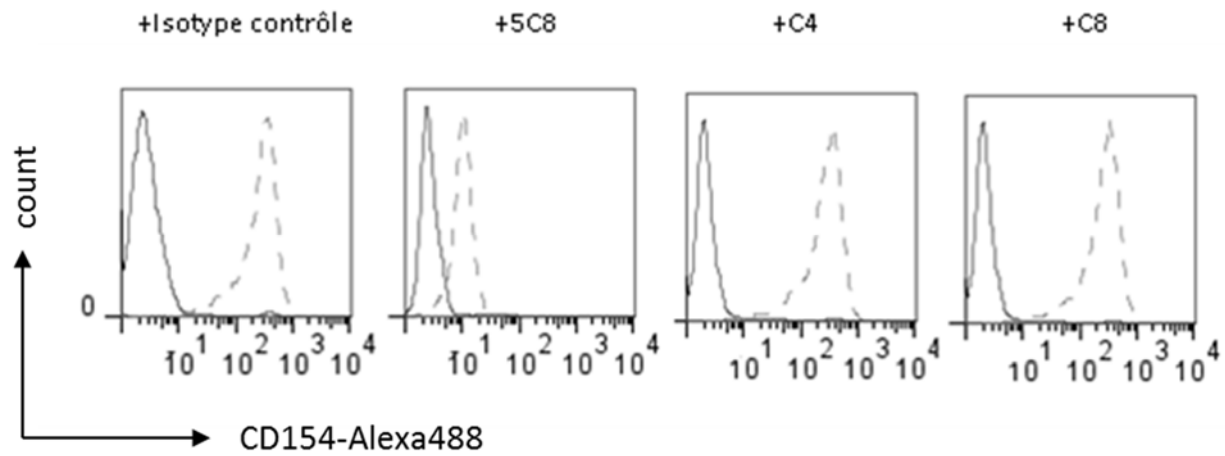
**Figure 17 : Le clone 8, un mAb dirigé contre le hCD154, reconnaît le mCD154.**

Seul le clone 8 est capable de reconnaître le mCD154. Le niveau d'expression du mCD154 à la surface des 3T3 a été vérifié par l'utilisation d'un mAb qui lui est spécifique, le MR1. Le 6E3 a été utilisé comme isotype contrôle (trait plein) pour les différents mAbs anti-hCD154 et le Hamster-IgG (trait plein) pour le MR1. Les cellules ont été incubées 30min à 4°C avec les différents mAbs (trait pointillé) ainsi qu'avec le MR1 (trait pointillé) suivi d'une incubation de 30min à 4°C avec le GAM-Alexa488 ou le GAH-Alexa488 (pour le MR1). C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.



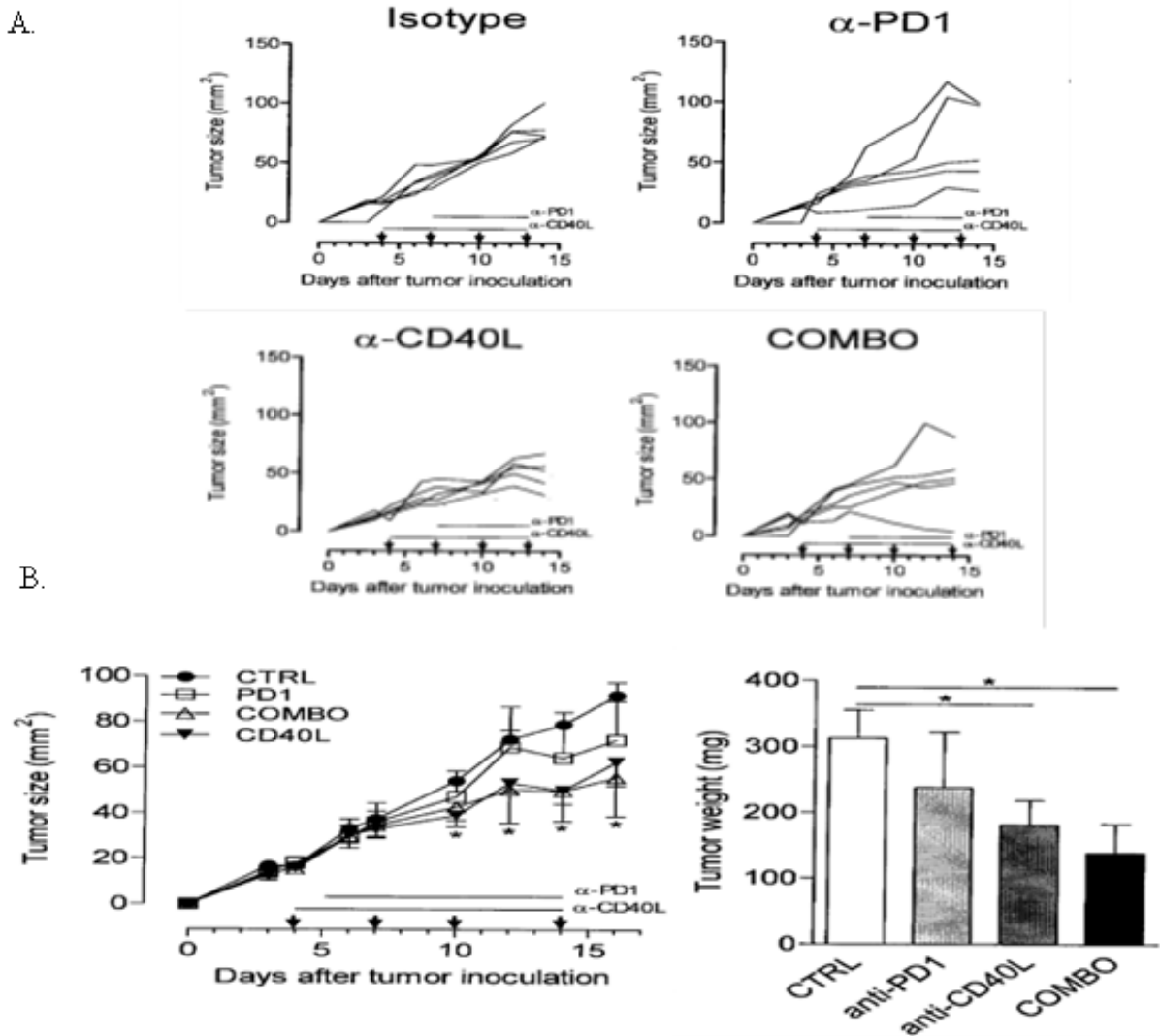
**Figure 18 : Inhibition du clivage.**

Cette étude montre bien que la pré-incubation avec le Clone 8, inhibe le clivage du CD154 suite à son interaction avec le CD40 des A20 transfectées. En effet, les cellules ( $0.3 \cdot 10^6$  HEK 293 hCD154wt) ont été pré-incubées avec le clone 4 ou le clone 8, 20min à 37°C, suivi d'une incubation d'une heure à 37°C avec  $0.3 \cdot 10^6$  A20 CD40wt. Les cellules ont été récupérées pour un marquage avec le 5C8-biotine ou le 6E3-biotine, comme isotype contrôle, suivi de la streptavidine-Alexa488. C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.



**Figure 19 : Le Clone 4 (C4) et le Clone8 (C8) ne compétitionnent pas avec le 5C8.**

Cette figure représente le niveau de reconnaissance du hCD154 à la surface des HEK 293 qu'elles soient pré-incubées avec les mAbs (C4 ou C8 ou le 5C8), ou avec un isotype contrôle et suivi par le 5C8-Biotine. On voit bien que cette reconnaissance (trait pointillé) n'est bloquée que lorsque les cellules sont incubées avec le 5C8. C'est une expérience représentative d'au moins 5 expériences.



**Figure 20 : Modèle animal.**

Cette figure montre que le Clone 8 inhibe significativement la croissance de la tumeur vu la réduction observée au niveau de la taille et du poids. Le Clone 8 est capable d'inhiber la croissance de la tumeur d'une façon comparable ou même plus importante que celle de l'anti-PD1. De plus, la combinaison du Clone8 et de l'anticorps anti-PD1 induit une réponse additive anti-tumorale. A) Représente la taille de la tumeur en mm<sup>2</sup> chez chaque souris du même groupe, traité avec un contrôle isotypique, avec l'anti-PD1, avec l'anti-CD154 ou avec le mix de l'anti CD154 et de l'anti PD1. B) Représente la taille moyenne, ainsi que le poids moyen de la tumeur au sein de chaque groupe. Les résultats ont été analysés selon la loi de student.



## ***Chapitre 5: Discussion.***

Le CD154 est une glycoprotéine transmembranaire de type II ayant un poids moléculaire de 33-39 KDa [5]. Elle était initialement décrite comme étant une molécule exprimée d'une façon transitoire à la surface des cellules T activées [77]. Quelques années plus tard, plusieurs équipes ont démontré que cette protéine est aussi exprimée à la surface d'autres cellules hématopoïétiques, telles que les plaquettes activées, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes [6, 7], et à la surface de cellules non hématopoïétiques, telles que les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales [13, 14]. Son récepteur principal, le CD40, était considéré comme l'unique récepteur jusqu'en 2002, quand *André et al*, ont démontré que l' $\alpha$ Ib $\beta$ 3, membre de la famille des intégrines, est aussi capable de se lier au CD154 [13]. Par la suite deux autres membres de la famille des intégrines ont été identifiés comme étant capables de lier le CD154. En effet, *Léveillé et al* [15] ont identifié l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et *Zirlik et al* l' $\alpha$ M $\beta$ 2 [16].

Dépendamment du récepteur impliqué dans sa liaison, le CD154 joue différents rôles. En effet, son interaction avec le CD40 joue un rôle primordial dans la commutation de classe d'immunoglobuline, la régulation de la réponse inflammatoire, la progression et le déclenchement des maladies auto-immunes et aussi bien dans la pathogénèse que dans l'immunothérapie du cancer [46, 64, 65]. Alors que son interaction avec l' $\alpha$ Ib $\beta$ 3 est impliquée dans la stabilité du thrombus et le retard de l'occlusion [57, 58], son interaction avec l' $\alpha$ M $\beta$ 2 induit le recrutement des monocytes et des macrophages vers le site inflammatoire [59] et son interaction avec l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1 mène à la production des différentes cytokines pro-inflammatoires et des métallo-protéinases [36].

Comme tous les membres de la famille des TNF, le CD154 existe aussi sous forme soluble. Les deux formes du CD154, soluble et membranaire, se trouvent toujours en forme trimérique, et cette trimérisation est absolument nécessaire pour leurs activités biologiques [12]. La forme soluble est le résultat d'un clivage protéolytique, au niveau de la méthionine 113, résultant un fragment de 18 KDa [9]. Elle peut provenir d'une sécrétion spontanée (intracellulaire) ou suite à un clivage

membranaire. Notre équipe a récemment démontré que seule l'interaction du CD40 avec le CD154 induisait son clivage de la surface cellulaire [9]. De plus, il a été démontré que le sCD154 possède une fonction pathophysiologique dans différentes maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et la sclérose en plaque ainsi que dans les maladies cardiovasculaires. C'est pourquoi lors de mes travaux de maîtrise nous avons généré des mAbs dirigés contre le CD154 humain, nous avons caractérisé leurs spécificités, nous avons sélectionné ceux qui sont capables d'inhiber le clivage enzymatique pour finalement étudier leurs activités biologiques.

La découverte des mAbs par Milstein et Köhler en 1975 a révolutionné le monde scientifique. Elle a ouvert la porte à des progrès intéressants dans la thérapie des différentes maladies auto-immunes. Contrairement aux anticorps polyclonaux, les mAbs possèdent des activités très spécifiques et sont en principe dirigés contre des épitopes beaucoup plus courts. Ils peuvent être dirigés contre deux ou trois acides aminés. Afin de générer des mAbs dirigés contre le CD154 humain, capables de reconnaître la molécule à la surface des différents types cellulaires dans sa forme conformationnelle, nous avons immunisé nos souris avec des cellules LTK transfectées avec le CD154 humain. Les 11 hybridomes sélectionnés produisent des mAbs capables de reconnaître le CD154 exprimé à la surface des cellules transfectées, des cellules T et des plaquettes activées.

Une fois les hybridomes devenus stables, nous les avons propagés *in vitro* afin de produire une bonne quantité des mAbs. Les mAbs obtenus sont dirigés contre différents sites. Pour spécifier le site de reconnaissance de chacun de ces derniers nous avons généré différentes mutations au niveau du CD154 humain, plus précisément au niveau du site du clivage. Chaque mAbs est capable de reconnaître la molécule du CD154 à un site qui lui est bien spécifique et qu'une mutation à ce niveau peut être le résultat d'une perte de la reconnaissance.

Ensuite, nous avons étudié la capacité de ces mAbs de bloquer le clivage du CD154, c'est pourquoi il a fallu en premier lieu s'assurer que la liaison avec le CD40 n'est pas affectée. Effectivement, les différentes mutations au niveau du CD154 ainsi que nos mAbs d'intérêt n'affectent pas son interaction avec le CD40. De plus, pour qu'il n'y ait pas une altération dans le bon fonctionnement de l'interaction du CD154 avec ses trois autres récepteurs, il a fallu étudier aussi si nos mAbs bloquaient l'interaction du CD154 non seulement avec le CD40 mais aussi avec les autres récepteurs. Par la suite, nous avons choisi les mAbs qui n'empêchent pas l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs pour étudier ensuite leur capacité de bloquer le clivage.

Suite à son interaction avec le CD40, le CD154 est un élément clé durant le développement de la réponse immunitaire, le développement de maladies auto-immunes [23] ainsi que durant le cancer. En effet, il a été démontré que le CD154 joue un rôle dans la pathogenèse du cancer ; son expression ainsi que celle du CD40 a été déterminée à la surface de différentes cellules tumorales et cette expression est corrélée avec le stade de la maladie [60, 64]. Une co-expression du CD40 et de son ligand, le CD154, à la surface d'une même cellule tumorale va lui conférer des propriétés oncogéniques, va augmenter sa capacité de prolifération et d'invasion [64]. Une concentration anormalement élevée du sCD154 a été détectée au niveau du sérum de malades atteints de différents types de cancer [65]. De plus, un niveau faible de CD40 à la surface des cellules, induit une prolifération de ces dernières et une croissance tumorale [78]. Cependant, un niveau élevé va promouvoir la mort cellulaire et une dégradation de la tumeur [79, 80]. Effectivement, l'interaction du CD40 avec le CD154 possède une action indirecte sur la cellule tumorale contribuant négativement à la progression tumorale suite à l'activation des cellules T cytotoxiques et des cellules Natural Killer. Ces dernières vont induire alors la mort des cellules cancéreuses [81]. Donc cette même interaction, CD154/CD40, peut prendre un autre volet et peut intervenir dans l'établissement de la réponse anti-tumorale indirectement en stimulant le système immunitaire [65]. Effectivement, les premières évidences concernant son effet anti-tumoral ont été mise en place par *Hayward et al* qui ont montré que 17% des

patients avec le syndrome d'hyper IgM présentent des tumeurs fatales, et qu'une abolition du CD154 était la cause d'une augmentation de la susceptibilité aux infections ainsi qu'elle pourrait être la cause d'un développement d'un corps malin [82].

Par ailleurs, cette interaction peut jouer un rôle directement contre le développement d'un cancer, menant à l'apoptose des cellules tumorales et ceci grâce au CD40 [75]. Même si le CD40 ne possède pas de domaine de mort, l'apoptose des cellules tumorales se produit suite à la liaison des ligands cytotoxiques des TNF, tels que le TNF $\alpha$  et le FasL [83]. Cependant, l'apoptose des cellules n'est effectuée que lorsque le CD40 interagit avec le CD154 membranaire. En effet, les études ont montré que le sCD154, et suite à sa liaison avec le CD40 membranaire, été capable d'arrêter la prolifération de ces cellules sans induire leur apoptose [84].

Vu le rôle apoptotique que joue le CD154 membranaire et vu l'effet néfaste du sCD154, l'objectif de notre étude, qui était d'inhiber le clivage du CD154 devient de plus en plus intéressant. Nous avons étudié la capacité de nos mAbs à inhiber le clivage par cytométrie en flux, nos résultats suggèrent notre possession d'un mAbs, clone 8, pouvant bloquer le clivage du CD154. De plus, nous avons généré des mutants du CD154, résistants au clivage induit via son interaction avec le CD40, la résistance au clivage a été prouvée par la quantification du sCD154 par ELISA.

Vu la grande homologie qui existe entre le CD154 humain et CD154 murin, nous avons testé la capacité du clone 8 à reconnaître le CD154 murin. A notre grande surprise, les résultats montrent que le clone 8 reconnaît le CD154 murin exprimé à la surface des cellules, aussi bien que le CD154 humain. La seule explication logique et raisonnable de cette observation est le fait que l'immunisation des souris avec les cellules LTK exprimant le CD154 humain a aboli la tolérance chez ces souris immunisées. Quoi qu'il en soit cet anticorps est un outil d'une grande importance qui nous a permis de vérifier *in-vivo* dans un modèle de souris le rôle du CD154 résistant au clivage dans l'activité anti tumorale.

Suite aux études faites *in-vitro*, des études *in-vivo* ont été mises en place pour vérifier l'efficacité du CD154 membranaire contre le cancer. Différentes études faites chez la souris [85, 86], chez le rat [87] ainsi que chez le chien [88] ont montré qu'effectivement le CD154 membranaire était capable d'abolir la croissance tumorale. En effet, que ça soit des cellules transfectées *ex-vivo* avec le CD154 avant leur inoculation chez l'animal ou traitées directement avec un adénovirus codant pour le CD154, le CD154 s'est avéré avoir un rôle très important dans le traitement du cancer. La concentration élevée du sCD154 a été observée chez les patients souffrants de différents types de cancer, tel que le cancer du nasopharynx [89], le cancer des poumons [61], le cancer du pancréas [90]. De plus, différentes études ont montré que les cellules tumorales peuvent excréter des facteurs coagulant induisant l'activation des plaquettes et ainsi la sécrétion, ou plus spécifiquement le clivage du CD154 [91]. Ce sCD154, biologiquement actif peut donc interagir avec le CD40 et induire une activité inflammatoire. De ce fait, le sCD154 joue un rôle positif dans la progression de la tumeur en induisant une immunosuppression et un microenvironnement favorisant le développement tumoral [92]. De même, une étude de *Huang et al* suggère que le sCD154 peut jouer un rôle immunosuppresseur, favorisant ainsi le recrutement des cellules suppressives (cellule T régulatrices, cellules myéloïdes suppressives) plutôt que les cellules effectrices [93]. Toutes ces observations nous ont poussées à tester l'efficacité du clone 8, mAbs pouvant bloquer le clivage du CD154, *in-vivo* dans un modèle de souris. Les résultats obtenus lors de cette étude montrent qu'effectivement le traitement avec le clone 8, inhibiteur du clivage du CD154, possède une activité anti tumorale très importante. Cette activité est comparable ou même plus importante que celle induite par l'anti PD-1, agent anti-cancéreux. L'anti PD-1 a été pris comme contrôle positif lors de notre étude vu que le blocage de l'interaction du PD-1 avec ces récepteurs par des anticorps anti PD-1 aboutissait à la régression de la tumeur [94]. En effet, le PD-1 est un récepteur de la mort programmée, exprimé à la surface des cellules B et des cellules T activées [95]. Ses ligands, PD-L1 ou PD-L2, ont été observés à la surface de différents types de cellules cancéreuses et que son interaction avec ses ligands joue un rôle dans le développement du cancer [96]. De plus, une

combinaison de notre mAbs et de l'anti PD-1 a été utilisée. En effet, nos résultats montrent que la combinaison diminuait considérablement la taille ainsi que le poids de la tumeur. Ce qui suggère un effet additif pour le clone 8.

Finalement, il reste à noter que l'activité anti tumorale induite par l'inhibition du clivage du CD154 en utilisant l'anticorps anti CD154 humain peut être médié par trois différents mécanismes : 1) une augmentation de l'activité apoptotique induite via le CD40; 2) une augmentation significative de l'activité des cellules présentatrices d'antigène, en particulier des cellules dendritiques, à activer les cellules T cytotoxiques et 3) l'induction d'un fort signal persistant au niveau d'une cellule suite à l'interaction de son CD154 membranaire avec ses récepteurs qui sont exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Afin de vérifier ces différents mécanismes des études sont actuellement en cours.

## ***Chapitre 6: Conclusion et Perspectives.***



Dans notre étude, nous avons réussi à bloquer le clivage du CD154 présent au niveau de la membrane cellulaire des HEK 293. Cette inhibition du clivage induit une augmentation de l'efficacité du rôle anti tumoral du CD154. En effet, nous avons étudié l'inhibition du clivage dans un modèle de co-culture *in-vitro*, utilisant des HEK 293 transfectées avec le CD154 wt et des A20 CD40 wt.

Pour les expériences futures, il faut étudier le rôle de cette inhibition dans le bon fonctionnement de l'interaction du CD154 avec le CD40. Pour ceci, un dosage de cytokine (Th1, Th2, IL-12, IL-6, IL-8), ainsi qu'une quantification d'immunoglobulines, par ELISA, seront établis. Cette quantification sera faite suite à une co-culture entre les HEK 293 hCD154wt, incubées avec le mAb inhibant le clivage ou avec un contrôle isotypique, et les cellules B, les monocytes et les cellules dendritiques, provenant des PBMC d'un donneur sain. Ces cellules vont être analysées par cytométrie en flux, pour tester leur niveau d'expression du CD40, permettant ainsi l'interaction du CD154.

Dans notre cas nous avons étudié l'effet anti tumoral indirect du CD154 qui a été fait suite à l'injection des MC38, cellules n'exprimant pas le CD40, à la souris, et non pas le rôle apoptotique direct du CD154 médié par le CD40. C'est pourquoi, ça serait important d'étudier l'effet du mAb, inhibant le clivage du CD154, en utilisant la même approche expérimentale, mais, cette fois en injectant des cellules cancéreuses exprimant le CD40 à leurs surfaces, tel que les B16F10, cellules provenant d'un mélanome, ou les Renca, cellules cancéreuses rénales. On s'attend à ce que la réponse anti tumorale soit plus prononcée lors de l'utilisation des cellules exprimant le CD40 vu que le CD154 est engagé directement, suite à sa liaison au CD40, et indirectement, par la stimulation des cellules du système immunitaire.

De même, pour pouvoir caractériser de plus près la réponse anti-tumorale du CD154, un autre système de co-culture pourra être mis en place. Des HEK 293 mCD154, traitées ou non avec le mAb inhibiteur du clivage, seront co-cultivées avec des cellules de souris cancéreuses exprimant le CD40, tel que les B16F10 et les Renca,

ou pas, comme les MC38. Suite à cette co-culture, une étude, par cytométrie en flux, de la mort ainsi que de la prolifération des cellules cancéreuses sera mise en place.

Suite à toutes ces études, et la bonne caractérisation de l'effet inhibiteur du mAb, le clone 8 pourra être étudié dans d'autres maladies auto-immunes, tel que le Lupus, l'AR, la SP. De plus, suite à la génération d'un mutant CD154, résistant au clivage, il serait très intéressant d'aller générer des souris Knock-in exprimant le CD154 résistant.

## Bibliographie:

1. Noelle, R.J., et al., *A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6550-4.
2. Graf, D., et al., *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(12): p. 3191-4.
3. Lederman, S., et al., *Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help)*. J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 1091-101.
4. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
5. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
6. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
7. Schönbeck U, M.F., Libby P, *CD154 (CD40 ligand)*. Int J Biochem Cell Biol., 2000. **32**(7): p. 687-93.
8. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(6): p. 1749-54.
9. Yacoub, D., et al., *CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner*. J Biol Chem, 2013. **288**(50): p. 36083-93.
10. Fabienne Pietravalle, S.L.-H., et al., *Human Native Soluble CD40L Is a Biologically Active Trimer, Processed Inside Microsomes*. The journal of biological chemistry, 1996. **271**: p. 5965–5967.
11. Gonzalo J. Mazzei, M.D.E., Christophe Losberger, Sybille Lecoanet-Henchoz, Pierre Graber, Anne Durandy, Jean-Francois Gauchat, Alain Bernard, Bernard Allet and Jean-Yves Bonnefoy, *Recombinant Soluble Trimeric CD40 Ligand Is Biologically Active*. J Biol Chem., 1995. **270**(13): p. 7025-8.
12. Karpusas, M., et al., *2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand*. Structure, 1995. **3**(12): p. 1426.

13. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 896-9.
14. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(1): p. 4-43.
15. Leveille, C., et al., *CD40 Ligand Binds to  $\alpha 5\beta 1$  Integrin and Triggers Cell Signaling*. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282**(8): p. 5143-5151.
16. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. *Circulation*, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
17. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 881-922.
18. Braesch-Andersen, S., et al., *Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40*. *J Immunol*, 1989. **142**(2): p. 562-7.
19. Baker, M.P., et al., *Prolonged phenotypic, functional, and molecular change in group I Burkitt lymphoma cells on short-term exposure to CD40 ligand*. *Blood*, 1998. **92**(8): p. 2830-43.
20. Reyes-Moreno, C., et al., *CD40/CD40 Homodimers Are Required for CD40-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Expression of B7.2 by Human B Lymphocytes*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**(9): p. 7799-7806.
21. Reyes-Moreno, C., et al., *Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(27): p. 19473-80.
22. Nadiri, A., et al., *Involvement of the cytoplasmic cysteine-238 of CD40 in its up-regulation of CD23 expression and its enhancement of TLR4-triggered responses*. *Int Immunol*, 2015.
23. Hassan, G.S., et al., *Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses*. *Curr Immunol Rev*, 2009. **5**: p. 285-299.
24. Mukundan, L., et al., *CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway*. *Cell Signal*, 2004. **16**(3): p. 375-84.
25. Dadgostar, H., et al., *Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(3): p. 1497-502.

26. Georgopoulos, N.T., et al., *A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(10): p. 1789-801.
27. Bajorath, J., et al., *Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction*. *Biochemistry*, 1995. **34**(6): p. 1833-44.
28. Bajorath, J., et al., *Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis*. *Biochemistry*, 1995. **34**(31): p. 9884-92.
29. An, H.J., et al., *Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(13): p. 11226-35.
30. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 673-87.
31. Gahmberg CG1, F.S., Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M., *Regulation of integrin activity and signalling*. *Biochim Biophys Acta.*, 2009. **1790**(6): p. 431-44.
32. Christie J. Avraamides, B.G.-S., and Judith A. Varner *Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(8): p. 604–617.
33. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W. Mourad, *CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases*. *Immunobiology*, 2011.
34. Kato, A., *The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's thrombasthenia: implications of integrin alpha IIb beta 3 for its pathogenesis*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1997. **26**(1): p. 1-23.
35. El Fakhry, Y., et al., *Functional Interaction of CD154 Protein with alpha5beta1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to alphaIIbbeta3 Integrin and CD40 Molecules*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(22): p. 18055-66.
36. Alturaihi, H., et al., *Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(2): p. 592-602.
37. Altieri DC, A.F., Plescia J, Ginsberg MH, Edgington TS, Plow EF, *A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/Cd18)*. *J Biol Chem*, 1990. **265**: p. 12119–12122.
38. Kanse SM, M.R., Preissner KT, Peter K. , *Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the beta2 integrin Mac-1 (M2, CD11b/CD18)*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**: p. 2251–2256.
39. Ross G, L.J., *Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes*. *J. Exp Med*, 1982. **155**: p. 96–110.

40. Diamond MS, S.D., Marlin SD, Springer TA., *Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation.* . Cell, 1991. **65**: p. 961–971.
41. Wolf, D., 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, 2011. **109**(11): p. 1269-79.
42. LC, S., *X-linked hyper IgM syndrome.* Clin Rev Allergy Immunol., 2000 **19**(2): p. 205-15.
43. Lougaris V1, B.R., Ferrari S, Plebani A, *Hyper immunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular, and immunological features.* Immunol Rev., 2005. **203**: p. 48-66.
44. Davies EG1, T.A., *Update on the hyper immunoglobulin M syndromes* Br J Haematol., 2010. **149**(2): p. 167-80.
45. Foy, T., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 591-617.
46. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W.M. Mourad, *CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies.* Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 165-72.
47. MacDonald, K.P.A., et al., *Functional CD40 Ligand Is Expressed by T Cells in Rheumatoid Arthritis.* J. Clin. Invest., 1997. **100**(9): p. 2404-2414.
48. Gerritse, K., et al., *CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2499-504.
49. Liu, Z., et al., *Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production.* J Immunol, 1999. **163**(7): p. 4049-57.
50. Wang, X., et al., *Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 2046-53.
51. Schaub, M., et al., *Costimulatory signal blockade in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Neuroimmunol, 1999. **96**(2): p. 158-66.
52. van Essen, D., H. Kikutani, and D. Gray, *CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function.* Nature, 1995. **378**(6557): p. 620-3.

53. Kawabe, T., et al., *The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 167-78.
54. Brenner, B., et al., *Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a signalling molecule in T-lymphocytes*. *FEBS Lett*, 1997. **417**: p. 301-6.
55. El Fakhry, Y., et al., *Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 770-9.
56. Benslimane, N., et al., *Requirement of transmembrane domain for CD154 association to lipid rafts and subsequent biological events*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43070.
57. Prasad, K.S., et al., *Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12367-71. Epub 2003 Sep 30.
58. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. *Nat Med*, 2002. **8**(3): p. 247-52.
59. Loubaki, L., et al., *Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction*. *Mol Immunol*, 2010. **47**(11-12): p. 2112-8.
60. Bussolati, B., et al., *Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis*. *Int J Cancer*, 2002. **100**(6): p. 654-61.
61. Roselli, M., et al., *Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(2): p. 610-4.
62. Mielczarek-Palacz, A., et al., *Imbalance in serum soluble CD30/CD30L and CD40/CD40L systems are associated with ovarian tumors*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(1): p. 70-4.
63. Younes, A., et al., *Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 1998. **100**(1): p. 135-41.
64. Baxendale, A.J., et al., *Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth*. *Oncogene*, 2005. **24**(53): p. 7913-23.
65. Hassan, G.S., J. Stagg, and W. Mourad, *Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy*. *Cancer Treat Rev*, 2015. **41**(5): p. 431-40.

66. Bereznaya, N.M. and V.F. Chekhun, *Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy*. Exp Oncol, 2007. **29**(1): p. 2-12.
67. Turner, J.G., et al., *Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 89-94.
68. Elgueta R1, B.M., de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev., 2009. **229**(1): p. 152-72.
69. Kennedy, M., et al., *CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 370-8.
70. Wang, Y., et al., *CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 971-83.
71. Alexandroff AB, J.A., Paterson T, Haley JL, Ross JA, Longo DL, Murphy WJ, James K, Taub DD., *Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours*. Mol Immunol. , 2000 **37**(9): p. 515-26.
72. Wierda, W.G., et al., *A phase I study of immune gene therapy for patients with CLL using a membrane-stable, humanized CD154*. Leukemia, 2010. **24**(11): p. 1893-900.
73. Liu, Y., Xia, D., Li, F., Zheng, C. and Xiang, J., *Intratumoral administration of immature dendritic cells following the adenovirus vector encoding CD40 ligand elicits significant regression of established myeloma*. Cancer Gene Ther 2005. **12**: p. 122-132.
74. Davies, C.C., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1010-9. Epub 2003 Oct 27.
75. Elmetwali, T., et al., *CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 52.
76. Karpusas, M., et al., *Structure of CD40 ligand in complex with the Fab fragment of a neutralizing humanized antibody*. Structure, 2001. **9**(4): p. 321-9.
77. Ding, L., et al., *B7/CD28-dependent and -independent induction of CD40 ligand expression*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5124-32.
78. Pham, L.V., et al., *A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 37-50.



79. Elmetwali, T., L.S. Young, and D.H. Palmer, *CD40 ligand-induced carcinoma cell death: a balance between activation of TNFR-associated factor (TRAF) 3-dependent death signals and suppression of TRAF6-dependent survival signals*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 1111-20.
80. Jundi, M., et al., *CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment*. Immunobiology, 2011.
81. Aagaard Tillery, K.M. and D.F. Jelinek, *Phosphatidylinositol 3-kinase activation in normal human B lymphocytes*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4543-54.
82. Hayward, A.R., et al., *Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 977-83.
83. Eliopoulos, A.G., et al., *CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5503-15.
84. Bugajska, U., et al., *The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(18): p. 1381-95.
85. Kikuchi, T. and R.G. Crystal, *Anti-tumor immunity induced by in vivo adenovirus vector-mediated expression of CD40 ligand in tumor cells*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(8): p. 1375-87.
86. Kikuchi, T., et al., *Tumor regression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing CD40 ligand and naive dendritic cells*. Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6391-5.
87. Hanyu, K., et al., *Immunogene therapy by adenovirus vector expressing CD40 ligand for metastatic liver cancer in rats*. Anticancer Res, 2008. **28**(5A): p. 2785-9.
88. Sorenmo, K.U., et al., *CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24167.
89. Peng Zhao , W.-J.F., Liang Chai , Jian Ruan, Yi Zhenga,Wei-Qin Jiang, Shan Lin, and Z.-L.Z. Shui-Hong Zhou, *The prognostic value of plasma soluble CD40 ligand levels in patients with nasopharyngeal carcinoma*. Clin Chim Acta. , 2015. **10.1016**: p. 447:66-70.
90. Chung HW, L.J., *Clinical significance of elevated serum soluble CD40 ligand levels as a diagnostic and prognostic tumor marker for pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Transl Med., 2014. **10.1186**: p. 1479.

91. Honn KV, T.D., Chen YQ., *Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon*. Semin Thromb Hemost., 1992. **18(4)**: p. 392-415.
92. Jeffrey Schlom, C.J., James L. Gulley and Jianping Huang, *The role of soluble CD40L in immunosuppression*. OncoImmunology, 2013. **2:1**.
93. jianping Huang<sup>1</sup>, C.J., Tara Talaie<sup>1</sup>, Austin Anderson<sup>1</sup>, Alessandra Jales<sup>1</sup>, Kwong Y. Tsang<sup>1</sup>, Ravi A. Madan<sup>2</sup>, James L. Gulley<sup>1</sup>, and Jeffrey Schlom<sup>1</sup>, *Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role*. blood 2012.
94. Iwai Y, I.M., Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002 Sep 17. **99(19)**: p. 12293-7.
95. Keir ME, B.M., Freeman GJ, Sharpe AH., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol., 2008. **10.1146**: p. 26:677-704.
96. Afreen S, D.S., *The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone*. Hematol Oncol Stem Cell Ther., 2014 Mar. **10.1016**: p. 1-17.

