

Université de Montréal

**L'homodimérisation du CD40 et son implication indirecte dans
l'asthme allergique.**

Par

Saly El SALTI

Département de Microbiologie, Infectiologie 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

Janvier, 2018

© Saly El SALTI, 2018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'homodimérisation du CD40 et son implication indirecte dans
l'asthme allergique.

Présenté par :
Saly El SALTI

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Yahye Merhi, président-rapporteur
Dr. Walid Mourad, directeur de recherche
Dre. Johanne Poudrier, membre du jury

Résumé

Le CD40, membre de la famille des récepteurs de TNFs (TNFRs), est une glycoprotéine transmembranaire de type I, exprimée à la surface des cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Son principal ligand, le CD154, appartient à la famille des TNFs (*Tumor necrosis factor*). Le CD154 trimérique non covalent sous sa forme soluble ou membranaire se lie au CD40 normalement monomérique et induit son oligomérisation ainsi que son homodimérisation. Actuellement, il est bien connu que le CD154 se lie à trois autres récepteurs qui appartiennent à la famille des intégrines : le α IIb β 3, le α 5 β 1, et le α M β 2 (Mac-1).

L'interaction CD40/CD154 joue un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire. D'autre part, des études ont montré que ce couple est surexprimé et cette interaction est amplifiée dans les maladies inflammatoires et auto-immunes, telle que l'asthme allergique. Plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique du blocage de cette liaison, dans divers maladies. Actuellement, le blocage de cet axe est une stratégie ciblée afin d'élaborer de nouvelles immunothérapies. Cependant, il s'est avéré comme ayant plusieurs effets secondaires. C'est pourquoi nous avons pensé à l'homodimérisation du CD40, afin d'étudier les effets de son inhibition. Notre équipe a déjà démontré que la cystéine 238 (Cys²³⁸) de la partie intracellulaire du CD40 est responsable de la formation du pont disulfure (db) et ainsi la formation du CD40 homodimérique. De plus, l'utilisation de l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) inhibe cette homodimérisation. Donc les ROS (*reactive oxygen species*) pourraient être impliqués dans la formation des CD40 homodimères. Il est important de noter que la source majeure intracellulaire des ROS est la NADPH Oxydase (NOX).

D'où découle notre hypothèse que l'homodimérisation du CD40 nécessite des signaux spécifiques impliqués dans la production des ROS, et cette homodimérisation pourrait être impliquée dans le développement de maladies inflammatoires ou auto-immunes, telle que l'asthme. Afin de confirmer notre hypothèse nos objectifs sont : 1) Déterminer les voies de signalisations requises pour la formation du CD40 homodimère. 2) Déterminer si le CD40 est le seul récepteur impliqué dans le développement de l'asthme. En effet, nous avons généré un modèle murin d'asthme allergique sensibilisé à l'ovalbumine.

Au cours de ce projet, nos résultats ont démontré l'implication des ROS et des NOX dans la formation des db-CD40 homodimères. En effet, les NOX produisent les ROS qui à leur tour oxydent la Cys²³⁸. Par ailleurs, dans cette étude, nous avons montré que le blocage de la liaison CD40/CD154 par les anticorps anti-CD154 (MR1) ou anti-CD40 (FGK) atténue l'asthme chez les souris immunisées à l'ovalbumine. En effet, suite à l'administration intratrachéale de ces anticorps, l'influx cellulaire est inhibée, l'AHR (*airway hyperresponsiveness*) induite par la méthacholine est atténuée, et les niveaux d'IgE dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) sont fortement diminués.

Mots-clés : CD154, CD40, ROS, NOX, db-CD40 homodimère, asthme.

Abstract

The CD40 is a member of the TNF receptor family. It is a type I transmembrane glycoprotein, expressed on the surface of hematopoietic and non-hematopoietic cells. Its main ligand, the CD154, belongs to the Tumor necrosis factors (TNFs) superfamily. The trimeric soluble or membrane CD154 binds to the monomeric CD40 and induces its oligomerization as well as its homodimerization. It is well known that CD154 binds to three other receptors belonging to the family of integrins: α IIb β 3, α 5 β 1, and α M β 2 (Mac-1).

The interaction of CD40/CD154 plays a key role in the regulation of the immune response. On the other hand, studies have shown that this couple is overexpressed and this interaction is amplified in inflammatory and autoimmune diseases, such as allergic asthma. In addition, several studies have demonstrated the beneficial effect of blocking the binding of CD40 to its major ligand CD154, in various diseases. Currently, blocking this axis is a targeted strategy to develop new immunotherapies, however, it has several side effects. That's why we have focused on the homodimerization of CD40, in order to study the effects of its inhibition. Our group has already demonstrated that cysteine 238 (Cys²³⁸) from the intracellular domain of the CD40 mediates the formation of disulfide bond CD40 homodimer (db-CD40). Furthermore, the use of the antioxidant NAC inhibits this homodimerization. Thus, the ROS could be involved in the formation of CD40 homodimers. Moreover, it's important to note that NADPH Oxidase (NOX) is the major intracellular source of ROS.

So, we hypothesize that the homodimerization of CD40 requires specific signals involved in the production of ROS, and this homodimerization could lead to the development of diseases such as allergic asthma. In order to confirm it, our objectives are to: 1) Determine the signaling pathways required for the formation of the CD40 homodimer. 2) Determine if CD40 is the only receptor involved in the development of allergic asthma. Indeed, we have generated an allergic mice model, sensitized to ovalbumine.

In this project, our results have demonstrated the involvement of ROS and NOX in the formation of db-CD40 homodimer. Indeed, NOX produces ROS that oxidize Cys²³⁸. Moreover, we have shown that blocking the interaction CD40/CD154 attenuates asthma in ovalbumin-sensitized mice. In fact, intratracheal administration of MR-1 (anti-CD154) or FGK (anti-CD40) antibodies significantly decrease cellular influx to the airways, and attenuated the development of Methacholine induced AHR. In addition, treatment with either MR-1 or FGK locally abrogated IgE class switching.

Keywords: CD154, CD40, ROS, NOX, db-CD40 homodimer, asthma.

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Résumé | i |
| Abstract | ii |
| Table des matières | iii |
| Liste des tableaux | vi |
| Liste des figures | vii |
| Liste des abréviations | ix |
| | xi |
| Remerciements | xii |
| Chapitre 1 : Introduction | 1 |
| 1. <u>Le CD40</u> | 2 |
| 2. <u>Les ligands du CD40</u> | 3 |
| 2.1. Le CD154 ou CD40L..... | 3 |
| 2.2. La protéine de liaison C4b (C4BP)..... | 6 |
| 2.3. La protéine de choc thermique (HSP70)..... | 6 |
| 3. <u>L'interaction CD40/CD154</u> | 7 |
| 3.1. Les TNFR associated factors (TRAFs)..... | 7 |
| 3.2. Les Janus tyrosine Kinases (JAKs)..... | 8 |
| 3.3. L'homodimérisation du CD40. | 11 |
| 3.3.1. L'homodimérisation et la translocation des récepteurs. | 11 |
| 3.3.2. NOX : source majeur des ROS. | 14 |
| 3.4. Rôle Biologique de l'interaction CD40/CD154..... | 18 |
| 3.4.1. Immunité inné et adaptative..... | 18 |
| 3.4.2. La mort cellulaire..... | 19 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4. | <u>Implication du CD40/CD154 dans différentes pathologies.</u> | 20 |
| 4.1. | Maladies auto-immunes. | 20 |
| 4.1.1. | L'arthrite rhumatoïde. | 22 |
| 4.1.2. | Le lupus érythémateux disséminé. | 23 |
| 4.1.3. | La sclérose en plaque. | 23 |
| 4.2. | L'athérosclérose. | 26 |
| 4.3. | L'asthme allergique. | 26 |
| 4.3.1. | Définition. | 26 |
| 4.3.2. | L'interaction CD40/CD154 dans l'asthme. | 32 |
| 5. | <u>CD40/CD154 vers une cible thérapeutique.</u> | 35 |
| | Chapitre 2 : Rationnel et Hypothèse | 37 |
| | Chapitre 3: Matériels et Méthodes | 39 |
| 1. | <u>Les lignées cellulaires :</u> | 39 |
| 2. | <u>Anticorps et Réactifs :</u> | 39 |
| 3. | <u>La transfection des cellules A20 :</u> | 40 |
| 4. | <u>La cytométrie en flux (FACS) :</u> | 40 |
| 5. | <u>Induction de la formation du CD40 homodimère :</u> | 41 |
| 6. | <u>Séparation du CD40h soluble et CD40h insoluble :</u> | 41 |
| 7. | <u>Le traitement avec le diphenyleneiodonium (DPI) :</u> | 42 |
| 8. | <u>La mesure de la production des ROS :</u> | 42 |
| 9. | <u>L'étude de la phosphorylation de p38 :</u> | 42 |
| 10. | <u>Le modèle murin C57BL/6 sensibilisé à l'ovalbumine :</u> | 43 |
| 10.1. | Analyse histologique des tissus pulmonaires. | 43 |
| 10.2. | Mesure des niveaux d'IgE par ELISA. | 43 |
| 10.3. | Hyperréactivité des voies aériennes à la méthacholine. | 44 |

| | |
|---|----|
| Chapitre 4: Résultats | 45 |
| 1. <u>Les ROS et les NOX dans l'homodimérisation du CD40</u> | 45 |
| 1.1. ROS induisent l'homodimérisation du CD40..... | 45 |
| 1.2. L'homodimérisation du CD40 et la production des ROS..... | 46 |
| 1.3. L'homodimérisation du CD40 est NOX-dépendante. | 46 |
| 2. <u>L'interaction du CD40/CD154 dans l'asthme</u> | 47 |
| 2.1. Le knockout du CD40 inhibe l'infiltration cellulaire au niveau des poumons du modèle murin allergique..... | 47 |
| 2.2. Le knockout du CD40 inhibe la production d'IgE chez les souris allergiques suite à une commutation de classe altérée. | 48 |
| 2.3. MR-1 (anti-CD154) ou FGK (anti-CD40) sont spécifiques au blocage de l'interaction CD40/CD154. | 48 |
| 2.4. MR-1 ou FGK inhibent l'influx cellulaire chez les souris allergiques. | 50 |
| 2.5. MR-1 ou FGK inhibent la production d'IgE au niveau des poumons. | 50 |
| 2.6. MR-1 ou FGK atténuent l'AHR à la Méthacholine..... | 50 |
| Chapitre 5: Discussion | 64 |
| Chapitre 6 : Conclusion et Perspectives | 69 |
| Bibliographie | 71 |

Liste des tableaux.

Chapitre 1 : Introduction.

Tableau 1 : L'implication de CD40/CD154 dans les maladies auto-immunes. 25

Tableau 2: Le rôle des molécules co-stimulatrices dans les maladies allergiques et l'asthme.
..... 28

Liste des figures.

Chapitre 1 : Introduction.

| | |
|---|----|
| Figure 1 : La structure du CD40h. | 3 |
| Figure 2 : L'interaction du CD154 soluble avec ses récepteurs.. | 5 |
| Figure 3 : La signalisation via CD40, dépendante et indépendante des TRAFs. | 10 |
| Figure 4 : La translocation et l'homodimérisation du CD40 suite à sa liaison avec le CD154. | 13 |
| Figure 5 : La NADPH oxydase et ses différents inhibiteurs..... | 17 |
| Figure 6 : Les fonctions biologiques de l'interaction CD40/CD154. | 19 |
| Figure 7 : Les interactions cellulaires sont importantes dans les réactions allergiques..... | 31 |

Chapitre 4 : Résultats.

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Niveau d'expression du CD40h à la surface des cellules A20 transfectées..... | 52 |
| Figure 2 : Les ROS induisent la formation du CD40 homodimère. | 53 |
| Figure 3: La production des ROS suite à la stimulation de l'homodimérisation du CD40. | 54 |
| Figure 4 : Le DPI inhibe la formation du CD40 homodimère au niveau des cellules BJAB mais pas au niveau des A20. | 55 |
| Figure 5 : Le knockout du CD40 inhibe l'infiltration cellulaire dans les poumons des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine. | 56 |
| Figure 6 : Le knockout du CD40 inhibe la commutation de classe isotypique vers l'IgE, et ainsi absence d'IgE dans le sérum et dans le BAL. | 57 |
| Figure 7 : Niveau d'expression du CD40m et de l' $\alpha 5\beta 1$ m à la surface des cellules WEHI-231 et WEHI. | 58 |
| Figure 8 : MR-1 (anti-CD154) ou FGK (anti-CD40) bloquent la liaison CD40/CD154. | 59 |
| Figure 9 : L'inhibition de la phosphorylation de p38 MAPK par l'anti-CD154 (MR1) et l'anti-CD40 (FGK). | 60 |
| Figure 10 : MR-1 ou FGK inhibent l'infiltration cellulaire dans les poumons des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine. | 61 |

Figure 11 : MR-1 ou FGK inhibent la production d'IgE dans les poumons des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine. 62

Figure 12 : L'hyperréactivité bronchique (AHR) des différentes C57BL/6 à la méthacholine. 63

Chapitre 5 : Discussion.

Figure 1: L'homologie entre les séquences peptidiques du CD40 humain (CD40h) et du CD40 murin (CD40m). 67

Liste des abréviations

TNFR: Tumor necrosis factor receptor.

TNF: Tumor necrosis factor.

db-CD40: disulfide bond CD40 homodimer.

NAC: N-acétylcystéine.

ROS: Reactive oxygen species.

NOX: NADPH Oxidase.

Cys²³⁸: Cystéine à la position 238.

AHR: airway hyperresponsiveness.

BAL: Bronchoalveolar lavage.

GM-CSF: Granulocyte-monocyte colony stimulating factor.

IL: Interleukine.

IFN: Interféron.

CPA: Cellule présentatrice d'antigène.

TRAF: TNFR Associated Factor.

JAK: Janus tyrosine kinase.

CD40h: CD40 humain.

CD40m: CD40 murin.

CD154h: CD154 humain.

CD40L: CD40 ligand.

sCD154: soluble CD154.

M113: Méthionine à la position 113.

ERK: Extracellular signal-regulated mitogen activated protein kinase.

C4BP: C4b Binding Protein.

HSP70: Heat Shock Protein 70.

MIP: macrophage inflammatory protein.

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase.

JNK: c-jun amino-terminal kinase.

STAT: signal transducer and activator of transcription.

ICAM: Molécule d'adhésion intracellulaire.

LT- α : lymphotoxin- α .

RLs: Radeaux lipidiques.

Ig: Immunoglobuline.

Th: T helper.

MAPK: Mitogen-activated protein kinase.

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

PKC: Protein kinase C.

NK: Natural Killer.

KO: Knockout.

MCP: protéine chimio attractive monocytaire.

siRNA: small interfering RNA.

VCAM: Molécule d'adhésion vasculaire.

Treg: T régulatrice.

Ags: Antigènes.

Acs: Anticorps.

MAiS: Maladies auto-immunes systémiques.

AR: Arthrite Rhumatoïde.

SP: Sclérose en plaque.

SLE: Systemic lupus erythematosus.

MMP: métalloprotéinases.

DPI: diphenyleneiodonium.



JE DEDIE CE MEMOIRE A CEUX QUI M'ONT DEDIE LEUR

VIE.

MON PERE, ABDOL SATTAR,

ET MA MERE,

KHALDIEH



Remerciements

C'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui ont cru en moi et qui ont conduit à l'élaboration de ce projet ainsi qu'à l'écriture de ce mémoire...

*Au **Dr Walid Mourad**, pour m'avoir gentiment accueillie au sein de votre laboratoire. Je vous remercie pour votre sympathie, pour votre exigence, pour votre patience, pour le partage de vos expériences et pour vos encouragements. Un grand merci pour vos précieux conseils au cours de ces deux dernières années.*

*Aux membres du jury, **Dr Yahye Merhi** et **Dre Johanne Poudrier**, pour votre temps et votre attention. Merci d'avoir accepté d'en faire part.*

*Aux membres du laboratoire, pour vos compétences, votre disponibilité et amitié. Merci **Meriem** et **Loubna**, vous rendez le cadre de travail particulièrement agréable !
Au **Dr Bruce Mazer** et **Amir Massoud**, pour votre collaboration.*

*A **Clémence**, pour m'avoir aidé et encouragé, et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin. Merci pour nos fous-rires et tous les bons moments passés et à venir !*

*A mes sœurs d'amours... A **Suzanne**, pour tout ce que tu fais pour moi, sans toi je n'aurais certainement pas réussi à aller au bout. Je vais me contenter d'un grand merci ! A **Souhair**, pour ta présence malgré la distance qui nous sépare. Merci à toi et à bébé **Ziad** d'avoir été ma source d'énergie.*

*A mes parents, **Abdul Sattar** et **Khaldieh**, malgré les milliers de Km qui nous séparent, vos sacrifices, votre soutien constant, et vos conseils quotidien m'ont permis de franchir tous les obstacles. Vraiment aucun remerciement ne saurait exprimer mon amour... Je vous aime !*

Chapitre 1 : Introduction.

Notre organisme développe une réponse immunitaire afin de se défendre contre tout corps qui le reconnaît comme étant étranger. Tout d'abord, une réponse innée, rapide, va avoir lieu, c'est notre première ligne de défense. Ensuite, une réponse immunitaire adaptative, plus spécifique se développe, qu'elle soit la réponse humorale caractérisée par la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B, ou la réponse cellulaire caractérisée par l'interaction entre les lymphocytes T et les lymphocytes B. En effet, le développement des cellules B se fait dans la moelle osseuse, et ensuite les lymphocytes B naïfs exprimant les immunoglobulines de membranes (BCR) vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires au niveau desquels ils rencontrent l'antigène spécifique qui induira l'hypermutation somatique et la commutation de classe des immunoglobulines. Ainsi, les cellules B seront activées et se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoires. En effet, lors d'une réponse T-dépendante, la commutation de classe dépend de la présence de l'antigène et des cytokines et des interactions membranaires entre les lymphocytes B et T. En particulier, cette commutation dépend de l'activation du BCR et du CD40, cependant, elle peut aussi être induite par activation du CD40 en absence d'antigène. D'autre part, le récepteur CD40 et son ligand CD154 jouent un rôle très important dans la régulation d'une réponse immunitaire normale. De plus, cette liaison CD40/CD154 est impliquée dans le développement et le maintien de diverses maladies auto-immunes et inflammatoires, telle que l'asthme allergique.

1. Le CD40.

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I ayant un poids moléculaire de 45-50 KDa. Elle a été découverte en 1985, en premier lieu au niveau des lymphocytes B et des cellules cancérogènes de la vessie [1]. Actuellement, il est bien documenté que le CD40, s'exprime sur une panoplie de cellules hématopoïétiques (lymphocytes B, monocytes, cellules dendritiques, plaquettes, basophiles, éosinophiles) et non hématopoïétiques (cellules épithéliales et endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes, keratinocytes, ostéoblastes, neurones, cellules pancréatiques) [2-7]. De plus, plusieurs cytokines telles que le granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF), les interleukines 1 et 3 (IL-1 et IL-3), l'interféron- γ (IFN- γ) et le tumor necrosis factor- α (TNF- α) induisent son expression dans différents types cellulaires [2, 8].

Cette glycoprotéine fait partie de la famille de tumor necrosis factor receptor (TNFR). Généralement, les TNFRs sont des protéines transmembranaires glycophosphorylées de type I impliqués dans la survie, la prolifération, ou l'apoptose. De plus, durant la réponse immunitaire ils interviennent dans l'expression des molécules d'adhésion et dans la sécrétion de cytokines [9]. Par ailleurs, ces récepteurs présentent une homologie de 30% dans leur région extracellulaire, riche en cystéines [10]. C'est pour cette raison que leur fonction dépend de leur région cytoplasmique qui diffère d'un récepteur à l'autre. Par exemple les récepteurs tel que le CD40 nécessitent l'intervention des TNFRs associated factors (TRAFs) pour induire des réponses inflammatoires [9, 11]. Les ligands des TNFRs, les tumor necrosis factors (TNFs), sont des protéines transmembranaires de type II ou des protéines solubles [12, 13].

Le CD40 humain (CD40h) est composé de 277 acides aminés regroupés en une partie extracellulaire de 193 acides aminés, une partie transmembranaire de 22 acides aminés, et une partie intracellulaire de 62 acides aminés. Il est codé par un gène, formé de 9 exons et de 8 introns, localisé sur le chromosome 20 entre la région q12 et q13.2 [2, 3].

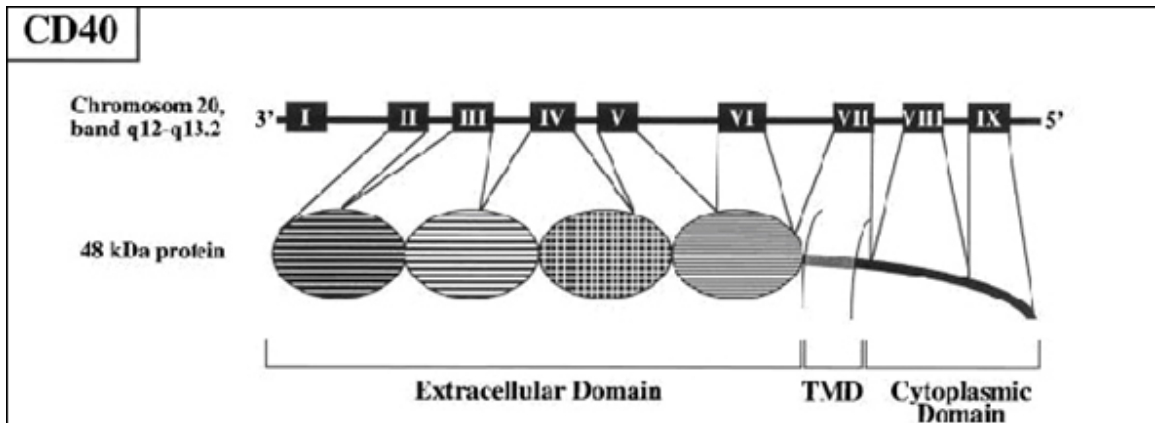


Figure 1 : La structure du CD40h. Le CD40h est codé par un gène localisé sur le chromosome 20. Ce gène est composé de 9 exons dont : 2, 3, 4, 5, et 6 constituent la partie extracellulaire, l'exon 7 constitue le domaine transmembranaire, et les exons 8 et 9 constituent la partie intracellulaire (U.Schonbeck et al, 2001) [3].

Le CD40 murin (CD40m) est codé par un gène localisé sur le chromosome 2, et composé de 305 acides aminés, regroupés en 193 acides aminés extracellulaires, 22 acides aminés transmembranaires, et 90 acides aminés intracellulaires. Le CD40m est homologue à 62% avec le CD40h. En effet, les deux molécules possèdent 22 cystéines extracellulaires qui sont nécessaires pour le repliement de la molécule en formant des ponts disulfures. Les deux parties IC sont quant à elles homologues à 78% [2, 14].

2. Les ligands du CD40.

2.1. Le CD154 ou CD40L.

Le CD154 ou CD40 ligand (CD40L) est le principal ligand du CD40 [2]. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 33-39 KDa, appartenant à la famille des TNFs [12]. Il présente 20% d'homologie dans la partie extracellulaire avec les autres membres de cette famille [15]. Il est formé de 261 acides aminés regroupés en une partie extracellulaire de 215 acides aminés, une partie transmembranaire de 22 acides aminés, et une partie intracellulaire de 22 acides aminés. Son gène codant se localise

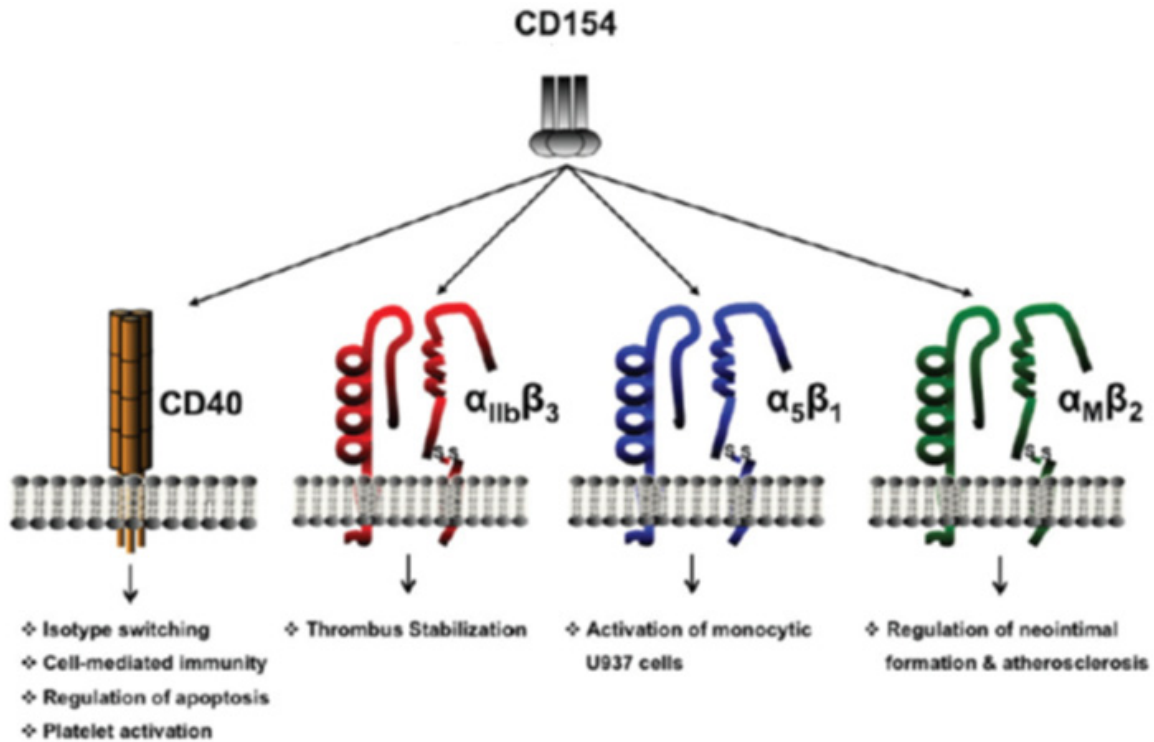
sur le chromosome X au niveau de la région q26.3 et q27.1, et est composé de 5 exons et 4 introns. En comparant le CD154 humain au CD154 murin on retrouve 78% d'homologie [2].

Outre sa forme membranaire, le CD154 se trouve sous une forme soluble (sCD154) qui résulte d'un clivage enzymatique de la molécule membranaire, par des métalloprotéinases matricielles, entre l'acide glutamique 112 (E112) et la méthionine 113 (M113), générant ainsi un fragment de 18 KDa (M113-L261) [16-18]. Les deux formes du CD154, soluble et membranaire, s'assemblent pour former des homotrimères non covalents (c.à.d. n'impliquant pas de ponts disulfures). Cette trimérisation est médiée par 2 Tyrosines, 2 Histidines et 1 Leucine [19], et est primordiale pour son activité biologique, favorisant l'homotrimérisation du récepteur et initiant ainsi le signal intracellulaire [11, 20].

Le CD154 a été initialement découvert au niveau des lymphocytes T CD4⁺ activées, mais il a été démontré depuis qu'il est aussi exprimé au niveau des plaquettes, monocytes, cellules dendritiques, basophiles et éosinophiles [3]. Cependant, il peut également être exprimé à la surface des fibroblastes pulmonaires, des cellules épithéliales, et des cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses en cas de pathologie [4, 21].

Le CD40 était initialement considéré comme le seul récepteur du CD154 [22], mais des études récentes ont démontré l'existence de trois autres récepteurs du CD154, appartenant à la famille des intégrines: le α IIB β 3, le α 5 β 1, et le α M β 2 (Mac-1) [23-26]. L'expression de α IIB β 3 est exclusive au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes [27], et son interaction, sous sa forme active ou inactive, avec le CD154 est nécessaire pour la stabilité du thrombus artériel [24]. L'intégrine α 5 β 1 est présente sur les leucocytes, les cellules épithéliales et endothéliales [27]. Sa liaison, sous sa forme inactivée, avec le CD154 induit l'activation de la voie ERK (*extracellular signal regulated kinase*) et augmente l'expression de IL-8 [25]. D'autre part, l'interaction du CD154 avec la forme activée du MAC-1 induit l'adhésion et la migration de cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, sur

lesquels cette intégrine est exprimée. Ce processus est notamment important dans le



développement de l'inflammation dans l'athérosclérose [26].

Figure 2 : L'interaction du CD154 soluble avec ses récepteurs. Outre son interaction avec le CD40, le CD154 se lie à la forme active ou inactive de $\alpha_{IIb}\beta_3$; à la forme inactivée de $\alpha_5\beta_1$; et à la forme active de $\alpha_M\beta_2$ (G.S.Hassan et al, 2013) [28].

Il est important de noter que différents résidus sont impliqués dans l'interaction du CD154 avec ses quatre récepteurs. Ainsi, le CD154 pourrait interagir simultanément avec deux différents récepteurs en même temps dans le cas de leur expression concomitante sur le même type cellulaire [29]. En effet, la liaison entre CD154 et CD40 repose principalement sur les résidus Y145 et R203 [30]. Ces mêmes résidus sont impliqués dans son interaction avec l' $\alpha_M\beta_2$ [30]. Cependant, le CD154 se lie à l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ par le résidu D117 [31], et à l' $\alpha_5\beta_1$ par les résidus N151 et Q166 [30]. Donc, le CD154 n'a pas la capacité de se lier simultanément au CD40 et à l' $\alpha_M\beta_2$. Par contre, il est fort probable qu'il puisse interagir en même temps avec l' $\alpha_M\beta_2$ et l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou avec l' $\alpha_M\beta_2$ et l' $\alpha_5\beta_1$ [30].

2.2. La protéine de liaison C4b (C4BP).

Le système du complément fait partie de l'immunité innée. En effet, le complément stimule l'inflammation et l'opsonisation, forme le complexe d'attaque membranaire afin de lyser les cellules pathogènes, et recrute les lymphocytes B et les macrophages afin de phagocyter les pathogènes. Il existe trois voies qui activent ce système : la voie classique, la voie alterne, et la voie des lectines liant les résidus mannose des membranes bactériennes.

Le foie est un site majeur de synthèse de la C4BP [32]. Cette protéine est surtout produite par les hépatocytes mais elle peut être synthétisée par les monocytes activés. Elle existe sous les deux formes, soluble et membranaire [33]. Des études ont démontré que la protéine C4B (C4BP), un inhibiteur de la C3 convertase de la voie classique et de la voie des lectines [34, 35], peut agir comme ligand du CD40 avec le potentiel d'activer les lymphocytes B [36]. D'autre part, une étude a démontré que cette protéine forme des complexes stables avec le sCD154, et malgré la liaison du CD40, elle inhibe complètement l'apoptose, induite par CD40, des cholangiocytes qui sont les cellules épithéliales de la voie biliaire [33].

2.3. La protéine de choc thermique (HSP70).

La protéine de choc thermique 70 (HSP70) fait partie d'une famille de chaperons moléculaires ayant un rôle primordial pour la synthèse, le repliement et la translocation des protéines [37, 38]. La HSP70 dérivée de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb HSP70) est bien caractérisée et fonctionne comme un adjuvant dans la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte [39-41]. Il a été découvert que Mtb HSP70 stimule les PBMC à produire les chimiokines tel que les RANTES et les macrophage inflammatory protein-1 α et 1 β (MIP-1 α et MIP-1 β) [42]. De plus, la HSP70 microbienne s'associe au CD40, afin de stimuler la sécrétion des chimiokines. En effet, cette liaison stimule la lignée cellulaire dérivée des monocytes humains (THP1), la lignée cellulaire myélo-monocytaire activée (KG1), la lignée cellulaire épithéliales (HEK 293) transfectée par CD40, les monocytes sanguins et les PBMC à produire les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β .

3. L'interaction CD40/CD154.

Le CD40 ne possède pas de domaine kinase au niveau de sa partie intracellulaire. Ainsi, suite à la liaison du CD154 à son récepteur CD40, la partie intracellulaire du CD40 recrute des protéines adaptatrices telles que les TNFR associated factors (TRAFs) et les Janus tyrosine Kinases (JAKs) afin de transmettre le signal à l'intérieur de la cellule.

3.1. Les TNFR associated factors (TRAFs).

La famille des TRAFs est composée de six membres (TRAF 1, 2, 3, 4, 5 et 6) ayant des structures similaires constituées de quatre régions : un domaine N-terminal et un domaine C-terminal importants pour l'interaction avec les récepteurs, un domaine Zing finger nécessaire pour l'association avec les protéines kinases et les facteurs de transcriptions, et un domaine RING riche en cystéines et primordial pour l'activation des voies de signalisation [43-45]. Une autre protéine, leTRAF7, a été récemment découverte. Elle a une structure similaire aux TRAFs par les deux domaines RING et Zing finger, tandis qu'elle diffère de cette famille par la région C-terminal composée de sept répétitions du domaine WD40, formé de tryptophane (W) et d'acide aspartique (D), et nécessaire pour l'association avec MEKK3 (MAP/ERK kinase kinase 3) qui induit l'activation d'AP-1 et de CHOP (C/EBP-homologous protein) [46-48].

Le CD40 s'associe avec cinq membres de cette famille (TRAF 1, 2, 3, 5, 6), TRAF2 ayant la plus grande affinité et TRAF6 la plus faible [49]. TRAF1 se lie d'une manière directe ou indirecte, via le TRAF2, au CD40 afin de bloquer la dégradation du TRAF2 dans les lymphocytes B [50]. Le TRAF2 a un rôle important dans divers voies de signalisation, pour la prolifération des lymphocytes B, et la dégradation du TRAF 3 [51]. Le TRAF3 est nécessaire pour la production de Reactive Oxygen Species (ROS), et est un régulateur négatif. En effet, il agit comme un inhibiteur du TRAF2 puisqu'il s'associe directement au CD40 par le même site de liaison que celui du TRAF2. De plus, TRAF3 possède un autre site de liaison au CD40 [52]. Concernant le TRAF5, ce dernier s'associe d'une manière indirecte, via le TRAF3, au CD40 [51]. Cependant, le TRAF6 peut se lier directement ou indirectement, par le TRAF2, au CD40 [53].

Le recrutement des TRAFs par le CD40, lié à son ligand, active les protéines tyrosine kinases et les protéines sérine/thréonine kinases. Les protéines kinases phosphorylées vont activer à leur tour les divers facteurs de transcriptions. En effet, suite à la liaison du TRAF2 ou du TRAF6 au CD40 il y aura une activation du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui va activer l'Akt, menant à un signal de survie des cellules [51]. De même, suite à ces liaisons il y aura une activation de l'extracellular signal regulated mitogen activated protein kinase (ERK) [51]. De plus, la liaison TRAF2/CD40 active c-jun amino-terminal kinase (JNK) qui est inhibé par le TRAF3 [51]. Cependant, le TRAF3 peut induire la phosphorylation du JNK au cas où il y a une augmentation du recrutement de ce dernier au CD40, et en plus il peut activer le facteur de transcription NFκB [54, 55]. Les deux types de NFκB (1 et 2) sont activés suite à l'engagement des TRAF1 et TRAF2 [50]. De même, le TRAF5 peut activer ces deux types [56]. L'association du TRAF2 seul induit l'activation du NFκB2 [55]. Cependant, il y a une inhibition de l'activation du NFκB au cas où il y a plus de TRAF1 que de TRAF2 [57].

3.2. Les Janus tyrosine Kinases (JAKs).

Cette famille est composée de quatre membres (JAK1, 2, 3, et TYK2) ayant une structure constituée de sept JAK homology region (JH1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7). JH1 est formé du domaine kinase, JH2 est le régulateur de l'activité kinase, JH3 et JH4 sont composés de SH-2-like domaine, et enfin JH6 et JH7 qui sont nécessaires pour l'interaction avec les récepteurs [58]. Concernant leur expression, JAK 1, 2 et TYK2 sont exprimés partout dans l'organisme alors que celle de JAK3 est limitée aux cellules hématopoïétiques [58].

Les voies de signalisation impliquant les JAKs sont indépendantes des TRAFs [51]. Ainsi, le CD40 se lie par son résidu proline (P227) au JAK3, qui à son tour induit la phosphorylation des *signal transducer and activator of transcription* (STATs), menant à un signal de survie, de prolifération, de développement ou de différenciation des cellules [58, 59]. La famille de STATs est constituée de six membres (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, et 6) dont le rôle est l'activation des facteurs de transcription ou la liaison directe avec l'ADN [60].

L'engagement du CD40 par le JAK3, induit la phosphorylation de cette protéine adaptatrice, menant ainsi à l'activation du STAT3 et régulant ainsi le CD23, l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), et la lymphotoxin- α (LT- α) au niveau des lymphocytes B [29]. Par exemple, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 est dépendante de l'interaction de la partie intracellulaire du CD40 avec JAK3, menant à l'activation de NF- κ B [61].

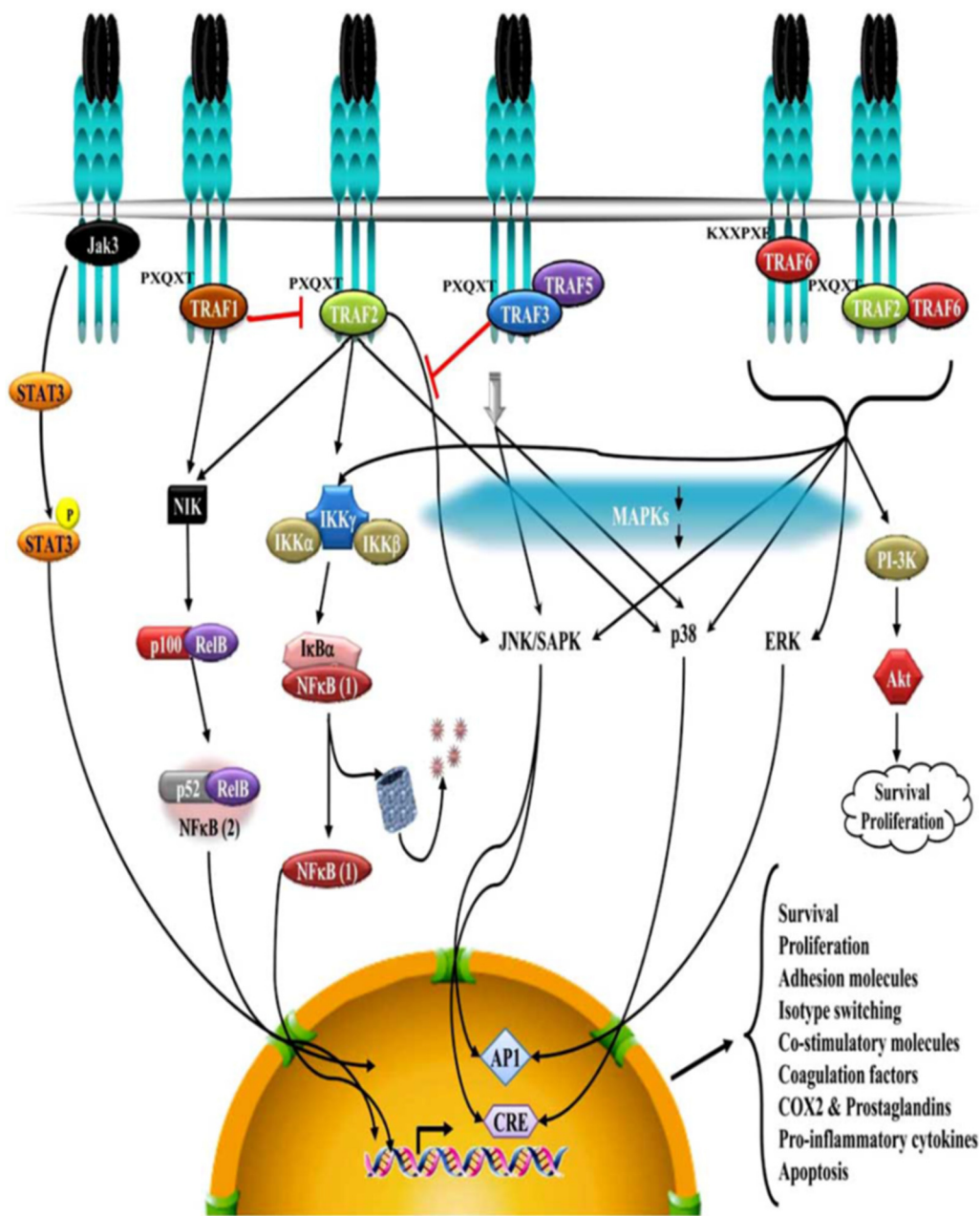


Figure 3 : La signalisation via CD40, dépendante et indépendante des TRAFs. Cette figure résume les différentes voies de signalisation activées suite à l'association des protéines adaptatrices avec le CD40 lié au CD154 (G.S.Hassan et al,2009) [29].

3.3. L'homodimérisation du CD40.

Comme toutes les interactions ligand/récepteur, la liaison des TNFs, sous forme trimérique, à leur récepteur TNFRs, induit l'oligomérisation de ces derniers [9, 49, 62]. Ainsi, le CD154 trimérique, soluble ou membranaire, se lie au CD40 normalement monomérique, et induit son oligomérisation. Suite à cette liaison, il y aura une translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques (Fig.5). Les radeaux lipidiques (RLs) sont des micros domaines de la membrane cytoplasmique riches en cholestérol et en sphingolipides, résistants aux détergents. Ils agissent comme des plateformes pour l'initiation et la régulation de la transduction du signal dans divers types cellulaires [63, 64]. Par exemple, la translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques est requise pour la production de l'ARNm de l'interleukine-1 α/β (IL-1 α/β) et de l'IL-1Ra [65]. D'autre part, au niveau des cellules B, la localisation du CD40 dans les RLs est nécessaire pour la formation du CD40 homodimère [66] qui est primordiale pour l'activation de certaines voies de signalisation [67].

3.3.1. L'homodimérisation et la translocation des récepteurs.

Le CD40 sous forme homodimérique a été découvert pour la première fois en 1989 par S Braesch-Andersen et al, dans des cellules B normales et dans une lignée lymphoblastique humaine (Raji) [68]. Cette forme homodimérique n'est pas détectée sur un gel de polyacrylamide dans des conditions réductrices, ce qui suggère fortement que ce homodimère est lié par des ponts-disulfures. Quelques années plus tard, une étude de Matthew P Baker et al, a démontré que la stimulation des cellules B par le CD154 trimérique induit l'homodimérisation du CD40 et par conséquent la survie des cellules suite à l'induction du Bcl-2 [69]. Cependant, la nature et le rôle biologique de cette homodimérisation reste à déterminer. Ce n'est qu'en 2004 que notre laboratoire s'est penché sur cette question. Nous avons confirmé que le CD40 homodimère est médié par un pont disulfure, et cette homodimérisation est nécessaire pour la phosphorylation du PI-3K et ainsi l'activation de l'Akt [67]. En effet, son induction est inhibée par un prétraitement avec l'iodoacétamide (IA), un agent thiol-alkylant [67]. De plus, ce prétraitement inhibe l'expression de la molécule co-stimulatrice B7.2 [67].

Autrement dit, l'homodimérisation est primordiale pour l'activation de la PI-3K, qui induit l'expression de B7.2 (CD86). Nous avons aussi démontré que l'homodimérisation est totalement indépendante des TRAF 1/2/3/5 qui se lient avec la thréonine à la position 254 du CD40. D'autre part, nous avons montré que la substitution de la cystéine 6 extracellulaire du CD40 (CD40-C6Q) inhibe l'homodimérisation [61]. De même, la substitution de la cystéine 17 extracellulaire du CD40 (CD40-C17A) empêche la formation d'homodimères [66]. Ces deux mutations bloquent également la translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques [66]. Ainsi, il existe un pont intramoléculaire entre Cys6 et Cys17 ayant un rôle important dans la translocation ainsi que dans l'homodimérisation du CD40 [66]. Nous avons démontré que l'homodimérisation du CD40 se fait dans les RLs, et qu'un traitement avec un agent perturbateur de l'intégrité des RLs, le méthyl-bêta-cyclodextrin (M β CD), bloque la formation des homodimères [66].

Afin de savoir quels résidus du CD40 sont impliqués dans l'homodimérisation, nous avons tronqué la partie cytoplasmique du CD40 (CD40- Δ), et par conséquent nous avons bloqué cette homodimérisation [66]. Par la suite, comme la formation d'un pont disulfure requiert la présence de cystéine, nous avons ciblé la seule cystéine de la partie intracellulaire du CD40, localisée à la position 238 (Cys²³⁸). Ainsi, nous avons généré le mutant CD40-C238A, qui migre vers les RLs mais qui ne forme pas d'homodimère [66]. En conclusion, la formation du CD40 homodimère résulte d'un pont disulfure (db-CD40 homodimère) qui se forme entre deux Cys²³⁸.

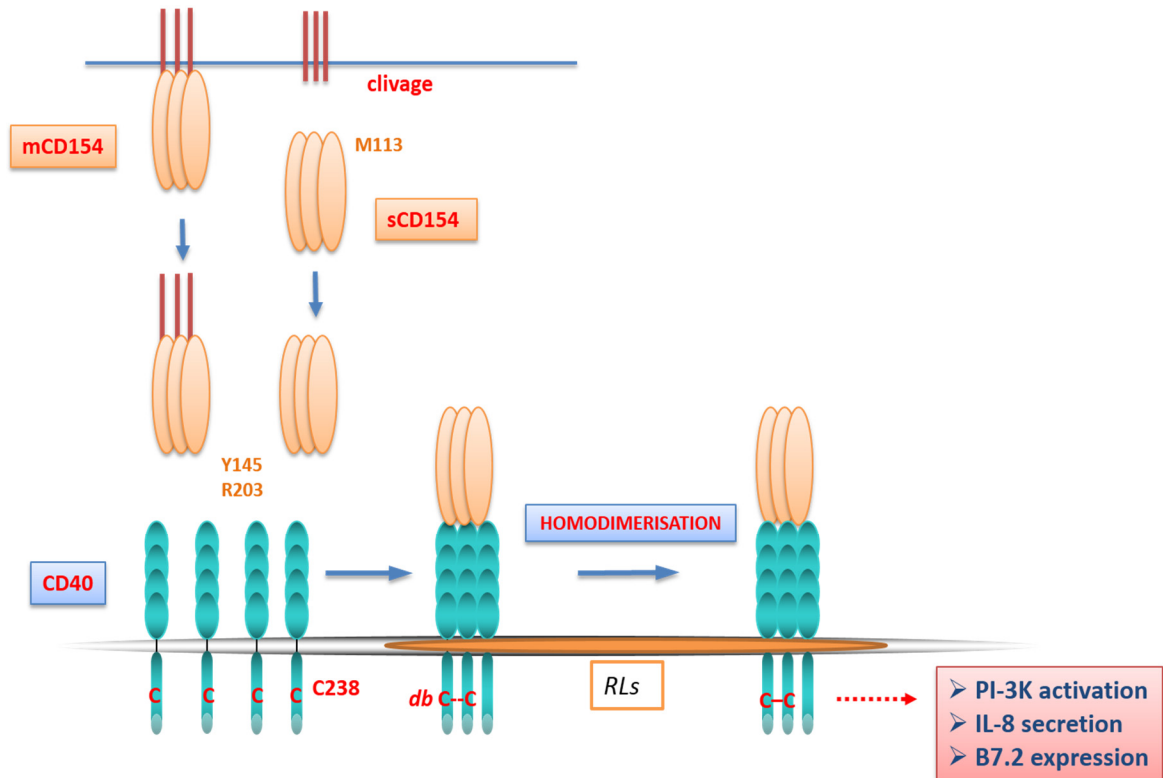


Figure 4 : La translocation et l'homodimérisation du CD40 suite à sa liaison avec le CD154. Le CD154 trimérique, soluble (sCD154) ou membranaire (mCD154), se lie au CD40 via les résidus R203 et Y145, et ainsi induit la trimérisation du récepteur. Un homodimère se forme, par la formation d'un pont disulfure (db) entre deux cystéines à la position 238 du domaine intracellulaire. Ce db-CD40 homodimère se forme dans les radeaux lipidiques (RLs) et il est nécessaire pour l'activation de la PI-3K qui régule l'expression de la B7.2 et la sécrétion de l'IL-8 dans les lymphocytes B (Modifiée de G.S.Hassan et al, 2009) [29].

Le db-CD40 homodimère a un rôle bidirectionnel. Il induit par exemple la sécrétion d'IL-8 dans les CPA ainsi que la production d'IL-2 dans les cellules T activées [66]. D'autre part, nos études ont démontré que l'homodimérisation du CD40 est requise pour l'expression du CD23, au niveau des lymphocytes B, qui est dépendante du PI-3K et de l'Akt [70]. Le CD23 est le récepteur d'IgE de faible affinité sur les cellules B et joue un rôle important dans la régulation de la production d'IgE et des réponses immunitaires et inflammatoires associées à cette production.

Plusieurs études ont montré l'importance de la translocation du CD40 menant à l'activation du NF- κ B dans les RLs suite à son association avec les TRAF2 et 3 [71, 72]. D'autre part, notre laboratoire a démontré que la translocation du CD40 vers les RLs est indépendante des voies de signalisation (PI-3K, Src et P38) [73]. Nous avons généré le mutant CD40/CD45 dans lequel la partie transmembranaire du CD40 a été remplacée par celle du CD45, une molécule exclue des RLs. En effet, avec ce mutant nous n'observons ni translocation du CD40, ni phosphorylation de l'Akt, ainsi qu'une diminution de l'expression de B7.1 (CD80). Ainsi, la translocation des CD40 vers les RLs dépend de leur domaine transmembranaire, induisant l'activation du PI-3K et la phosphorylation de l'Akt, qui régulent à leur tour l'expression de B7.1 [72].

Il est important de noter que l'interaction CD40/CD154 nécessite le recrutement non seulement du CD40 mais aussi du CD154 dans les RLs, et ainsi l'activation bidirectionnelle. En effet, le domaine transmembranaire du CD154 qui est impliqué dans l'association aux RLs, est également nécessaire pour l'activation de l'AKT et de p38 MAPK. D'autre part, la translocation du CD154 est indépendante des voies de signalisation [74].

3.3.2. NOX : source majeur des ROS.

Le nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX) est un complexe enzymatique membranaire, formé de plusieurs sous-unités, qui appartient à la classe des oxydoréductases. Son rôle essentiel est la production du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et d'autres formes des ROS. Les ROS peuvent provenir d'une source exogène tel que les médicaments et les radiations, et d'une source endogène tel que les mitochondries, les peroxysomes, et les enzymes (xanthine oxydase, nitrique oxyde synthétase, cytochrome p450, NOX). Parmi ces dernières, les NOX sont la source principale des ROS dans notre organisme [75].

Les espèces réactives de l'oxygène ROS, tel que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), consistent en des espèces d'oxygènes radicalaires et non radicalaires formées par la réduction partielle de l'oxygène. Les ROS sont générés pendant le métabolisme oxydatif mitochondrial ainsi

que la réponse cellulaire aux cytokines et à l'invasion bactérienne. Quand les ROS submergent le système de défense antioxydant cellulaire, que ce soit par une augmentation des niveaux de ROS ou par une diminution de la capacité anti-oxydante cellulaire, le stress oxydatif se produit. Le stress oxydatif est impliqué dans divers pathologie tel que l'athérosclérose et le diabète [76], le cancer [77], la neurodégénérescence [78, 79], ainsi que dans le vieillissement [80]. Par ailleurs, les ROS sont des molécules de signalisation importantes pour la prolifération et la survie cellulaire. La PI3K est une voie de signalisation qui joue un rôle très important dans la survie et la prolifération cellulaire, en réponse à des stimulations par des facteurs de croissance, des hormones, ou des cytokines. Il a été démontré que la PI3K et les MAPK (tel que p38) sont régulées par les ROS. En effet, les protéines phosphatases sont directement oxydées par ROS, induisant l'activation des voies de signalisation [81].

La structure classique de NOX est formée de deux sous-unités membranaires (gp91-phox (NOX2) et p22-phox), de trois sous-unités cytosoliques (p47-phox, p67-phox, p40-phox) et de la protéine G (Rac). Récemment, plusieurs complexes NOX ont été découvert ayant les homologues NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ou DUOX2 à la place de la sous-unité gp91-phox (NOX2) [75]. Il est important de noter que le complexe enzymatique est nommé selon cette sous-unité catalytique.

Chez l'humain il existe 7 isoformes de NOX (1 à 5, et DUOX 1 et 2), qui diffèrent selon leurs régulations, leurs localisations et leurs fonctions. Par exemple, NOX1 se trouve au niveau du colon, de l'estomac et des cellules vasculaires musculaires lisses [82]. NOX1 est constitutivement actif grâce à la présence des homologues NOXO1 et NOXA1 au lieu des sous-unités p47-phox et p67-phox, respectivement. En effet, NOXO1 n'a pas besoin d'être phosphorylé pour sa translocation et l'activation de NOX1 [82, 83]. NOX2 est présent au niveau des cellules phagocytaires, endothéliales et des neurones, alors que NOX3 est surtout présent dans les tissus fœtaux du foie et des reins. NOX4 produit l' H_2O_2 au lieu de l' O_2^- , et est constitutivement actif. Il se localise au niveau des reins, des cellules endothéliales cardiovasculaires, et d'autres cellules.

L'activation de NOX5, DUOX1 et 2 est calcium-dépendante. NOX5 se trouve au niveau des lymphocytes, des ganglions lymphatiques et des testicules, tandis-que les DUOX sont au niveau des thyrocytes [82].

Le complexe NOX est divisé en deux compartiment, le membranaire et le cytosolique. Le compartiment membranaire, appelé la flavocytochrome b₅₅₈, forme le noyau catalytique de NOX. Dans la structure classique des NOX, il est composé de la gp91-phox et de p22-phox, qui forme constitutivement un heterodimère au niveau de la membrane [84]. Concernant le compartiment cytosolique, les sous-unités p40-phox et p67-phox se lient au niveau de cytosol. Par la suite, p47-phox vient s'associer à p67-phox pour former un complexe cytosolique trimerique. Cependant, pour que le complexe soit activé, la phosphorylation de p47-phox par les PKC est indispensable [85, 86]. Enfin, p47-phox facilite la translocation de ce complexe à la membrane en se liant à p22-phox et en formant ainsi la forme active de NOX [87].

Actuellement, l'inhibition des NOX est un objectif dans divers thérapies et traitements. Cette inhibition peut être réalisé à travers différentes voies: 1) en inhibant les voies de signalisation qui active NOX, telles que les PKC, 2) en interrompant l'interaction des sous-unités, brisant ainsi l'assemblage des compartiments, 3) en bloquant la flavocytochrome, particulièrement en ciblant gp91-phox ou ces homologues, et 4) en affectant indirectement l'activité des NOX, en particulier en empêchant la translocation de Rac [75].

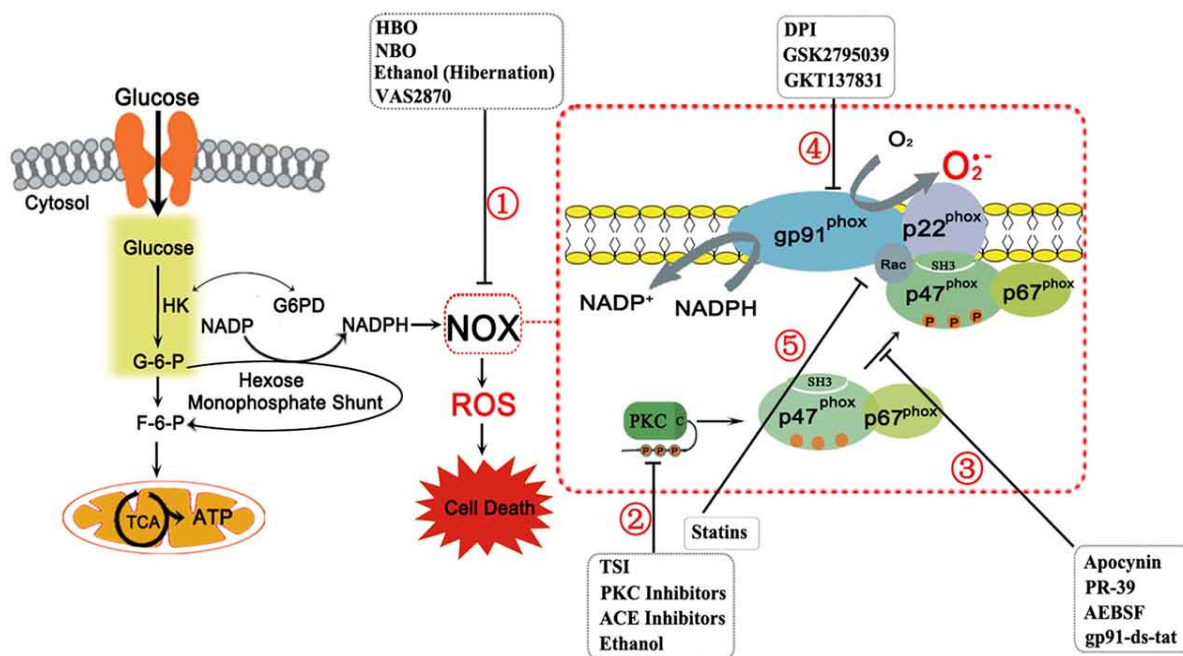


Figure 5 : La NADPH oxydase et ses différents inhibiteurs. Afin que NOX soit active, la protéine kinase C (PKC) induit la phosphorylation de p47-phox, déjà associé à p67-phox, et ainsi démasque ses domaines SH3. Ainsi, les sous-unités cytosoliques se transloquent vers la membrane grâce aux interactions entre les domaines SH3 de p47-phox et la *proline rich region* de p22-phox. Ensuite Rac se transloque indépendamment vers le complexe afin de l'activer. Une fois active, NOX produit l'ion superoxyde suite à une réaction redox via l'oxygène et le NADPH. En effet, le NADPH est le produit de l'hexose monophosphate qui dérive du glucose-6-phosphate (G-6-P), intermédiaire de la glycolyse. Par ailleurs, la surproduction des ROS dans différentes maladies induit l'apoptose. C'est pourquoi il existe des inhibiteurs de NOX afin d'empêcher cette mort cellulaire. L'inhibition de NOX est due par (1) un mécanisme non spécifique, (2) l'inhibition de la phosphorylation des PKC, (3) le blocage de l'interaction p47-phox/p22-phox, (4) le ciblage de gp91-phox ou ses homologues, (5) l'empêchement de la translocation de Rac vers le complexe NOX (*Adaptée de Radhika Rastogi et al, 2016*) [75].

3.4. Rôle Biologique de l'interaction CD40/CD154.

L'interaction du CD40 avec son principal ligand, le CD154, joue un rôle très important dans la régulation de la réponse immunitaire. Cette liaison est surtout impliquée dans la prolifération, l'activation, et la survie, cependant elle peut induire la mort cellulaire.

3.4.1. Immunité inné et adaptative.

Le couple CD40/CD154 est principalement impliqué dans les réponses des cellules B dépendantes des cellules T telle que la régulation de la prolifération des lymphocytes T, la production d'immunoglobuline (Ig), la commutation des classes d'Ig, la protection des cellules B de l'apoptose, la formation du centre germinatif, et la génération des lymphocytes B mémoires [88]. De plus, le CD154 exprimé au niveau des lymphocytes T activées régule l'expression des molécules co-stimulatrices B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), et la sécrétion de cytokines au niveau des cellules B [89-91].

D'autre part, la liaison du CD40 au CD154 active les CPAs afin de réguler les molécules co-stimulatrices et la production de cytokines [92, 93]. Ainsi, en stimulant les cellules dendritiques avec le CD154 il y a production de divers cytokines et chimiokines tels que l'IL-8, le MIP-1 α et le TNF- α qui sont des molécules importantes pour l'activation des lymphocytes T et le développement des T helper-1 (TH-1) [94, 95]. En particulier, cette liaison régule la synthèse de l'IL-12 par les cellules TH-1 [95], et la production de l'IL-6 par les cellules TH-17 [96].

Par ailleurs, l'engagement du CD40 par le CD154 induit l'expression du CD54, du CD80 et du CD86 à la surface des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques [97, 98]. De plus, cette interaction inhibe l'apoptose au niveau des monocytes [99].

Par le passé, il était considéré que les interactions CD40/CD154 menaient seulement à l'activation du CD40 et des voies de signalisation via ce récepteur. Cependant des études, incluant notre laboratoire, ont démontré que ces interactions sont bidirectionnelles. Autrement dit, ces interactions induisent de même l'activation du CD154, régulant ainsi les réponses des cellules T [66].

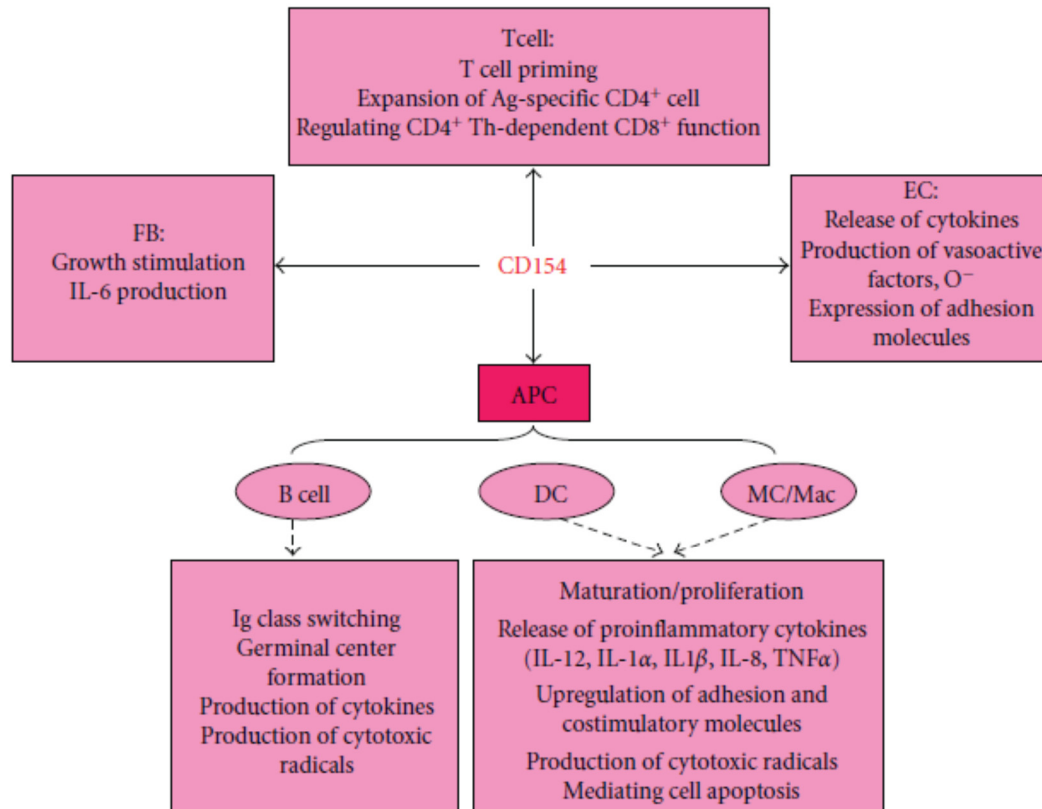


Figure 6 : Les fonctions biologiques de l'interaction CD40/CD154. Outre son rôle dans les réponses des cellules présentatrices d'antigènes (APC) : lymphocytes B, cellules dendritiques (DC), monocytes (MC) et macrophages (Mac), elle est impliquée dans les fonctions d'autres cellules : fibroblastes (FB), cellules endothéliales et lymphocytes T (*N.Alaeddine et al,2012*) [100].

3.4.2. La mort cellulaire.

Nous avons vu que le CD40 est surtout important pour la prolifération et la survie des cellules B. Cependant, le CD40 peut induire la mort cellulaire comme d'autres membres

des TNFRs ; tel que le TNFR2 quand il est surexprimé à la surface [101]. En effet, une étude a démontré que le CD40 induit directement la mort cellulaire, en le comparant aux deux autres membres de la famille des TNFRs, le FAS et le TNFR1 [102]. De plus, notre laboratoire a démontré que le CD40 peut induire la mort, d'une façon similaire à celle induite par le CMHII, c'est-à-dire indépendamment des caspases, et sans requérir la synthèse de nouvelles protéines [103].

Les voies de signalisation qui régule la mort induite par le CD40 dépendent du type cellulaire ainsi que du niveau d'expression de ce récepteur. En effet, un faible niveau d'expression induit la prolifération alors qu'un fort niveau induit la mort [104].

Des études au sein de notre laboratoire ont démontré que l'induction de la mort via CD40 est indépendante de son interaction avec TRAF2 et TRAF3, cependant elle dépend du recrutement de TRAF6. De plus, nos études ont démontré que la formation du CD40 homodimère réduit significativement la mort cellulaire induite par le CD40 [105].

4. Implication du CD40/CD154 dans différentes pathologies.

En plus de réguler la réponse immunitaire, l'interaction CD40/CD154 est fortement impliquée dans différentes pathologies inflammatoires et auto-immunes. Lors de ces maladies, le récepteur CD40 et son ligand CD154 sont surexprimés, et les réponses biologiques qu'ils induisent sont amplifiées.

4.1. Maladies auto-immunes.

L'auto-immunité est définie comme une défaillance dans les mécanismes naturels de la tolérance du soi. En effet, le système immunitaire de l'organisme déclenche une réaction envers ses antigènes du soi. Plusieurs facteurs peuvent y être impliqués, comme des facteurs génétiques ou des facteurs environnementaux tels qu'une infection [106].

Les maladies auto-immunes se caractérisent par la présence excessive d'auto-anticorps qui interagissent avec les antigènes du soi. Ces auto-antigènes (auto-Ags) peuvent se retrouver dans toutes les cellules (chromatine, centromères) ou être spécifique à un type cellulaire (thyroglobuline dans les cellules de la glande thyroïdienne). Il existe deux classes de maladies auto-immunes: les maladies auto-immunes spécifiques d'organes, telles que la sclérose en plaque qui touche le système nerveux et le diabète insulino-dépendant qui touche le pancréas; et les maladies auto-immunes systémiques (MAiS) telles que le lupus, l'arthrite et la sclérodermie [107]. Un système immunitaire normal se caractérise par une tolérance aux auto-Ags, c'est à dire par une absence de réponse immunitaire aux auto-Ags. Cependant dans certains cas cette tolérance est brisée, on parle alors d'auto-immunité.

Les auto-anticorps (auto-Acs) naturels jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée [108, 109]. En effet, étant capables de reconnaître une variété d'auto-Ags, ils ont un rôle dans le développement du répertoire des cellules B ainsi que dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire [110]. Les auto-Acs naturels sont principalement produits par les cellules B CD5⁺ [111]. La plupart d'entre eux sont des IgM et sont poly-réactifs, d'où leur faible affinité [111-113]. Cependant, les auto-anticorps qui jouent un rôle pathologique lors des maladies auto-immunes sont principalement des IgG mono-réactifs à grande affinité. L'hypermutation somatique et la commutation isotypique sont à l'origine de ces derniers faisant intervenir une réponse immunitaire adaptative bien spécifique [114, 115]. De plus, la production de ces anticorps représente une violation de la tolérance aux auto-Ags, et est le résultat de plusieurs altérations génétiques pouvant être influencées par des facteurs environnementaux [107].

Une surexposition à des facteurs environnementaux (UV, médicaments, agents infectieux, cigarettes) peut contribuer à une MAiS. Les MAiS sont associées aux auto-anticorps circulants. Ces derniers peuvent servir de marqueurs pronostiques dans différentes maladies [116]. En effet, les auto-anticorps peuvent être détecté une dizaine

d'année avant la découverte de la maladie ce qui permettrait d'intervenir plus tôt afin d'empêcher sa progression.

L'implication du CD40 ainsi que le CD154 dans le développement, la progression et le maintien des maladies auto-immunes débute avec le développement de la réponse immunitaire adaptative [29]. En effet, une surexpression de ces deux protéines transmembranaires est observée dans ces maladies chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde (AR) [117], la sclérose en plaque (SP) [118], le lupus érythémateux disséminé (SLE) [106], la thyroïdite auto-immune [119], la dermatomyosite [120], la lèpre [121], et la maladie de Crohn [122]. Dans ces maladies les cellules T activées du sang périphérique et le sCD154, vont interagir avec les cellules exprimant le CD40, stimulant ainsi le couple CD154/CD40 et amplifiant son rôle biologique.

4.1.1. L'arthrite rhumatoïde.

L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique induisant la destruction des articulations. Les cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques et les macrophages infiltrent le tissu synovial et secrètent des cytokines et des chimiokines [29, 106]. En effet, les cellules T CD4⁺ sur-exprimant le CD154, stimulent la production d'IgG par les cellules B et celle de cytokines par les cellules dendritiques [117, 123]. De plus, le CD40 exprimé à la surface des lymphocytes B conduit à une inflammation renforcée par l'interaction CD40/CD154 [124]. Ainsi, cette interaction induit la production des *rheumatoid factor* (RF), des anticorps dirigés contre le fragment Fc des IgG [125]. D'autre part, la plupart des monocytes du liquide synovial des patients souffrant d'AR expriment le CD40, et suite à son interaction avec le CD154 il y aura une sécrétion de TNF- α et d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 α , -1 β , -6, -8 et le MCP-1 [126-129]. De plus, le CD154 induit la production des métalloprotéinases tels que MMP-1, -2, -3, -9, et -13 au niveau des monocytes [130, 131]. D'autre part, les macrophages activés CD154⁺ contribuent à la destruction du cartilage et des os. Au niveau de la membrane synoviale, cette interaction régule l'expression des molécules d'adhésions telles que CD54 (ICAM-1) et CD106 (VCAM-1) [132],

renforçant ainsi l'infiltration des cellules. Par ailleurs, un *knock-down* du CD40 préviendrait l'initiation du modèle de l'arthrite chez la souris (CIA) grâce à la diminution du TNF- α dans le sang, l'inhibition de la formation de TH₁ et TH₁₇, et l'inhibition de la production des auto-anticorps [133, 134].

4.1.2. Le lupus érythémateux disséminé.

Le lupus érythémateux disséminé est le prototype des maladies à médiation d'auto-anticorps. Il est caractérisé par l'hyperactivité des lymphocytes B menant à la production d'auto-anticorps anti-nucléaires, dirigés contre l'ADN double brin par exemple [106, 135]. Cette maladie est systémique, elle peut affecter de nombreux organes tels que la peau, les articulations, le cerveau, le cœur, les poumons et les reins. Chez les patients atteints de SLE, les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les cellules B sur-expriment le CD154 [136, 137]. Ainsi, la production des auto-anticorps par les cellules B peut être induite par le CD154. On observe également une surexpression du CD154 au niveau des lymphocytes T helper [138] et des monocytes [139]. D'autre part, le plasma de ces patients est riche en sCD154. En effet, Kato et al, ont démontré que le plasma de patients atteints de SLE est capable d'activer les lymphocytes B in vitro, processus inhibé par les anticorps anti-CD154 [140]. Par ailleurs, un polymorphisme du CD40 a été identifié chez des populations mexicaines et sud-américaines atteints du lupus. Ce polymorphisme consiste en un remplacement de la proline 227 par une alanine (P227A). Le CD40-P227A se caractérise par une augmentation de la sécrétion d'anticorps et de cytokines pro-inflammatoires [141] ainsi que par une plus grande affinité au TRAF3, le transformant en un régulateur positif [54].

4.1.3. La sclérose en plaque.

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune durant laquelle le système immunitaire attaque le système nerveux central, résultant en une perte de myéline [29]. Les caractéristiques de la SP sont la démyélination ainsi que l'infiltration des cellules immunitaires tels que les macrophages, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et les lymphocytes B [142]. Dans cette maladie, le CD154 est surexprimé au niveau des monocytes et des cellules T [143]. Le CD154 stimule les cellules endothéliales CD40⁺ de

la barrière hémato-encéphalique, régulant ainsi la production de cytokines, de chimiokines et de MMPs et induisant à la transmigration des leucocytes dans le système nerveux central [3, 4]. D'autre part, il induit la sécrétion d'auto-anticorps par les lymphocytes B CD40⁺ [144].

Tableau 1 : L'implication de CD40/CD154 dans les maladies auto-immunes. Ce tableau résume le rôle de cette interaction dans l'AR (Rheumatoid arthritis), le SLE (Systemic lupus erythematosus) et la SP (Multiple sclerosis) (G.S.Hassan et al, 2009) [29].

| Rheumatoid arthritis | Systemic lupus erythematosus | Multiple sclerosis |
|---|---|--|
| Activated CD154 ⁺ CD4 ⁺ T cells mediate production of pro-inflammatory cytokines and tissue-degrading enzymes in rheumatoid synovitis [64]. | CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells exhibit an increased CD154 expression [87,88]. | CD154 ⁺ T helper cells co-localize with CD40 ⁺ Mon./Mac. in perivascular lesions [64]. |
| CD40 ⁺ B cells boost inflammation [75]. | | CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells exhibit an increased CD154 expression [100]. |
| CD40 ⁺ RF-producing B cells are induced to survive, and to release RF [77]. | B cells show an ectopic CD154 expression, and exhibit abnormal costimulatory signals and sustained production of pathogenic autoantibodies [89,92]. | CD154 stimulation of CD40 ⁺ ECs of the BBB induces upregulation of their cytokine/chemokine and MMPs production leading to leukocyte transmigration into the CNS [2,4]. |
| CD40 ⁺ Mon/Mac/DC are induced to upregulate their cytokine and MMPs production [79-82]. | | |
| CD154-stimulated fibroblasts are induced to proliferate, and upregulate their cytokine production and adhesion molecules expression [83]. | Monocytes express an increased level of CD154, correlating with disease activity [93]. | CD40 ⁺ B cells mediate the production of auto-antibodies [101]. |
| CD154-stimulated chondrocytes are induced to produce various cytokines [84]. | | CD154-stimulated macrophages are induced to produce cytokines/chemokines and MMPs, and to present auto-antigens [2]. |

4.2. L'athérosclérose.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique au niveau des artères de gros calibre, durant laquelle les cellules immunitaires s'accumulent dans la lésion et produisent des cytokines pro-inflammatoires avec l'aide d'autres cellules, menant ainsi à la détérioration de la matrice extracellulaire, et augmentant le risque d'infarctus [145]. Dans cette pathologie, le CD40 et le CD154 sont surexprimés sur les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ; ainsi l'interaction CD40/CD154 a un rôle important durant cette maladie [146]. D'une part, le CD40 induit la production de cytokines-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8) et l'expression de molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM) menant à la maturation de la lésion athéroscléreuse à cause du recrutement des monocytes et des lymphocytes T [147, 148]. D'autre part, le CD154 induit l'expression des métalloprotéinases (MMP-1, MMP-3, MMP-9), menant ainsi à la rupture de la lésion et ainsi qu'à la libération des agents thrombotiques dans le sang [148]. Enfin, il y aura une forte activation et agrégation des plaquettes à cause du CD154 qui peut interagir non seulement avec le CD40, mais aussi avec les intégrines $\alpha M\beta 2$, $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, et $\alpha 5\beta 1$, amplifiant ainsi l'inflammation.

4.3. L'asthme allergique.

4.3.1. Définition.

L'asthme allergique est une maladie chronique des voies respiratoires qui rend la respiration difficile. Cette maladie est caractérisée par l'inflammation et l'hyperréactivité des voies respiratoires (AHR) qui se définit par une augmentation de la sensibilité des voies respiratoires aux allergènes et qui mènent à leur rétrécissement et parfois même à leur obstruction [149]. L'asthme est un état pathologique inflammatoire des voies aériennes, associé à une sur-activation des cellules TH₂ (T helper de type 2), à une production élevée d'IgE, et à un recrutement renforcé des mastocytes et des éosinophiles.

Lors d'une exposition à un allergène, les CPAs déclenchent l'initiation d'une réponse immunitaire innée, subissent une maturation et une migration, activent et régulent par la suite les réponses immunitaires adaptatives dépendantes des lymphocytes T [150]. En effet, la réponse allergique est initiée par la reconnaissance par les lymphocytes T des CMH-II à la surface des CPAs sur lesquels est présenté l'allergène.

En addition à ce premier signal, de la réponse immunitaire adaptative, nécessite un second signal costimulateur, afin d'activer ces lymphocytes. Ce second signal est fourni par des interactions entre CPAs et cellules T via des molécules costimulatrices. Dépendamment du type de molécules impliquées, ce second signal peut favoriser le développement d'une réaction allergique inflammatoire ou peut l'inhiber. Plusieurs molécules de la famille B7 (CD80, CD86, PD-I, ICOS, CTLA-4) et de la famille des TNFRs (OX40, CD30, Fas, CD27, CD40) sont indispensables pour la délivrance de signaux costimulateurs dans les phases précoces et tardives de la réponse allergique [151]. Ainsi, ces molécules pourraient fournir une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des troubles allergiques des voies respiratoires. Par exemple, une étude a démontré que la production de cytokines de types TH₂ et le développement ultérieur des réponses allergiques des voies respiratoires nécessite une costimulation B7-2 [152].

| Costimulatory molecule family | APC | Effector cell | Functions and characteristics |
|-------------------------------|--------------|------------------|---|
| B7 | CD80 CD86 | CTLA-4 | Contributes to the suppressive activity of allergen-specific regulatory cells during sensitization Polymorphism in <i>Ctla-4</i> promoter and gene favors allergic diseases |
| | | CD28 | CD80 and CD86 expression is upregulated on the surface of various cells of allergic patients Soluble CD86 is increased in the sera of allergic patients |
| | ICOS-L | ICOS | Regulates TH2-effector cell function and their infiltration in the lungs, production of TH2 cytokine Promotes B-cell differentiation and IgE production Expression on iNKT cells contributes to airway hyperreactivity Contributes to the differentiation of regulatory cells in pulmonary lymph nodes |
| | PD-L1 | PD-1 | Drives the differentiation of Foxp3+ CD4+ T cells Downregulates contact hypersensitivity reaction |
| | PD-L2 | PD-1 | Regulates asthma by an IFN- γ -dependent mechanism Downregulates airway hyperreactivity, prevents eosinophil infiltration in the lungs and prevents IgE production |
| | B7-H3 | Receptor unknown | Promotes TH2 differentiation, eosinophil infiltration and development of airway hyperreactivity Decreases the severity of allergic conjunctivitis |
| | TNFR | OX40L | OX40 |
| CD30-L | | CD30 | CD30 is expressed by Langerhans cells, CD4+ and CD8+ T cells of atopic patients Soluble CD30 is increased in the sera of allergic patients |
| 4-1BB-L | | 4-1BB | Promotes airway hyperreactivity, eosinophil infiltration and IgE production Upregulates TH2 cell proliferation and mast cell cytokine production |
| Fas | | FasL | Delays resolution of airway hyperresponsiveness Promotes eosinophil apoptosis in the lungs |
| CD27 | | CD70 | Increases production of IgE by B cells |
| CD40 | | CD40L | Contributes to isotype class switching towards IgE Enhances development of airway inflammation Increases production of TH2 cytokine and decreases number of T _{reg} cells |
| Other costimulatory molecules | CD2 | CD58 | Promotes differentiation of TH2 cells and the production of IgE Expressed on monocytes of allergic patients |

Tableau 2: Le rôle des molécules co-stimulatrices dans les maladies allergiques et l'asthme. (*V.Lombardi et al, 2010*) [151].

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de la maladie allergique des voies respiratoires, y compris l'inflammation associée à l'asthme. En effet, des taux élevés de lymphocytes T activés ont été observés dans le liquide BAL et le tissu bronchique des patients asthmatiques. La majorité de ces cellules T sont CD4⁺ [153]. Les cellules T CD4⁺ sont classées en différentes sous-populations en fonction du type de lymphokines qu'elles produisent, telles que les TH₁ et les TH₂. Les cellules TH₁ produisent l'IL-2, le TNF- β et l'IFN- γ ; elles sont importantes pour le développement de l'immunité à médiation cellulaire. En revanche, les cellules TH₂ produisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10, et l'IL-13 ; elles sont essentielles à la génération des

réponses immunitaires humorales [131]. Ces cytokines de type TH₂ sont le principal moteur de l'asthme, par l'induction de la survie des cellules TH₂ (IL-4), la production d'IgE (IL-4 et IL-13), le recrutement l'activation et la maturation des mastocytes et des éosinophiles (IL-3, IL-5, IL-9, IL-13 et GM-CSF) [154].

Des taux élevés d'IL-4 et IL-5 ont été observés dans les biopsies bronchiques [152], les cellules du lavage BAL [155, 156], et le sang [146] de patients asthmatiques. Ces cytokines sont importantes dans la pathogénèse de l'asthme allergique puisqu'elles favorisent la chimiotaxie [157], l'activation [158], et la survie [159] des éosinophiles, ainsi que la production d'IgE par les lymphocytes B [160].

Il a été démontré que l'administration d'IFN- γ qui supprime le développement des cellules TH₂ ou d'anticorps dirigés contre l'IL-4 ou l'IL-5 inhibent l'éosinophilie pulmonaire chez les souris allergiques [161].

La stimulation des lymphocytes B médiée par les signaux des récepteurs de l'IL-4 conduit à la production d'anticorps IgE spécifiques à l'allergène. Ces IgE se lient ensuite à leur récepteur de haute affinité (Fc ϵ RI) à la surface des mastocytes. Les mastocytes sont considérés depuis longtemps comme un type cellulaire important impliqué dans l'inflammation allergique [162]. Ces cellules sont réparties dans tout le tissu conjonctif, souvent à proximité des vaisseaux sanguins et lymphatiques et sous les surfaces épithéliales exposées à des allergènes [163]. La liaison des IgE stimule la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. Une fois libéré, les médiateurs se lient à leurs récepteurs présents au niveau des cellules musculaires lisses des voies aériennes et favorisent leur contraction, et ainsi le rétrécissement des voies respiratoires [115]. Ils favorisent également l'infiltration d'autres leucocytes, y compris les éosinophiles, vers les sites d'inflammation [164]. De plus, l'activation des mastocytes conduit à la synthèse de l'IL-4, l'IL-5 et la TNF- α qui jouent un rôle très important dans l'inflammation [165, 166].

La production d'IgE par les cellules B, et l'accumulation d'éosinophiles, sont sous le contrôle des lymphocytes TH₂, par la production d'IL-4 et IL-5. Ces cellules produisent de plus de l'IL-9 et IL-13 qui contribuent à l'AHR dans l'asthme [167, 168]. En outre, les cellules TH₁ ont des effets inhibiteurs sur la fonction des TH₂, et diminuent l'inflammation des voies respiratoires chez certains modèles de souris sensibilisés à des allergènes [169]. Grunig et al ont rapporté le rôle de l'IL-10 dans la suppression de la réponse pulmonaire induite par TH₂ [170]. D'autre part, une étude récente a démontré que les cellules T régulatrices (Treg) jouent un rôle important dans la réduction de la prolifération des cellules TH₂, ce qui réduit considérablement les maladies associées aux voies respiratoires tel que l'asthme [171].

Par ailleurs, l'IL-12 joue un rôle essentiel dans le développement des cellules TH₁. Cette interleukine induit les réponses des lymphocytes TH₁ et stimule les cellules T activées et les NK (*natural killer*) à produire le maximum d'IFN- γ . De plus, l'IL-12 inhibe la production d'IgE induite par l'IL-4, par les cellules B humaines *in vitro* [172, 173]. En outre, une administration d'IL-12 abolie l'AHR et l'éosinophilie pulmonaire dans un modèle murin d'asthme allergique [174, 175]. Il est important de savoir que le blocage de l'IL-12 a des effets différents selon le moment du blocage sur l'inflammation allergique des voies respiratoires. En effet, le blocage d'IL-12 pendant la phase de sensibilisation du modèle murin a aggravé les caractéristiques typiques de l'asthme allergique: l'AHR, l'éosinophilie bronchique, la production des cytokines de types TH₂ et la production d'IgE spécifiques aux allergènes. Cette inflammation accrue est en accord avec la croyance que l'IL-12 est un protecteur contre une sensibilisation excessive de TH₂ [176, 177]. Cependant, la neutralisation de l'IL-12 à un stade avancé, c'est à dire au cours des provocations répétées chez les souris préalablement sensibilisées, atténue le phénotype de l'asthme expérimental induit par l'allergène: l'AHR, la production d'IgE et de cytokines sont fortement réduits, avec une réduction du nombre d'éosinophiles dans les BAL. Il est important de noter que les effets anti-inflammatoires du blocage de l'IL-12 étaient accompagnés d'une expression atténuée de plusieurs cytokines (IL-4, -5, -10, -13), chimiokines (éotaxines, RANTES, MCP-I) et molécules d'adhésions (VCAM-I) [178].

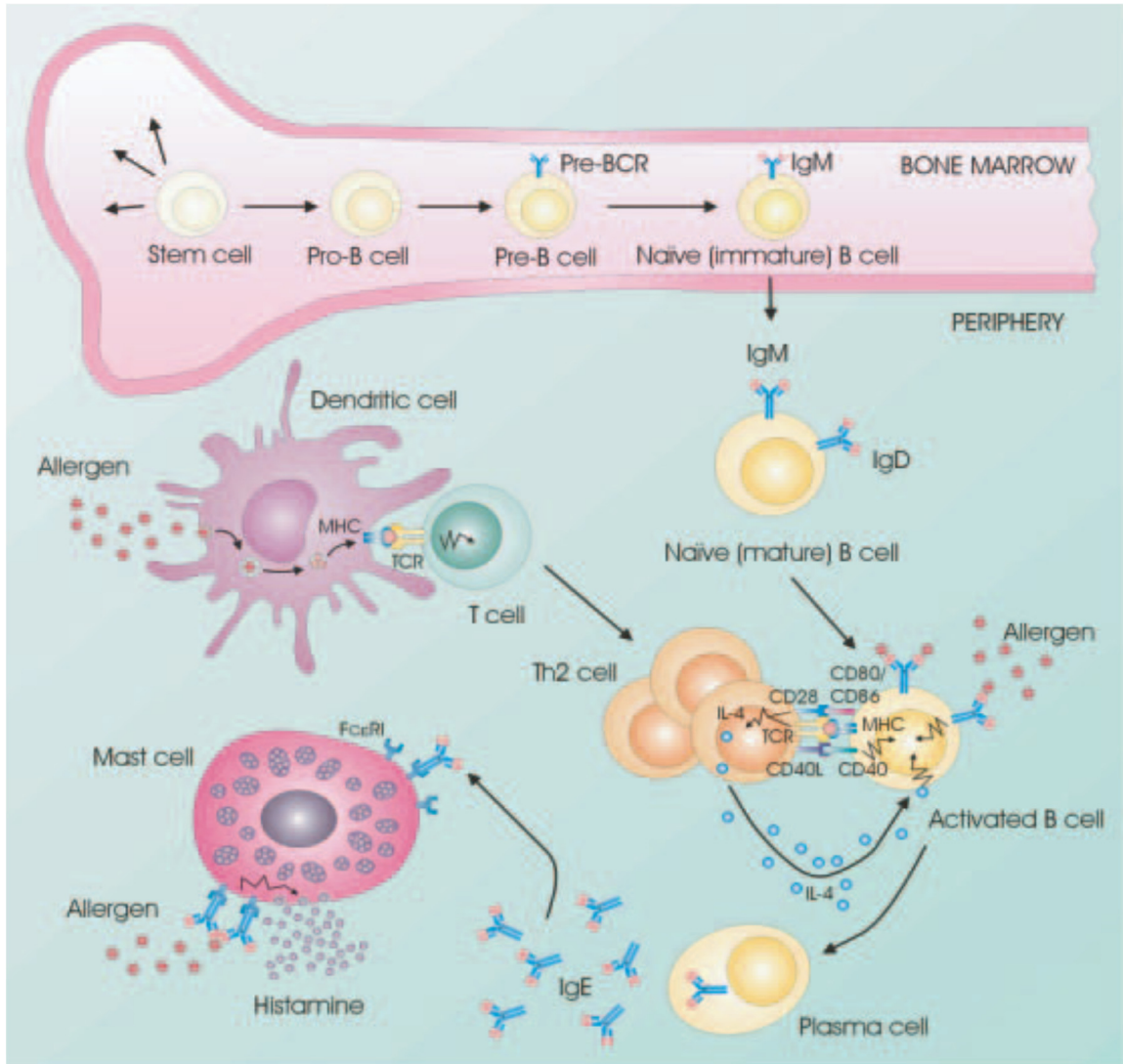


Figure 7 : Les interactions cellulaires sont importantes dans les réactions allergiques. Les cellules B se développent à partir de cellules souches dans la moelle osseuse. Les cellules B naïves qui sortent de la moelle osseuse se rendent aux organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques pour être activées. Les allergènes sont absorbés par des CPA (par exemple des cellules dendritiques) qui les présentent aux cellules T via CMH-II. Ainsi, les cellules T deviennent actives et se différencient en Th2. La stimulation des cellules Th2, suite à leur liaison avec les cellules B actives, conduit à la production d'IL-4 et à la régulation de l'expression du CD40L par les lymphocytes T. La stimulation du CD40 des cellules B spécifiques à l'allergène augmente l'expression des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86, qui induisent une expression accrue du CD40L au niveau des cellules T et une stimulation accrue des lymphocytes B, avec l'aide de l'IL-4. La stimulation des lymphocytes B

médiée par le CD40 agit en synergie avec les signaux des récepteurs de l'IL-4 pour augmenter la commutation de classes vers l'IgE. L'IgE spécifique à l'allergène se lie à son récepteur de haute affinité (FcεRI) sur les mastocytes. Enfin, l'exposition aux allergènes induit la liaison de l'IgE au récepteur et par la suite une dégranulation des mastocytes et la libération des molécules pro-inflammatoires telles que l'histamine. Notes: BCR: récepteur des cellules B; FcεRI: récepteur d'IgE de haute affinité; CMH-II: complexe majeur d'histocompatibilité de classe II; TCR: récepteur des cellules T (L.K.Poulsen et al, 2007) [179].

4.3.2. L'interaction CD40/CD154 dans l'asthme.

Les interactions entre le CD40 et son ligand, le CD154, contrôlent le développement des réponses immunitaires humorales et à médiation cellulaire. Les interactions CD40/CD40L entre les lymphocytes B et les cellules TH activées jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. En effet, il a été démontré que l'engagement du CD40 des lymphocytes B augmente l'expression de B7 (CD80), ICAM-I, CD23 et LTα [180]. En particulier, des études utilisant des souris CD40 knockout (KO) ou CD154 KO ont suggéré que la liaison du CD40 favorise les réponses inflammatoires dans les voies respiratoires [181-183]. De plus, des études récentes suggèrent que la molécule CD40 module les réponses immunitaires pulmonaires.

Vu que les cellules épithéliales des voies aériennes peuvent agir comme des cellules effectrices immunitaires par l'expression de médiateurs inflammatoires, l'épithélium est maintenant considéré comme important dans la génération de l'inflammation associée à l'asthme. Les cellules épithéliales des voies respiratoires expriment le CD40. L'engagement du CD40 épithélial induit une augmentation significative de l'expression des chimiokines RANTES, de la protéine chimio attractive monocyttaire MCP-I, de l'interleukine IL-8, et de la molécule d'adhésion ICAM-I. D'autre part, les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β, et les interleukines IL-4 et IL-13 dérivées des cellules TH₂ modulent l'expression des médiateurs inflammatoires au niveau des cellules épithéliales déjà activées via le CD40. Ainsi, les interactions entre les cellules épithéliales

des voies respiratoires et les leucocytes CD154⁺ (lymphocytes T activées, éosinophiles, et mastocytes) induisent l'inflammation des voies respiratoires [153].

L'inflammation des voies respiratoires entraîne une surexpression du CD40 au niveau de l'épithélium. En effet, son expression est induite par l'IFN- β et l'IFN- γ . Par la suite, les CD154 au niveau des lymphocytes T se lient aux CD40 surexprimés par les cellules épithéliales, induisant une production accrue d'IL-6 et d'IL-8 et une augmentation de l'expression des molécules d'adhésions ICAM-I et VCAM-I. Ainsi, les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires sont amplifiées [184].

Après sensibilisation à l'allergène, une augmentation du CD154 est observée au niveau des lymphocytes T. Ce dernier va interagir avec le CD40 au niveau des lymphocytes B, des monocytes, des cellules dendritiques, et des cellules épithéliales. Au niveau des lymphocytes B cette interaction est importante pour l'activation et la commutation de classe isotypique [185]. Au niveau des monocytes, l'engagement du CD40 induit la production de cytokines pro-inflammatoires et de N.O (*nitric oxide*) [186, 187]. Au niveau des macrophages, la liaison du CD40 avec le CD154 entraîne la production d'IL-12. Chez les souris CD40 KO, cette production est inhibée et par conséquent, il n'y a pas de réponse TH₁ [188, 189].

Pour qu'un lymphocyte B produise des IgE, il a besoin de deux signaux fournis par une cellule TH₂: les cytokines IL-4/IL-13 et la liaison du CD40 [179]. L'interaction du CD40, au niveau des cellules B et des CPAs, avec le CD40L exprimé au niveau des cellules T activées, augmente l'inflammation induite par les cellules T et les réponses immunitaires humorales, et en particulier la production d'IgE. Cette interaction est donc impliquée dans l'asthme. En effet, des études chez des souris CD40 KO ou CD154 KO, ayant été sensibilisé à l'antigène "*Aspergillus fumigatus*", montrent une suppression de la production d'IgE., mais l'inflammation pulmonaire n'est pas inhibée. De plus, le KO du CD40L inhibe le développement de l'hyperréactivité bronchique, alors que le KO du CD40 n'a pas d'effets. Le CD154 est donc nécessaire pour le développement de l'AHR induite par un allergène [190].

Récemment, Suzuki et al, ont démontré que l'inhibition de l'expression du CD40 par des petits ARN interférents (siRNA) chez des souris sensibilisés à l'ovalbumine entraîne une diminution de la production des cytokines de type TH₂ (IL-4 et IL-5) et augmente le nombre des cellules Treg [191]. Par ailleurs, une étude a démontré que chez les souris, CD154 KO, sensibilisés à l'ovalbumine, il n'y avait pas de détection d'IgE dans le sérum, et l'inflammation des voies respiratoires était réduite. Ainsi, Jordana et al, ont démontré que le knockout du CD154 réduisait la réponse inflammatoire chez les souris sensibilisé à l'allergène [183].

L'interaction CD40/CD154 favorise la production d'IgE et des médiateurs pro-inflammatoires dans l'asthme. En effet, l'engagement du CD40 sur les cellules épithéliales favorise la progression de la maladie [153]. D'autre part, cette interaction, entre les lymphocytes B et les mastocytes induit l'inflammation des voies respiratoires [192]. De plus, cette liaison orchestre de nombreuses autres fonctions immunitaires, y compris la différenciation des cellules TH₂ [193] et l'activation des cellules dendritiques [94]. L'engagement du CD40 au niveau des cellules dendritiques induit la production de l'IL-8, TNF- α , et MIP-1 α [194]. Le blocage de l'expression du CD40 par siRNA dans un modèle de souris sensibilisé à l'ovalbumine atténue l'allergie. Cela est dû à l'inhibition des fonctions des cellules dendritiques et des lymphocytes B, et de la génération des Treg, qui sont dépendants du CD40 [193].

Par ailleurs, les plaquettes interagissent avec les monocytes et les cellules dendritiques via les interactions CD40/CD154, contribuant à une meilleure présentation des antigènes et au développement de réponses immunitaires adaptatives. Une étude récente a démontré que les plaquettes favorisent la progression de l'asthme allergique [150]. En effet, les allergènes peuvent directement activer les plaquettes et augmenter leur niveau d'expression en CD154. De plus, les plaquettes inhibent la différenciation des cellules Treg et par conséquent induisent les réponses TH₂. Ainsi, dans cette étude il a été démontré que la déplétion plaquettaire et la déplétion en CD154 atténuent la progression

de l'asthme, en inhibant la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IgE, ainsi que l'infiltration leucocytaire.

5. CD40/CD154 vers une cible thérapeutique.

Le blocage de l'interaction CD40/CD154 via des anticorps anti-CD40 ou anti-CD154, via des petits ARN interférents du CD40, ou bien via leur agonistes est apparemment bénéfique dans le traitement de divers maladies.

Des études ont montré que l'administration d'anticorps anti-CD154 chez un modèle de souris arthritique (CIA) inhibe l'inflammation articulaire et l'érosion du cartilage [122]. Chez un modèle murin de lupus cette administration prolonge la survie et atténue les symptômes de la maladie ainsi que l'inflammation [195]. Enfin, chez un modèle murin de sclérose en plaque (EAE), elle diminue les symptômes cliniques et inhibe la production d'auto-anticorps [118].

Des anticorps humanisé IgG1, antagonistes anti-CD154, tels que le hu5c8 *Ruplizumab*, le hu24-31 *Toralizumab*, et le ABI793 ont été testés chez l'humain. Ces molécules sont capables de bloquer l'interaction CD154/CD40. Cependant, en phase clinique, elles ont démontré un risque de thrombose important à cause de leur interaction avec les plaquettes [196].

Les anticorps anti-CD40 diffèrent par leur site de liaison avec le CD40, et diffèrent ainsi par leur fonction, agoniste ou antagoniste. Par exemple, le HCD122 (anticorps humanisé IgG1) est une molécule antagoniste qui bloque la survie de la leucémie lymphoïde chronique. Le ch5D12 (anticorps chimérique IgG4) est un antagoniste utilisé contre la maladie de Crohn [195]. Le SGN-40 *Dacetuzumab*, (anticorps humanisé IgG1) est partiellement agoniste, et est utilisé contre la leucémie lymphoïde chronique. Enfin le CP-870,893 (anticorps humanisé IgG2) est un agoniste utilisé contre les tumeurs solides [195].

D'autre part, la mort induite via le CD40 pourrait être une cible thérapeutique pour les traitements anti-tumoraux. Par exemple, le sCD154 recombinant en se liant avec le CD40 peut induire un arrêt de croissance du carcinome du sein, et l'apoptose dans les tumeurs colorectales [197].

Malgré les progrès dans la compréhension de la physiopathologie des maladies induites par un allergène, la thérapie traditionnelle consiste toujours en un contrôle de la maladie avec des médicaments anti-inflammatoires à base de glucocorticoïdes, des bronchodilatateurs et des antihistaminiques. Bien que ces médicaments soulagent les symptômes et soient suffisants pour traiter la majorité des patients, ils ne guérissent pas la maladie. Dans la recherche de nouvelles thérapeutiques, des efforts ont été faits pour traiter les maladies allergiques des voies respiratoires grâce à la thérapie génique et de nombreuses études précliniques ont démontré un potentiel impressionnant. La plupart des stratégies se concentrent sur le blocage de l'expression des protéines pro-inflammatoires ou des facteurs de transcription impliqués dans la pathogenèse de la maladie [198]. De nos jours, le blocage de l'interaction CD40/CD154 est une stratégie ciblée. En effet, l'inhibition de cette interaction bidirectionnelle supprime non seulement les réponses des cellules T et les cytokines de types TH₂, mais génère aussi des cellules T régulatrices (Treg) [199]. Cependant, l'administration d'anticorps anti-CD154 n'a pas été testée au niveau clinique dû à son interaction potentielle avec le CD154 exprimé sur les plaquettes pouvant provoquer une thrombose. Le blocage de la liaison CD40/CD154 pourrait représenter une méthode thérapeutique dans les traitements des maladies allergiques.

Finalement, en ciblant cette interaction nous pourrions élaborer de nouvelles immunothérapies qui pourraient être plus efficaces en ayant moins d'effets secondaires.

Chapitre 2 : Rationnel et Hypothèse

Nous avons vu ci-haut l'importance des RLs dans l'homodimérisation du CD40. Les NADPH oxydases tel que NOX2 dépend de l'intégrité des RLs afin de produire des ROS [200]. Chez l'homme, il existe sept iso-formes de NOX qui sont constitutivement exprimés sur divers types cellulaires [201]. Le NOX2 et le NOX5 génèrent les ROS au niveau des lymphocytes B [202, 203]. Nous avons suggéré que les ROS sont impliqués dans la formation du CD40 homodimère, puisqu'en présence d'un antioxydant (le NAC), il y'a inhibition de cette homodimérisation [66]. Cependant, les mécanismes par lesquelles les ROS et les NOX sont impliqués y sont inconnus.

Par ailleurs, nous avons vu que le CD40 est impliqué dans l'asthme allergique, et que son interaction avec son ligand induit fortement la commutation de classe vers l'IgE et ainsi sa sécrétion par les plasmocytes. Une étude a démontré que chez les souris CD40 ou CD154 knockouts sensibilisées à l'*Aspergillus fumigatus* (Af), la production d'IgE est inhibée. Cependant, l'AHR à la méthacholine était seulement inhibée en absence du CD154. Cela suggère que l'AHR nécessite l'interaction du CD154 avec d'autres récepteurs [204].

D'autre part, nos études ont démontré que les CD40 homodimères régulent l'expression du CD23. Il est bien établi que le lumiliximab, un anticorps souris dirigé contre le CD23, diminue la synthèse d'IgE par les cellules B humaines, *in vitro*, et peut réduire les taux d'IgE sériques dans un essai clinique de phase I chez les patients atteints d'asthme allergique [70]. De plus, ayant déterminé que la cystéine C238 est impliquée dans la formation du db-CD40 homodimère, et que les homodimères CD40 induisent des événements de signalisation spécifiques dans les cellules B, nous allons étudier le rôle des homodimères, *in vivo*, en utilisant un modèle allergique de souris knockin.

D'où découle notre hypothèse que l'homodimérisation du CD40 nécessite des signaux spécifiques impliqués dans la production des ROS, et cette homodimérisation pourrait être impliquée dans le développement de l'asthme.

Pour confirmer notre hypothèse, nous allons :

- I-** Déterminer les voies de signalisations requises pour la formation du CD40 homodimère :
 - a.** Identifier l'implication des ROS dans l'homodimérisation du CD40.
 - b.** Etudier le rôle des NOX dans la formation du CD40 homodimère.

- II-** Déterminer si le CD40 est le seul récepteur impliqué dans le développement de l'asthme allergique :
 - a.** Générer les modèles murins à hyperréactivité bronchique induite par l'ovalbumine.
 - b.** Etudier l'effet du blocage spécifique de l'interaction CD40/CD154 sur l'inflammation des voies aériennes.
 - c.** Evaluer l'impact de cette inhibition spécifique sur la production d'IgE.
 - d.** Déterminer l'impact de ce blocage sur l'hyperréactivité bronchique.

Chapitre 3: Matériels et Méthodes

1. Les lignées cellulaires :

Les lignées cellulaires A20, WEHI, WEHI-231, et BJAB ont été obtenues d'ATCC (*American Type Culture Collection*) (Manassas VA, USA), et été maintenues dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 5% du *Fetal Bovine Serum* (FBS) inactivé (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% de Pénicilline Streptomycine et L-Glutamine (PSG) (GIBCO, Burlington, ON, Canada). A20 est une lignée de lymphomes B dérivée des souris BALB/c exprimant le CD40m ; WEHI est une lignée de fibroblastes dérivée des souris BALB/c n'exprimant pas le CD40m mais exprimant l' $\alpha 5\beta 1$ murin ($\alpha 5\beta 1$ m) ; WEHI-231 est une lignée de lymphocytes B immatures qui dérivent des souris BALB/c et qui expriment le CD40m mais non pas le $\alpha 5\beta 1$ m ; et BJAB est une lignée de lymphocytes B humaines.

2. Anticorps et Réactifs :

Les hybridomes produisant les anticorps monoclonaux G28.5 (anticorps monoclonal de souris, IgG1, anti-CD40h), FGK (anticorps monoclonal de rat, IgG2a, anti-CD40m), et MR1 (anticorps monoclonal de hamster, IgG1, anti-CD154m) ont été obtenues d'ATCC. Afin de produire une bonne quantité de ces anticorps, ces hybridomes ont été maintenues dans du RPMI supplémenté avec 1% de FBS. Le surnageant contenant l'anticorps a été récolté par centrifugation, et les anticorps ont été purifiés sur une colonne de sépharose de protéine A/G. Le G28.5 marqué à la biotine (G28.5-B) a été préparé selon le protocole proposé par Pierce (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). L'anti- $\alpha 5\beta 1$ m et le FGK, marqués au fluorochrome Alexa-488 ont été préparé selon le protocole proposé par Pierce. Les fragments F(ab) des anticorps MR-1 et FGK ont été préparés en utilisant le Kit de fragmentation F(ab) de chez ThermoScientific. L'anticorps chèvre anti-souris (*goat anti-mouse*) marqué au fluorochrome Alexa-488 (GAM-Alexa488), et la Streptavidine-Alexa488 proviennent d'Invitrogen (Life technologies, Burlington ON, Canada). Le fragment Fab₂ du goat anti-mouse IgG

(GAM-Fab₂) provient de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Les anticorps utilisés pour les gels proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): le phospho p38 (P-p38), le p38 total (p38), le *horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse* (GAM-HRP) et le *horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit* (GAR-HRP). Le diamide, les agents de la culture cellulaire et les produits chimiques de l'électrophorèse proviennent de Sigma-Aldrich. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 30% provient de Fisher Scientific, alors que le diphenyleneiodonium chloride (DPI) de Calbiochem.

3. La transfection des cellules A20 :

Le plasmide d'expression Pcep4-cd40 contenant le gène CD40h sauvage (WT) a été utilisé comme plasmide de base pour la génération des différents CD40h mutants par une mutagenèse dirigée. Les cellules A20 (4 x 10⁶ cellules / échantillon) ont été transfectées par électrolocation en utilisant 20µg du plasmide contenant le CD40h sauvage (CD40h-WT), le CD40h muté à la cystéine 238 (CD40h-C238A), ou le vecteur vide en utilisant le *Gene Pulser II* (Biorad, Hercules, CA) (260V, 950µF) [66, 73]. 72h après transfection, les cellules ont été maintenues dans du RPMI 5% FBS supplémenté par 300µg/ml d'hygromycin B (Wisent, Inc., Montréal, QC, Canada). Afin d'obtenir des cellules exprimant d'une manière comparable le CD40h (WT et C238A), les cellules ont été triées par BD ARIA II.

4. La cytométrie en flux (FACS) :

Afin d'étudier le niveau d'expression du CD40h à la surface des A20 et des BJAB, les cellules (0.5 x 10⁶ cellules / tube de FACS) ont été incubées avec le G28.5-B (1µg/ml), pendant 30 minutes sur glace. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS (*phosphate-buffered saline*) 2% FBS froid, puis incubées 30 minutes avec la Streptavidine-Alexa488 (1µg/1000µl). Les cellules ont été analysées par FACS Calibre et Flowjo (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). De la même manière, afin de vérifier l'expression du CD40m et de l'α5β1m à la surface des WEHI et des

WEHI-231, nous avons utilisé respectivement le FGK-Alexa 488 et l'anti $\alpha 5\beta 1$ -Alexa 488.

5. Induction de la formation du CD40 homodimère :

L'homodimérisation du CD40 est induite par un *cross-linking* (XL) par le G28.5 suivi du GAM-Fab'₂, considéré comme un contrôle positif, ou par un pro-oxydant, le diamide (dia), ou bien par le H₂O₂ (ROS). En effet, les BJAB ou les A20 CD40h-WT ou CD40h-C238A (1 x 10⁶ cellules) ont été incubées 30 minutes sur glace avec le G28.5 (1µg/100µl), lavées avec du RPMI, puis incubées 5 minutes à 37°C avec le GAM-Fab'₂ (1µg/100µl). L'homodimérisation induite par le pro-oxydant a été effectuée en incubant les A20 transfectées (1 x 10⁶ cellules) avec 1 mM du diamide (dia) pendant 15 min à 37°C. Enfin pour le H₂O₂, nous avons incubé 1 x 10⁶ cellules d'A20 transfectées, avec 100 mM du H₂O₂ pendant 15 min à 37°C.

6. Séparation du CD40h soluble et CD40h insoluble :

Suite à l'induction de l'homodimérisation du CD40, les cellules lavées ont été lysées pendant 45 min sur glace dans le tampon TNE froid (50 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) contenant 1% Triton X-100, 0.2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche Applied Science). La fraction soluble a été séparée de la fraction insoluble (CD40 associés aux radeaux lipidiques et aux cytosquelettes) par une centrifugation à 15000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le culot (fraction insoluble) a été resuspendue dans le même tampon de lyse. Tous les échantillons ont été dilués dans le *Laemmli sample buffer* 5X sous des conditions non-réductrices (sans β -mercaptoethanol), afin de détecter les CD40 homodimères. Ensuite, ils ont été chauffés 5 min à 95°C et résolues par SDS-PAGE (sur un gel polyacrylamide de 10%). Les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA). Après blocage avec du lait 5% TBST (0.1% Tween-20, 10 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl), la membrane a été incubée la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire G28.5 (1:1000), lavée trois fois par le TBST, puis incubée une heure à température pièce avec l'anticorps secondaire GAM-HRP (1:10000), et

finaleme nt révé lée par le Kit ECL *enhanced chemiluminescence* (GEHealthcare Bioscience Inc.).

7. Le traitement avec le diphenyleneiodonium (DPI) :

Les BJAB ou les A20 CD40h-WT (1×10^6 cellules) ont été incubées pendant 16h avec différentes concentrations de DPI (10 μ M ou 100 μ M), connue comme un inhibiteur non spécifique des NOX. Ensuite, nous avons induit l'homodimérisation du CD40h par le G28.5 suivi du GAM-F(ab)₂. Les cellules non stimulées (NS) ont été utilisées comme contrôle négatif.

8. La mesure de la production des ROS :

Les A20 transfectées (0.5×10^6 cellules / tube de FACS) ont été reposées 1h à 37°C dans un milieu DMEM 0% FBS. Suite à un lavage avec du HBS, nous avons stimulé l'homodimérisation du CD40h. Après lavage, nous avons incubé les cellules avec 5 μ M du DHE (dihydroéthidium) 1h à 37°C à l'abri de la lumière. Enfin les cellules ont été analysées par FACS.

9. L'étude de la phosphorylation de p38 :

Les cellules WEHI et WEHI-231 ont été pré-incubées pendant 5 min à 37°C avec le milieu, les anticorps MR-1 ou FGK (1 μ g/100 μ L), ou leurs fragments F(ab), avant d'être stimulées avec le sCD154 (10 μ g/mL). Les cellules non stimulées ont été utilisées comme contrôle négatif. Après lavage, les cellules ont été lysées avec le tampon de lyse supplémenté par des inhibiteurs de protéases. Les protéines ont été résolues sur un gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane PVDF. Après blocage avec du lait 5% TBST, la membrane a été incubée la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire P-p38 (1:1000), ou p38 total (1:1000), lavée trois fois par le TBST, puis incubée une heure à température pièce avec l'anticorps secondaire GAR-HRP (1:10000), et finalement révé lée par le Kit ECL *enhanced chemiluminescence* (GEHealthcare Bioscience Inc.).

10. Le modèle murin C57BL/6 sensibilisé à l'ovalbumine :

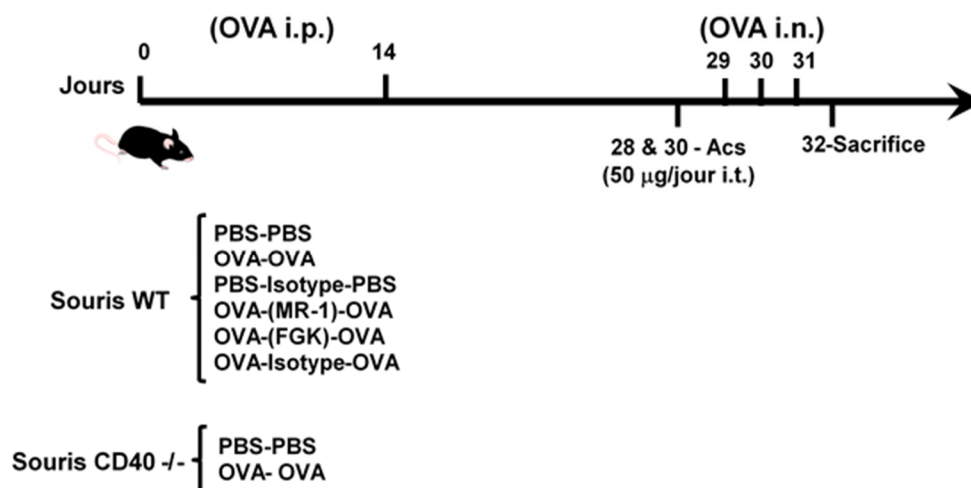


Schéma de la chronologie expérimentale du modèle murin d'hyperréactivité bronchique induite par l'ovalbumine. Les souris mâles C57BL/6 ou C57BL/6 CD40^{-/-} âgées de 6 semaines ont été sensibilisées par voie intrapéritonéale (i.p.) à l'ovalbumine (OVA) les jours 0 et 14 (100 µg d'OVA dans 2 mg d'hydroxyde d'aluminium), suivi par des injections intranasales (i.n.) du jour 29 à 32 (20 µl d'OVA 1% dans du PBS). Certaines souris ont été administrées par voie intratrachéale (i.t.) avec 2 doses d'anticorps MR-1 ou FGK (50µg par jour). Chaque groupe était formé de 5 souris.

10.1. Analyse histologique des tissus pulmonaires.

24 heures après la dernière sensibilisation à l'ovalbumine (OVA), les souris ont été sacrifiées. Des sections de 0.5 µm ont été préparées à partir des poumons et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E).

10.2. Mesure des niveaux d'IgE par ELISA.

Les niveaux des IgE dans les sérums et les lavages BAL des différentes souris C57BL/6 ont été mesurés par ELISA. 50 µL de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'IgE murin à 5µg/mL ont été fixés au fond des puits de la plaque (Maxisorb F96).

Après une incubation de 16h à 4°C, la plaque a été bloquée 2h à température pièce avec du PBS 1% BSA. Une fois lavée, 50 µL du sérum ou du fluide BAL ont été ensuite ajoutés dans chaque puit et laissé incubé pour 16 h à 4°C. Après lavage, 50 µL d'ovalbumine couplé à la biotine ont été ajoutés dans chaque puit et laissés incubé 2h à température pièce. Les puits ont été incubés à l'obscurité avec la Streptavidine couplé au PA (phosphatase alcaline) (1/1000), suivi par la solution substrat. Chaque échantillon a été examiné en dupliquât. La plaque a été analysée par un lecteur d'ELISA à 492 nm. Les courbes standards ont été obtenues en utilisant l'IgE biotinylé. De même les niveaux des IgA ont été mesurés par ELISA et utilisés comme contrôle.

10.3. Hyperréactivité des voies aériennes à la méthacholine.

Les souris ont été exposées à une solution saline, suivi par différentes concentrations de méthacholine (16-256 mg/mL, Sigma-Aldrich) en utilisant le ventilateur flexiVent (Scireq, Montréal, Québec, Canada). La réponse maximale relative à chaque dose de méthacholine par rapport à la valeur initiale a été calculée.

Chapitre 4: Résultats.

1. Les ROS et les NOX dans l'homodimérisation du CD40.

Il a été démontré que l'utilisation du NAC, un antioxydant, atténue la formation des CD40 homodimères. De ce fait, les ROS qui sont produits par les NOX pourraient être impliqués dans l'homodimérisation...

1.1. ROS induisent l'homodimérisation du CD40.

Suite aux transfections des cellules A20 avec le gène codant pour le CD40h WT et muté au niveau du résidu C238, et afin d'obtenir des lignées stables exprimant des niveaux comparables de CD40 à leurs surfaces, nous avons trié les cellules transfectées et les avons maintenu dans un milieu supplémenté avec l'agent sélectif (hygromycine). Quelques jours après le tri cellulaire, nous avons testé le niveau d'expression du CD40h par cytométrie en flux. La figure 1 montre bien que les A20 CD40h-WT et les A20 CD40h-C238A expriment le CD40 à leurs surfaces d'une manière comparable. Les A20 transfectées avec le vecteur vide ont été utilisées comme contrôle négatif.

Par la suite, nous avons réalisé un western blot avec les A20 CD40h-WT (fig.2a) afin de confirmer que les ROS induisent l'homodimérisation du CD40. Les résultats obtenus montrent que la stimulation des cellules A20 CD40h-WT avec le XL, le diamide ou l' H_2O_2 induit la formation des CD40 homodimères (D). Par ailleurs, seule la stimulation avec le XL induit la translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques (partie insoluble, I). Donc le diamide et le H_2O_2 stimulent l'homodimérisation du CD40 mais pas sa translocation. De la même façon, nous avons effectué cette expérience avec le mutant. En effet, avec les A20 CD40h-C238A (fig.2b) nous n'avons

pas observé une formation des CD40 homodimériques (D), dû au fait de l'absence de la Cys²³⁸ responsable de la formation d'un pont disulfure.

1.2. L'homodimérisation du CD40 et la production des ROS.

Nous avons étudié la production des ROS dans les cellules A20 CD40h-WT (fig.3a) et A20 CD40h-C238A (fig.3b) par cytométrie en flux, suite à la stimulation de l'homodimérisation du CD40. Pour ce faire, nous avons stimulé ces cellules avec le XL, le diamide ou le H₂O₂. Des cellules non stimulées (NS) ont été utilisées comme contrôle négatif, et des cellules stimulées avec le H₂O₂, une forme de ROS, utilisées comme contrôle positif. Le diamide est utilisé comme contrôle positif indirecte puisqu'il est un pro-oxydant qui favorise l'oxydation, augmentant ainsi la production des ROS.

Nos résultats montrent une augmentation de la production des ROS, suite aux différents stimuli, par rapport au NS. Par ailleurs, nous remarquons que les A20 CD40h-WT produisent plus de ROS que les mutants. Les ROS sont donc impliqués dans l'homodimérisation du CD40.

1.3. L'homodimérisation du CD40 est NOX-dépendante.

Nous avons étudié l'effet du DPI, un inhibiteur non spécifique des NOX, sur l'homodimérisation du CD40 par western blot, au niveau des cellules B humaines (les BJAB, fig.4A) et des cellules B murines qui ont été transfectées par le CD40h (les A20 CD40h-WT, fig.4B). Les cellules ont été pré-incubées la nuit avec 10 µM ou 100 µM du DPI et ensuite la stimulation de l'homodimérisation du CD40 a été réalisée par XL. Les cellules qui n'ont pas été pré-incubées avec le DPI ont été utilisées comme contrôle positif (XL). Les cellules non stimulées ont été utilisées comme contrôle négatif (NS). La figure 4A montre que suite à une incubation des BJAB avec 10 µM du DPI, la translocation ainsi que l'homodimérisation du CD40 n'ont pas été inhibées. Cependant avec 100 µM du DPI, les monomères du CD40 (M) se trouvent dans la partie soluble, ce qui indique qu'il n'y a pas eu translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques (partie insoluble). De plus, il n'y a pas eu formation des CD40

homodimériques. Donc le DPI (100 μ M) est capable d'inhiber l'homodimérisation et la translocation du CD40 au niveau des Bjab.

Cependant, les résultats de la figure 4B montrent que suite à une incubation des A20 CD40h WT avec 100 μ M du DPI, il y a eu formation des CD40 homodimériques (D). Donc le DPI n'inhibe pas l'homodimérisation du CD40 au niveau des A20 CD40h-WT.

2. L'interaction du CD40/CD154 dans l'asthme.

L'interaction CD40/CD154 joue un rôle important dans différentes maladies inflammatoires tel que l'asthme. Le blocage de cette interaction pourrait empêcher la progression de cette maladie...

2.1. Le knockout du CD40 inhibe l'infiltration cellulaire au niveau des poumons du modèle murin allergique.

Pour étudier l'effet du blocage de la liaison du CD40 avec son ligand, le CD154, sur l'infiltration des cellules inflammatoires dans les tissus pulmonaires chez les souris immunisées à l'ovalbumine, nous avons testé l'influx cellulaire chez les souris CD40 knockout (CD40 KO) (fig.5d). Les souris sauvages (WT) ou CD40 knockout n'ayant pas été immunisées avec l'OVA ont été utilisées comme contrôle négatif (fig.5a et fig.5c respectivement). Des souris WT sensibilisés à l'OVA ont été utilisées comme contrôle positif (fig.5b). En effet, dans (a), (c), et (d) l'infiltration cellulaire n'a pas été observée, alors que dans (b) nous avons observé les cellules inflammatoires infiltrées dans les bronches. Donc l'absence du CD40 (fig.5d) inhibe l'infiltration cellulaire.

2.2. Le knockout du CD40 inhibe la production d'IgE chez les souris allergiques suite à une commutation de classe altérée.

Pour voir l'effet du knockout de CD40, un test d'ELISA a été réalisé afin d'étudier les niveaux d'IgE dans les sérums et les lavages alvéolaires bronchiques des souris immunisées à l'OVA. Des souris non immunisées (PBS-WT) ont été utilisées comme contrôle négatif. Dans la figure 6, nous observons qu'au niveau des souris immunisées CD40 KO (OVA-KO) il n'y a pas de détection d'IgE. Nous ne détectons pas d'IgE ni dans le sérum ni dans le lavage alvéolaire bronchique (BAL), en comparant au souris WT immunisées (OVA-WT), où les quantités d'IgE sont fortement augmentées. En effet, la permutation de classe via CD40 est empêchée, et ainsi pas de production d'IgE.

Vu qu'avec un knockout du CD40 il y a inhibition de l'inflammation pulmonaire et de la production d'IgE, nous avons décidé de bloquer cette interaction en utilisant des anticorps anti-CD40 ou anti-CD154, spécifique à la liaison CD40/CD154.

2.3. MR-1 (anti-CD154) ou FGK (anti-CD40) sont spécifiques au blocage de l'interaction CD40/CD154.

En premier lieu, nous avons étudié l'expression du CD40 et de l' $\alpha 5\beta 1$ au niveau de deux lignées de cellules murines : les WEHI-231 qui expriment le CD40 et sont négatives pour l' $\alpha 5\beta 1$, et les WEHI qui contrairement aux WEHI-231 expriment l' $\alpha 5\beta 1$ et sont négatives pour CD40 (fig.7).

Par la suite, nous avons pré-incubé les cellules WEHI231 et WEHI avec le MR1, ou son fragment F(ab) afin de minimiser le plus possible l'encombrement stérique due à la liaison de l'anticorps (fig.8A). Après cette incubation, nous avons ajouté le sCD154 marqué à l'Alexa-488. Les cellules incubées avec le sCD154-Alexa488 ont été

utilisées comme contrôle positif. Nos résultats montrent qu'au niveau des WEHI-231 (CD40⁺ / α 5 β 1⁻) le CD154 n'a pas pu se lier au CD40 exprimé à la surface, donc l'anticorps MR-1 s'est lié au CD154 et a bloqué l'interaction CD40/CD154 au niveau de ces cellules. Cependant, au niveau des WEHI (CD40⁻ / α 5 β 1⁺) le CD154 s'est lié à l' α 5 β 1, même en présence de MR-1. Donc le MR-1 n'a pas bloqué l'interaction α 5 β 1/CD154. De la même façon, nous avons testé le blocage de l'interaction CD40/CD154 au niveau des WEHI-231. En effet, nous avons incubé les cellules avec l'anti-CD40 FGK (fig.8B). Suite à cette incubation, le CD154 n'a pas pu se lier au CD40 exprimés à la surface. Le FGK a donc bloqué l'interaction CD40/CD154.

Nous avons testé l'activation de la voie p38 des MAPKs (fig.9) suite à la liaison du sCD154 à ses récepteurs CD40 ou α 5 β 1. Afin de bloquer les interactions du sCD154 avec ses récepteurs, nous avons pré-incubé les cellules avec MR-1 ou le fragment F(ab) de cet anticorps (Fig.9A), ou avec FGK ou son fragment F(ab) (Fig.9B). Les cellules incubées seulement avec le sCD154 ont été utilisées comme contrôle positif de l'activation. Les cellules incubées avec du milieu RPMI ont été utilisées comme contrôle négatif. Dans la figure 9.A nous avons observé qu'au niveau des WEHI il y a toujours phosphorylation de la p38 même après incubation avec MR-1. Donc l'anti-CD154 n'a pas bloqué l'interaction α 5 β 1/CD154. Cependant, au niveau des WEHI-231 la phosphorylation de la voie p38 est inhibée après incubation avec MR-1. Donc cet anticorps a bloqué la liaison CD40/CD154. De même, dans la figure 9.B nos résultats montrent qu'au niveau des WEHI-231, la phosphorylation de la voie p38 est inhibée après incubation avec FGK.

Donc les anticorps MR-1 ou FGK inhibent de point de vue fonctionnel et structural, et d'une manière spécifique, la liaison CD40/CD154. Suite à ces résultats nous pouvons aller bloquer l'interaction CD40/CD154 *in vivo* en administrant l'anti-CD154, MR-1, ou l'anti-CD40, FGK, aux souris C57BL/6.

2.4. MR-1 ou FGK inhibent l'influx cellulaire chez les souris allergiques.

Nous avons testé l'impact du blocage de la liaison CD40/CD154 par les anticorps anti-CD154 (MR-1) ou anti-CD40 (FGK). Les souris sauvages (WT) n'ayant pas été administrées ont été utilisées comme contrôle positif (fig.10a). Les souris immunisées à l'OVA ont été administrées par voie intratrachéale (i.t.) avec 50 µg de MR-1 ou de FGK aux jours 28 et 30, et deux jours après elles ont été sacrifiées. Au niveau de ces dernières, l'influx cellulaire n'a pas été observé (fig.10b et fig.10c). Ainsi, l'administration de MR-1 (fig.10b) ou de FGK (fig.10c) chez les modèles immunisés inhibe l'infiltration cellulaire.

2.5. MR-1 ou FGK inhibent la production d'IgE au niveau des poumons.

Pour étudier l'effet du blocage de l'interaction CD40/CD154 suite à l'administration de FGK ou de MR-1, un test d'ELISA a été réalisé afin d'étudier les niveaux d'IgE dans les sérums et les lavages alvéolaires bronchiques des souris immunisées à l'OVA. Les souris non immunisées (PBS-WT) ont été utilisées comme contrôle négatif. Dans la figure 11, nous observons qu'en bloquant la liaison CD40/CD154 par les anticorps MR-1 ou FGK nous remarquons une diminution du niveau d'IgE dans le liquide BAL. Cependant cette diminution n'a pas été observée dans le sérum. Cela s'explique par le fait que les anticorps ont été administrés par voie intratrachéale. Les anticorps ont agi localement et ils ont bloqués spécifiquement les interactions CD40/CD154 pulmonaires.

2.6. MR-1 ou FGK atténuent l'AHR à la Méthacholine.

Un test de stimulation bronchique par la méthacholine (Mch) a été réalisé chez les différentes souris immunisées à l'OVA. Les souris non immunisées ont été utilisées comme contrôle négatif. L'hyperréactivité des voies aériennes (AHR) à la méthacholine ou autrement dit la résistance pulmonaire a été mesurée en utilisant le

flexiVent. La figure 12 étudie l'AHR (ou résistance pulmonaire) des différentes souris par rapport aux différentes doses de Mch. Nous observons que la résistance augmente avec l'augmentation de la dose de la Mch. En effet, nous savons que la méthacholine agit au niveau des cellules musculaires lisses qui tapissent les voies aériennes, causant leur contraction et induisant ainsi l'AHR.

Nos résultats montrent également que l'AHR à la Mch des souris WT immunisées à l'OVA (courbe rose) est la plus élevée, alors que celle des souris non immunisées (courbe turquoise) est la plus faible. En effet, nous avons utilisés les souris non immunisées comme contrôle négatif, et les souris WT-OVA comme contrôle positif. Chez les souris immunisées CD40 KO (courbe marron) l'AHR est inhibée. En effet, nous avons plus ou moins la même réponse qu'avec le contrôle négatif (courbe turquoise). Donc c'est le CD40 qui induit l'AHR. D'autre part, en bloquant la liaison du CD40 à son ligand CD154, au niveau des souris immunisées, nous avons atténués l'hyperréactivité. En effet au niveau des souris qui ont été administrées par les anticorps MR1 (courbe noire) ou FGK (courbe bleue) nous remarquons une forte baisse de la résistance par rapport au WT-OVA. Ainsi, les anticorps MR1 et FGK ont atténué l'AHR à la Mch chez les souris immunisées à l'OVA.

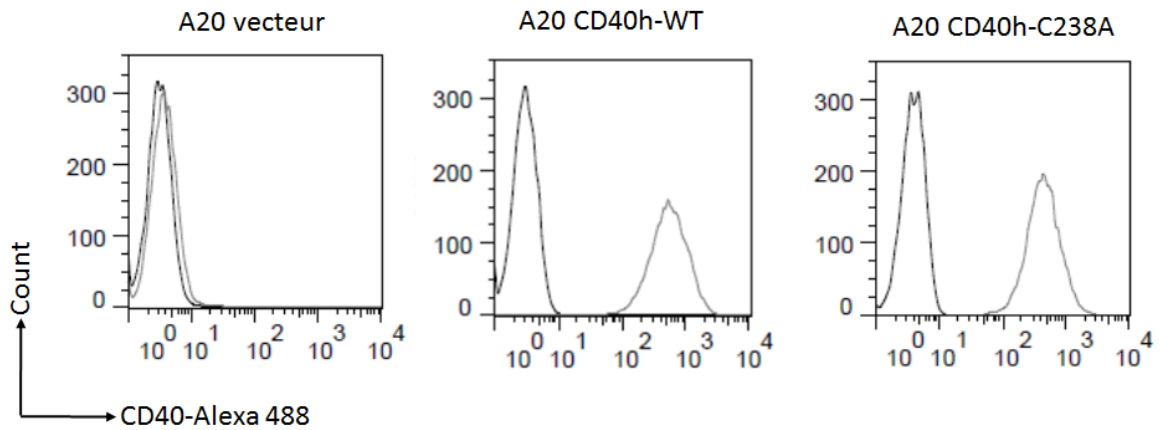


Figure 1 : Niveau d'expression du CD40h à la surface des cellules A20 transfectées. 72h après la transfection, les cellules transfectées avec le CD40 sauvage (WT) ou muté (C238A) ont été triées et analysées par FACS afin de tester le niveau d'expression du CD40h. Les A20 transfectées avec un vecteur vide (vecteur) ont été utilisées comme contrôle négatif. Les cellules ont été incubées 30min à 4°C avec l'isotype contrôle biotinylé ou le G28.5 biotinylé (G28.5-B), suivi par 30min à 4°C avec la Streptavidine-Alexa488. Après lavage, les cellules ont été analysées par FACS-Calibur. Le trait noir correspond aux cellules incubées avec l'isotype contrôle, et le trait gris correspond aux cellules incubées avec le G28.5-B. Cette expérience a été répétée au moins trois fois.

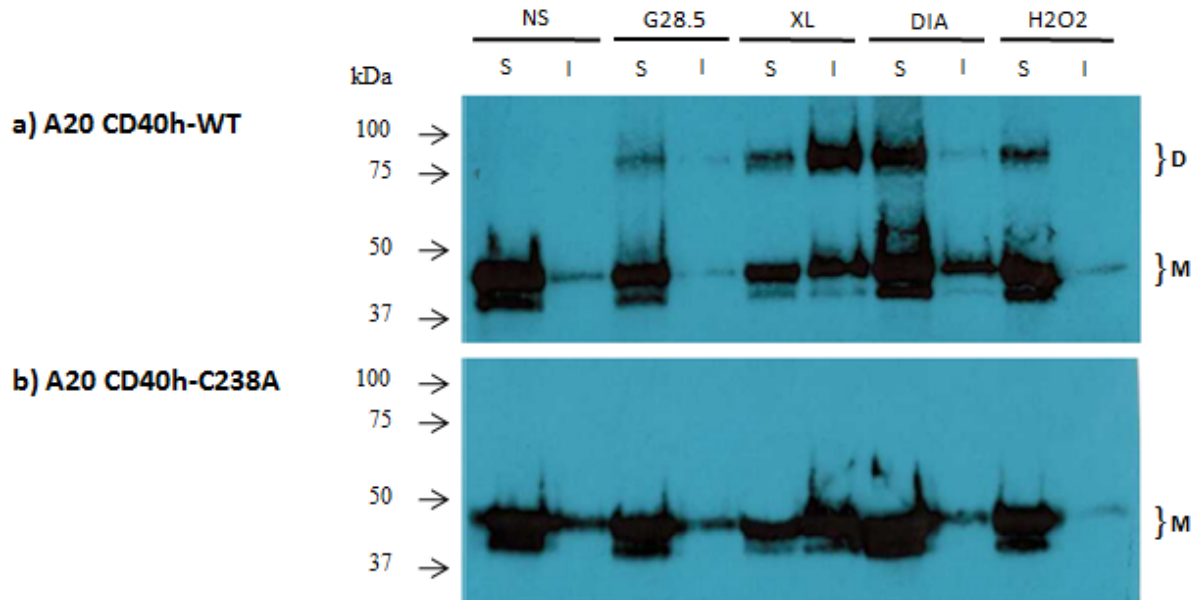


Figure 2 : Les ROS induisent la formation du CD40 homodimère. La stimulation de l'homodimérisation a été réalisée par l'ajout de l'anticorps anti-CD40 (G28.5) tout seul pendant 30 min sur glace (*G28.5*), ou par l'anti-CD40 suivi pour 5 min de plus à 37°C avec le fragment Fab'₂ du GAM (*XL*), ou par le diamide (*DIA*) ou le peroxyde d'hydrogène (*H₂O₂*) pendant 15 min à 37°C. Après lavage, les cellules ont été lysées 45 min dans du Triton X-100 1%. La fraction soluble (*S*) a été séparée de la fraction insoluble (*I*) par une centrifugation de 15000 rpm pendant 30 min à 4°C. Ces fractions ont été analysées sur SDS-PAGE dans des conditions non réductrices en utilisant le G28.5 suivi par le GAM-HRP. (M) et (D) correspondent respectivement aux CD40 monomériques et CD40 homodimériques. Cette expérience a été répétée au moins trois fois.

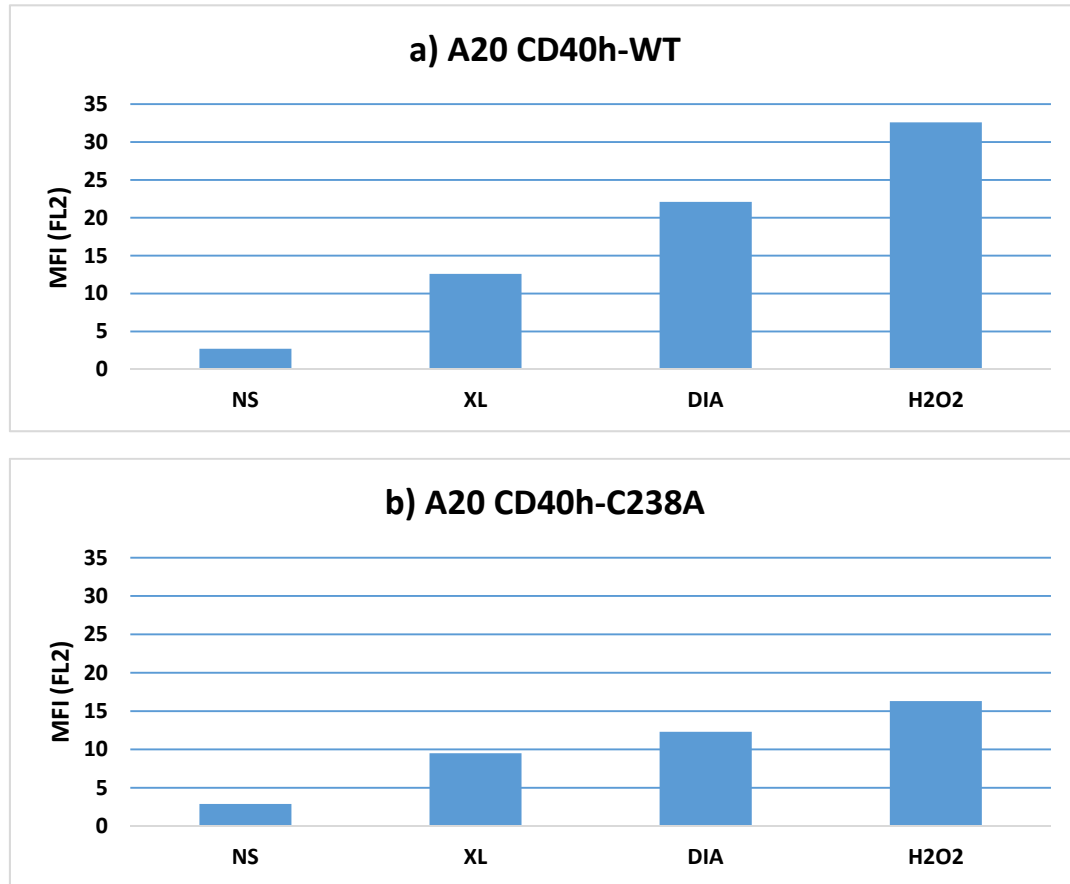


Figure 3: La production des ROS suite à la stimulation de l'homodimérisation du CD40. Suite à la stimulation de la dimérisation par le cross-linking (XL), le diamide (DIA), ou le H₂O₂ comme déjà décrit dans 'matériels et méthodes', les cellules ont été incubées avec le DHE 1h à 37°C à l'obscurité, puis analysées par FACS. Dans ces histogrammes les axes des abscisses représentent les différentes stimulations, et les axes des ordonnées présentes les moyennes de fluorescences. Les valeurs représentées dans ces graphiques représentent la moyenne des triplicats.

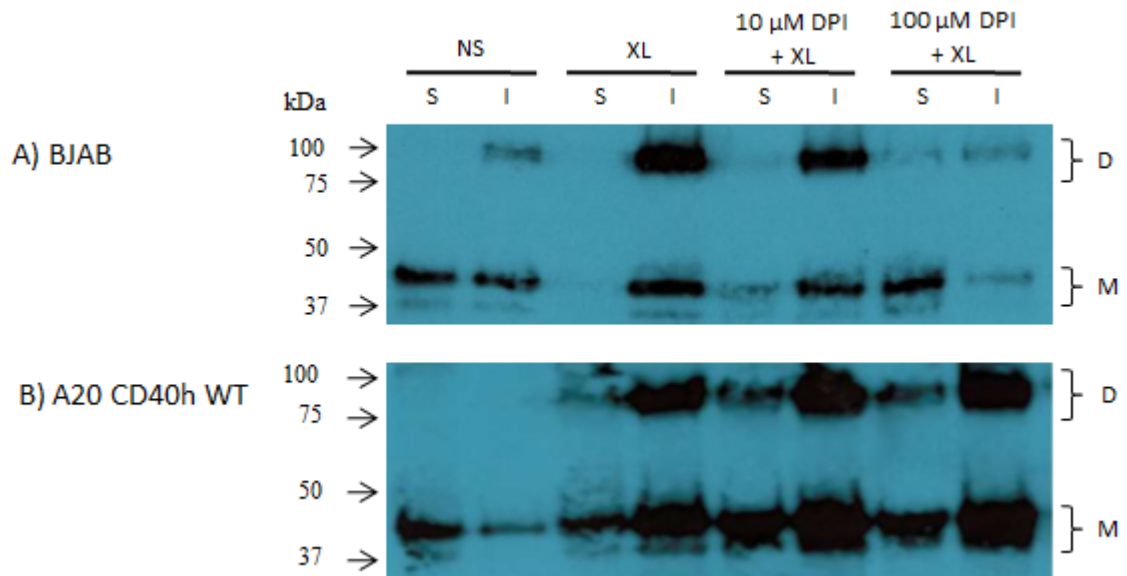


Figure 4 : Le DPI inhibe la formation du CD40 homodimère au niveau des cellules BJAB mais pas au niveau des A20. Les cellules BJAB (A) et A20 CD40h WT (B) ont été incubées la nuit avec le DPI (10 μM ou 100 μM). Par la suite, la stimulation de l'homodimérisation a été réalisée par cross-linking (XL). Les cellules non stimulées (NS) ont été utilisées comme contrôle négatif, et celles sans DPI mais qui ont été stimulées par le cross-linking (XL) ont été utilisées comme contrôle positif. Cette expérience a été répétée trois fois.

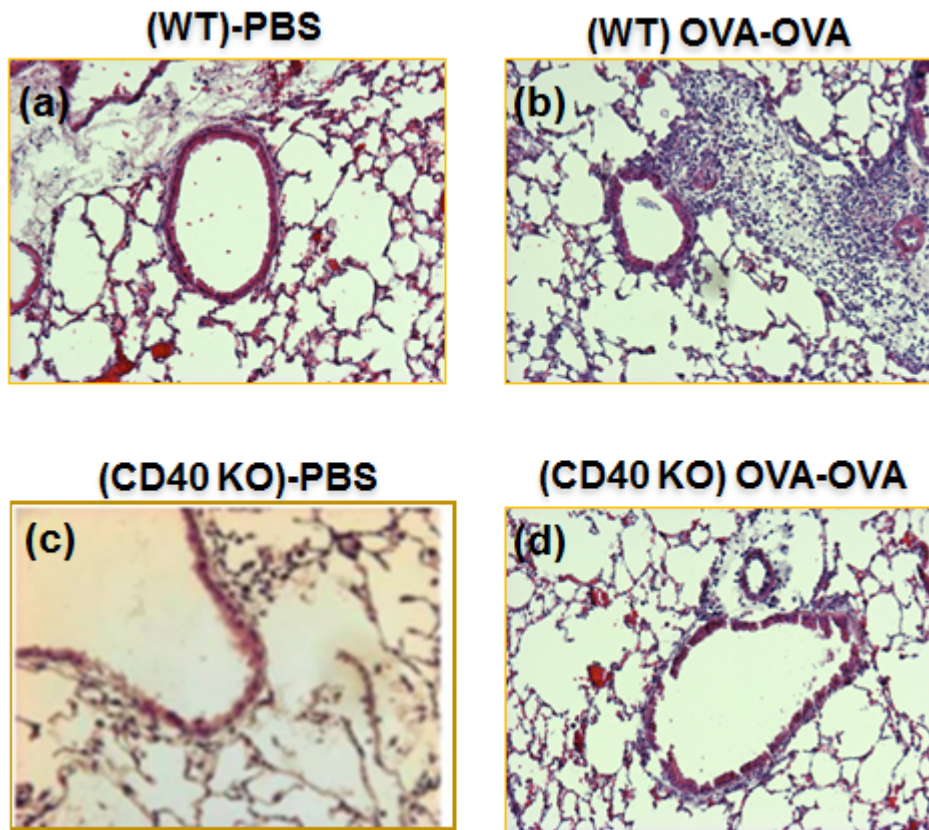


Figure 5 : Le knockout du CD40 inhibe l'infiltration cellulaire dans les poumons des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine. Des sections de 0.5 μm ont été préparées à partir des poumons et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Grossissement original: 100X. Les sections (c) et (d) proviennent de souris knockout CD40 (CD40 KO), alors que (a) et (b) proviennent de souris sauvages (WT). Les sections des souris sensibilisées à l'ovalbumine (OVA) sont (b) et (d). Cette expérience a été répétée trois fois.

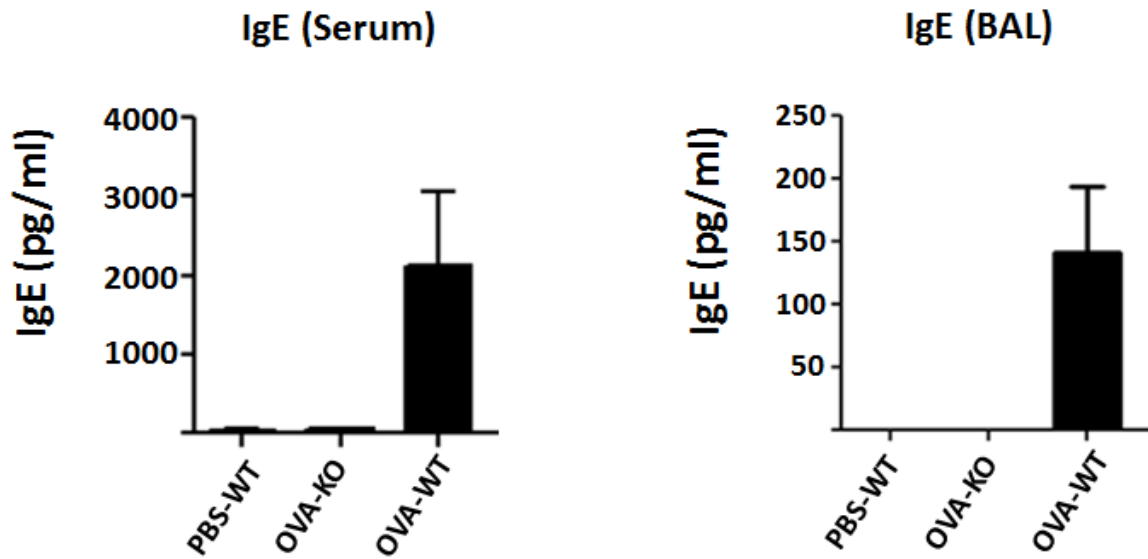


Figure 6 : Le knockout du CD40 inhibe la commutation de classe isotypique vers l'IgE, et ainsi absence d'IgE dans le sérum et dans le BAL. Ces histogrammes représentent les concentrations (en pg/ml) d'IgE mesurées par ELISA, dans les sérums et les lavages broncho alvéolaire des souris immunisées à l'ovalbumine CD40 knockout (OVA-KO). Les souris sauvages non immunisées (PBS-WT) ont été utilisées comme contrôle négatif et les souris sauvages immunisées (OVA-WT) ont été utilisées comme contrôle positif. Ces histogrammes représentent la moyenne des triplicatas d'au moins trois expériences différentes.

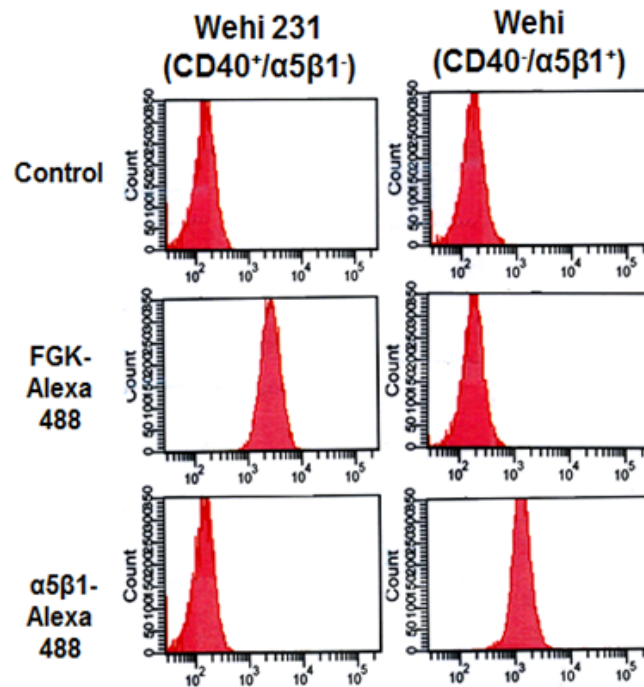


Figure 7 : Niveau d'expression du CD40m et de l'α5β1m à la surface des cellules WEHI-231 et WEHI. Nous avons testé l'expression du CD40m et de l'α5β1m à la surface des cellules Wehi 231 (CD40⁺/α5β1⁻) et Wehi (CD40⁻/α5β1⁺) par cytométrie en flux. Les cellules ont été incubées 30 min sur glace avec le FGK ou l'anti α5β1m couplés à l'Alexa-488. Après lavage, les cellules ont été analysées par FACS-Calibur. Les cellules non marquées ont été utilisées comme contrôle. Cette expérience a été répétée trois fois.

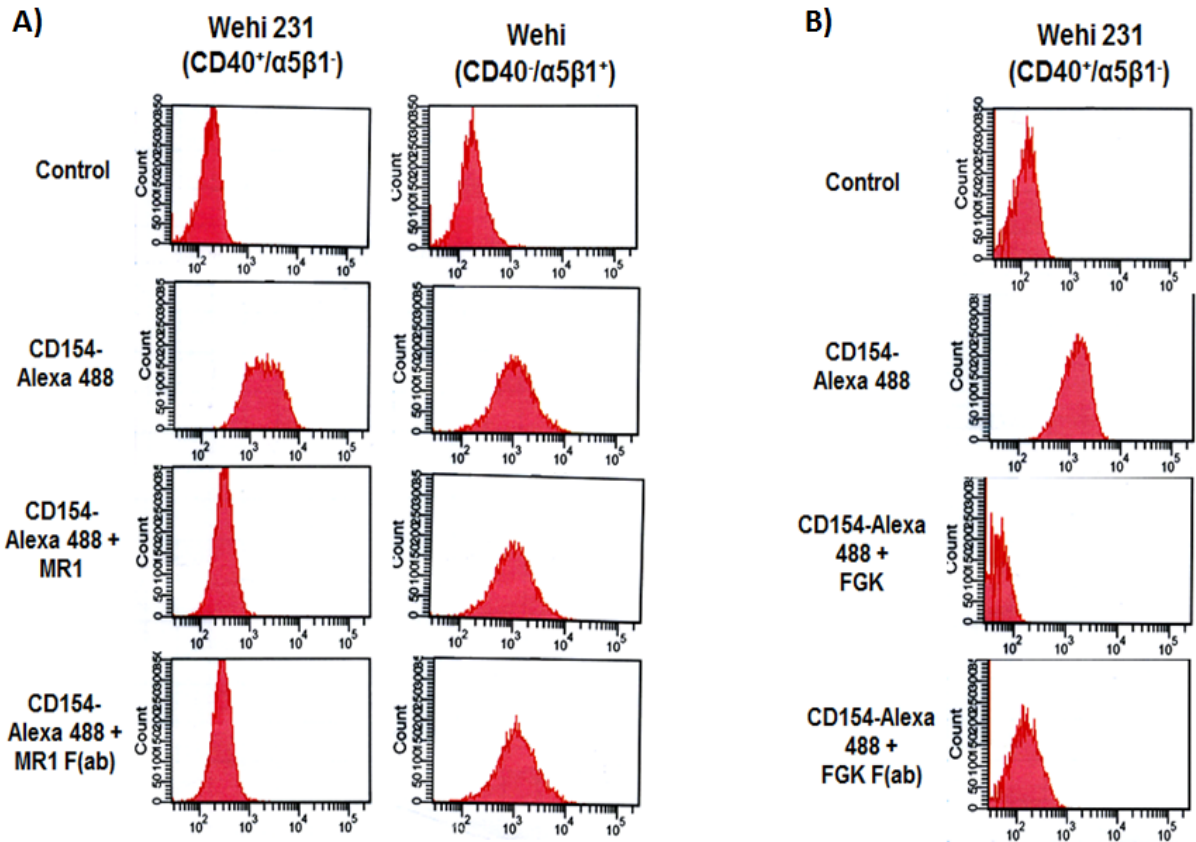


Figure 8 : MR-1 (anti-CD154) ou FGK (anti-CD40) bloquent la liaison CD40/CD154. Suite à une incubation des cellules Wehi 231 et Wehi avec MR1 ou son fragment F(ab), nous avons testé la reconnaissance par cytométrie en flux du sCD154-Alexa 488 à CD40 ou à l'α5β1 (A). De même, suite à l'incubation des Wehi 231 avec FGK ou son fragment F(ab), nous avons testé la reconnaissance du sCD154-Alexa 488 à CD40 (B). Les cellules non marquées ont été utilisées comme contrôle. Cette expérience a été répétée trois fois.

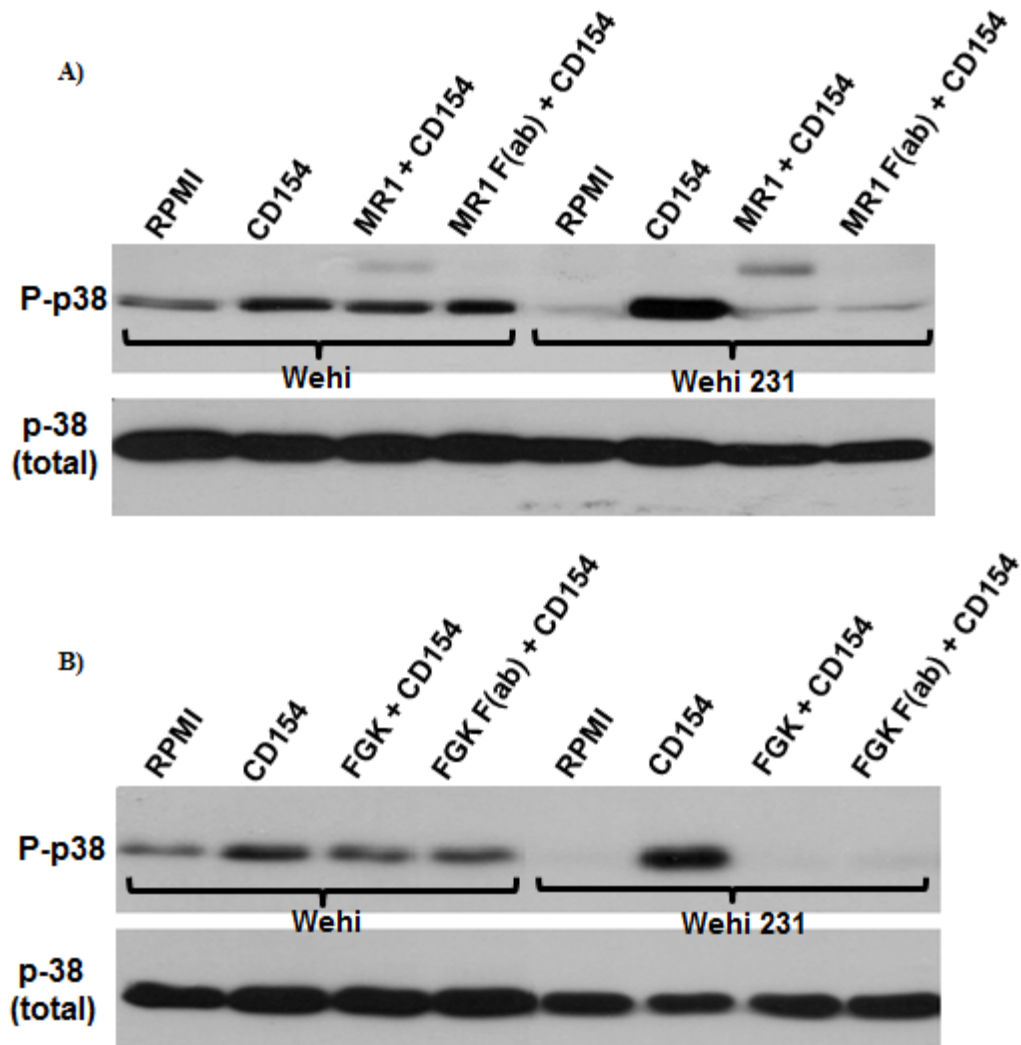


Figure 9 : L'inhibition de la phosphorylation de p38 MAPK par l'anti-CD154 (MR1) et l'anti-CD40 (FGK). Les cellules, WEHI et WEHI-231, ont été pré-incubées pendant 5 min avec MR1 (A) ou FGK (B) et ensuite stimulées avec le CD154 soluble pendant 5 min. Après lavage, la phosphorylation de p38 a été analysée par western blot en utilisant des anticorps anti-p38 phosphorylé (P-p38) ou anti-p38 total (p38). Cette expérience a été répétée trois fois.

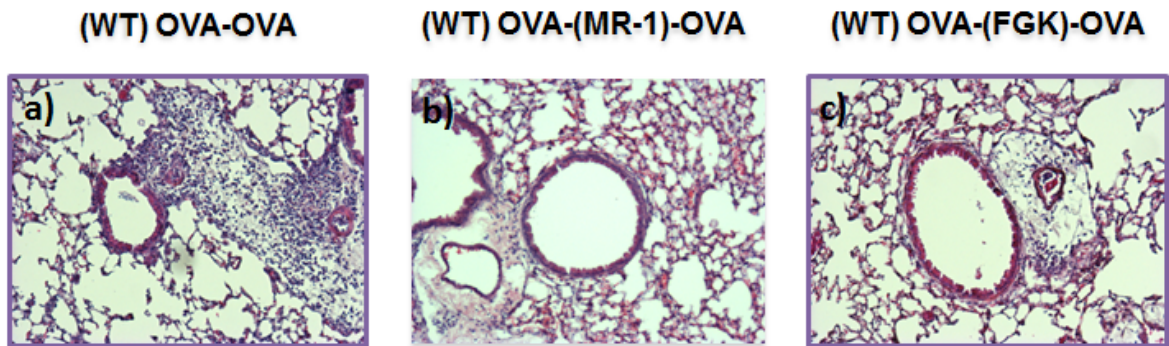


Figure 10 : MR-1 ou FGK inhibent l'infiltration cellulaire dans les poumons des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine. Des sections de 0.5 μ m ont été préparées à partir des poumons des souris sauvages sensibilisées à l'OVA, et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Grossissement original: 100X. Les sections des souris ayant été administrées par MR-1 ou FGK sont (b) et (c) respectivement. Des souris n'ayant pas été administrées ont été utilisées comme contrôle. Cette expérience a été répétée trois fois.

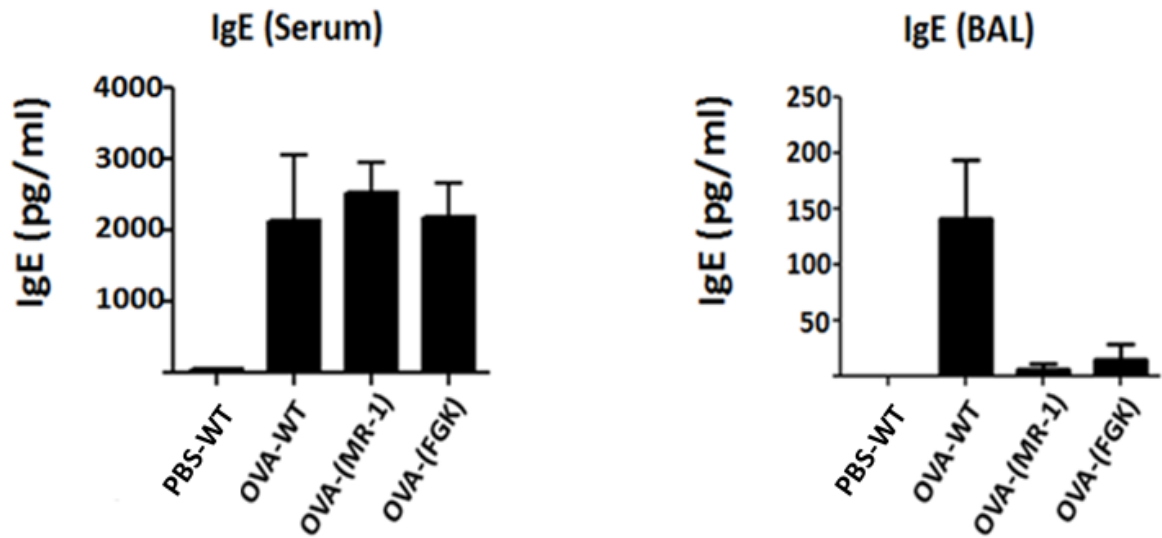


Figure 11 : MR-1 ou FGK inhibent la production d'IgE dans les poumons des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine. Ces histogrammes représentent les concentrations (en pg/ml) des immunoglobulines IgE, mesurées par ELISA, chez les souris immunisées: sauvages (OVA-WT), administrées avec l'anti-CD154 (OVA-(MR-1)), et celles administrées avec l'anti-CD40 (OVA-(FGK)). Les souris sauvages non immunisées (PBS-WT) ont été utilisées comme contrôle. Ces histogrammes représentent la moyenne des triplicatas d'au moins trois expériences différentes.

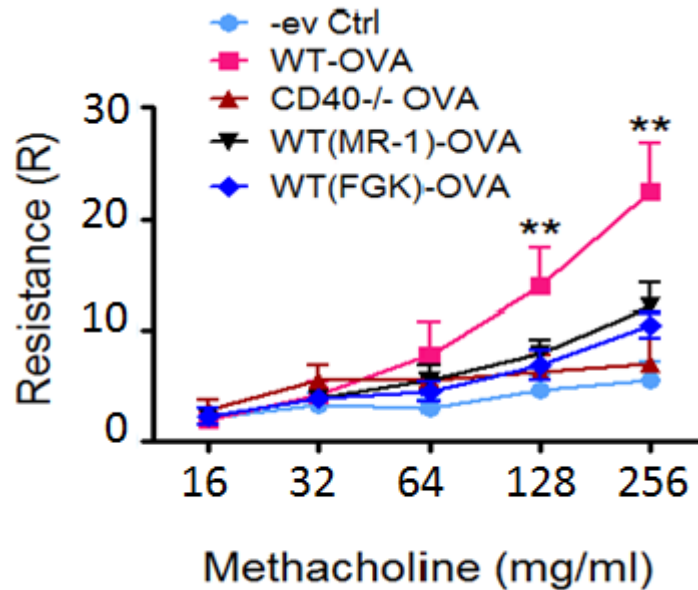


Figure 12 : L’hyperréactivité bronchique (AHR) des différentes C57BL/6 à la méthacholine. Ces différents graphes représentent l’hyperréactivité bronchique (ou résistance pulmonaire) aux différentes doses de méthacholine. En bref, les souris ont été exposées à une solution saline, suivi par le doublement des concentrations de méthacholine dans l’air (16-256 mg/mL) en utilisant le ventilateur flexiVent. La réponse maximale relative à chaque dose de méthacholine par rapport à la valeur initiale a été calculée. Le blocage de l’interaction CD40/CD154 avec les anticorps MR-1 ou FGK atténue l’AHR à la méthacholine chez les souris immunisées à l’OVA. Les valeurs représentées dans ces graphiques représentent la moyenne des triplicats.

Chapitre 5: Discussion.

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I ayant un poids moléculaire de 45-50 kDa. Il appartient à la superfamille des TNFRs, et il est exprimé d'une façon constitutive sur les cellules B, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les basophiles, et les éosinophiles. Son principal ligand, le CD154 ou CD40L, est exprimé sur les plaquettes et les lymphocytes T activés. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type II avec un poids moléculaire de 33 kDa. Elle se retrouve sous forme soluble ou membranaire. La trimérisation de cette molécule par des liaisons non covalentes est primordiale pour son activité biologique.

Outre le rôle biologique dans la réponse immunitaire, la liaison CD40/CD154 est impliquée dans divers maladies inflammatoires et auto-immunes, telle que l'asthme. Il a été démontré que l'expression du CD40 et CD154 est augmentée d'une façon significative lors de ces maladies. Inhiber la liaison CD40/CD154 par des anticorps anti-CD154 ou anti-CD40 s'est avéré bénéfique dans différentes pathologies (lupus et arthrite), mais cette inhibition a des effets secondaires graves telle que la thrombose, vu que le CD154 et le CD40 sont exprimés d'une façon importante à la surface des plaquettes. Une voie thérapeutique alternative serait alors idéale, et c'est pourquoi nous avons décidé d'aller étudier l'homodimérisation du CD40 induite suite à sa liaison avec le CD154. Pour ce faire, il faut identifier les mécanismes par lesquels un CD40 homodimère se forme et la conséquence biologique de cette homodimérisation.

En effet, la présence des CD40 homodimères a été décrite depuis 1989 [68]. Récemment, notre équipe a démontré que le CD40 homodimérique peut être présent à des faibles niveaux à la surface des lymphocytes B, et ce niveau est augmenté d'une façon significative suite à la liaison au CD154 trimérique, ou à un cross-linking d'anticorps. Vu que la plupart des liaisons disulfures sont médiées par deux cystéines lors de l'oxydation par les ROS [205, 206], nous avons démontré que cette homodimérisation est médiée par un pont-disulfure qui se forme entre deux cystéines à la position 238 (Cys²³⁸).

De plus, suite à sa liaison avec le CD154 trimérique, le CD40 s'homotrimérise. Cette association induit la migration de ce complexe vers les radeaux lipidiques (RLs), là où l'homodimérisation du CD40 se forme. Nous avons démontré que cette migration vers les RLs est indépendante des voies PI-3K, p38 MAPK, ou des kinases de la famille SRC, et que la translocation du CD40 vers les RLs nécessite la présence de son domaine transmembranaire.

Dans le but de savoir quels sont les mécanismes qui sont impliqués dans la formation du CD40 homodimère, une première étude nous a permis de suggérer que les ROS y sont impliqués, puisqu'un traitement des cellules B avec l'antioxydant NAC a diminué la formation de ces homodimères [66]. Pour confirmer l'implication des ROS dans l'homodimérisation, nous avons incubé les A20 CD40h-WT avec le diamide, un pro-oxydant, ou avec le H₂O₂, une forme de ROS, et suite à ces incubations nous avons observé une formation des CD40 homodimériques, qui est indépendante de la liaison avec le CD154 (chapitre 4, fig.2). Cependant, nous n'avons pas remarqué d'homodimérisation avec les A20 CD40h-C238A (chapitre 4, fig.2). D'où nous avons conclu que les ROS sont impliqués dans la formation des CD40 homodimères par l'induction de l'oxydation du groupe thiol présent dans la Cys²³⁸.

D'autre part, il a été rapporté que les ROS sont produits dans des cellules B murines après l'engagement du CD40 [207]. Afin de savoir si la production des ROS est augmentée lors de l'homodimérisation du CD40, nous avons testé cette production par les A20 CD40h-WT (chapitre 4, fig.3a) et les A20 CD40h-C238A (chapitre 4, fig.3b) suite aux différents stimuli décrits plus haut. En effet, nous avons observé une production des ROS plus importante au niveau des A20 CD40h-WT. Ainsi, nous suggérons que l'homodimérisation du CD40 et les rôles biologiques qu'elle induit augmentent la production des ROS.

Ensuite, nous avons voulu connaître par quelle voie les ROS sont produites suite à l'engagement du CD40. Pour cela, nous avons ciblé les NADPH Oxydases (NOX), source majeure non-mitochondriale des ROS à l'intérieur des cellules. Puisqu'il existe plusieurs isoformes de NOX, nous avons incubé les cellules B avec le DPI, un

inhibiteur non spécifique des NOX. Nous avons observé que suite à une incubation avec le DPI, ce dernier a bloqué la formation des CD40 homodimériques au niveau des BJAB (chapitre 4, fig.4A). De plus, il n'y a pas eu translocation des CD40 vers les RLs. Donc nous suggérons que NOX sont impliqués dans la translocation et l'homodimérisation du CD40. Ainsi, nous avons conclu que les NOX produisent les ROS qui induisent à leur tour l'oxydation du groupe thiol au niveau de la Cys²³⁸. Par ailleurs, les RLs sont riches en NOX qui produisent les ROS induisant à leur tour l'oxydation de la Cys²³⁸. Il est important de mentionner que l'homodimérisation induite par les ROS (chapitre 4, fig.2a) a eu lieu dans les parties solubles. Ainsi, nous avons créé un stress oxydatif en augmentant la quantité des ROS intracellulaire. Donc, l'homodimérisation a été forcée puisque la partie soluble était riche en ROS. En outre, les NADPH oxydases tel que NOX2 dépendent de l'intégrité des RLs afin de produire des ROS [200]. Cela explique le fait qu'en utilisant le M β CD, agent perturbateur de l'intégrité des RLs, nous avons inhibé l'homodimérisation. Ainsi, cette perturbation des micros domaines affecte l'activité des NOX qui ne produisent plus de ROS, et n'induisent non plus l'homodimérisation du CD40.

Cependant, nous avons observé que le DPI n'a pas inhibé l'homodimérisation du CD40 au niveau des cellules murines A20 CD40h-WT (chapitre 4, fig.4B). Il est bien connu que NOX5 n'est pas exprimé au niveau des cellules murines [208]. D'où, nous suggérons qu'au niveau des BJAB c'est l'isoforme NOX5 qui produit les ROS impliqués dans l'homodimérisation du CD40 et qu'au niveau des A20 CD40h-WT un autre mécanisme y intervient. Pour confirmer l'implication de NOX5, la prochaine étape serait d'inhiber spécifiquement cette isoforme.

Une importante homologie existe entre le CD40 humain et le CD40 murin (fig.1). De ce fait, nous avons étudié le rôle du CD40 *in vivo* dans un modèle de souris C57BL/6 que nous avons immunisé à l'ovalbumine (chapitre 3, schéma).

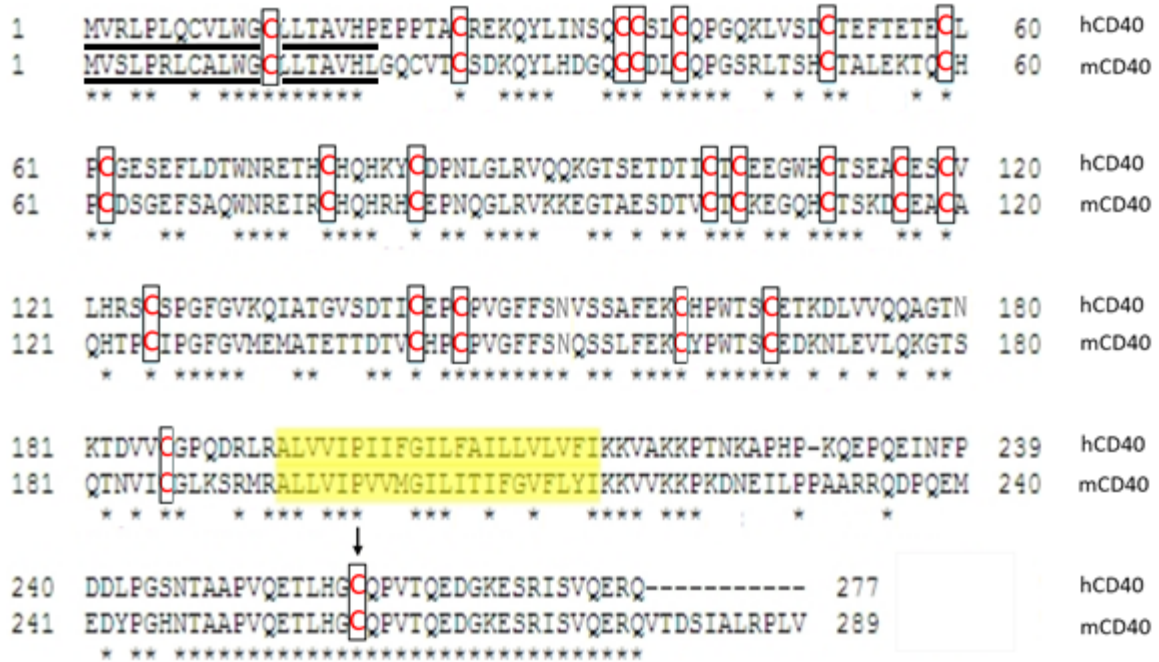


Figure 1: L'homologie entre les séquences peptidiques du CD40 humain (CD40h) et du CD40 murin (CD40m). Les 20 premiers acides aminés (aa) sous-lignés correspondent à la séquence *leader* du CD40. Le domaine transmembranaire du CD40 est surligné en jaune. Les étoiles représentent les aa conservés entre les deux espèces. Les résidus cystéines sont coloriés en rouge. La flèche représente la Cys²³⁸ qui est responsable de l'homodimérisation.

Nous avons bloqué l'interaction CD40/CD154 en utilisant des anticorps anti-CD154m (MR-1) ou anti-CD40m (FGK), après avoir testé leur spécificité *in vitro* (chapitre 4, fig.8 et fig.9). Nous avons vu que le blocage de la liaison CD40/CD154 par MR-1 ou FGK inhibe l'infiltration cellulaire aux niveaux des poumons des souris allergiques (chapitre 4, fig.10). Ainsi, nous suggérons que l'inhibition de la liaison CD40/CD154 a bloqué la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α) et l'expression des chimiokines (MCP-I, RANTES) et des molécules d'adhésions (ICAM-I, VCAM-I) [100], et donc il n'y aura pas d'induction de la chimio taxie et ainsi pas d'infiltration leucocytaire.

D'autre part, nous voulons savoir l'effet du blocage du couple CD40/CD154 sur la production d'IgE. Il a été démontré que le CD40 au niveau des cellules B joue un rôle important dans la permutation de classe des Igs menant à la synthèse d'IgE. Dans des conditions allergiques, la production élevée d'IgE par les lymphocytes B induit l'initiation et le développement des réponses inflammatoires, et induit l'activation des mastocytes, des monocytes et des cellules dendritiques via leurs récepteurs d'IgE (FcεRI ou FcεRII). En administrant les anticorps MR-1 ou FGK par la voie intratrachéale au souris allergiques, nous avons bloqué les liaisons CD40/CD154 d'une manière localisée au niveau des voies aériennes, sans avoir affecté ces interactions ailleurs. C'est pourquoi en bloquant ces liaisons, nous avons observé une diminution des niveaux d'IgE dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire (BAL), alors que les quantités d'IgE sériques n'ont pas été affectées (chapitre 4, fig.11).

De plus, nous avons démontré que le blocage de l'engagement du CD40 par CD154 atténue l'AHR à la méthacholine (chapitre 4, fig.12). En effet en bloquant l'interaction, la résistance pulmonaire a été diminuée et donc l'air y circule plus facilement. Nous suggérons qu'en bloquant cette liaison, nous avons atténué l'épaississement de la paroi des voies aériennes qui pourrait être causé par l'infiltration cellulaire.

Suite au blocage de l'interaction CD40/CD154 dans un modèle d'asthme chez des souris C57BL/6 immunisées à l'ovalbumine nous avons atténué les signes cliniques de cette maladie. De plus, vu l'homologie qui existe entre le CD40 humain et le murin qui se traduit surtout par la conservation de la Cys²³⁸, nous voudrions générer un modèle de souris asthmatique Knock in dans lequel nous allons substituer cette cystéine en une alanine, afin d'étudier le rôle biologique du CD40 homodimère.

Chapitre 6 : Conclusion et Perspectives.

Dans notre étude, nous avons réussi à induire l'homodimérisation du CD40 par les ROS, indépendamment du CD154. En effet, nous avons étudié la formation du CD40 homodimérique, au niveau d'une lignée de cellules B murines (A20) transfectées avec le CD40h, suite à la stimulation par le diamide, un pro-oxydant, ou le H₂O₂, une forme de ROS. D'autre part, nous avons réussi à inhiber cette homodimérisation, au niveau d'une lignée humaine de cellules B (BJAB), par le DPI qui inhibe les NOX d'une manière non spécifique.

Nos prochaines expériences sont premièrement d'inhiber d'une manière spécifique NOX5 au niveau des lymphocytes B, par la méthode des petits ARN interférents (siNOX5) ou bien par la technique de CRISPR-Cas9. Ensuite, d'étudier l'impact de l'inhibition des NOX sur le rôle biologique du db-CD40 homodimère. En effet, un test d'activation de la voie de PI3K et ainsi la phosphorylation de l'Akt par western blot, et un test d'expression de la molécule co-stimulatrice B7-2 par FACS seront établies. D'autre part, la GTPase Rac peut également activer les NADPH oxydases. En effet, Rac-1 se localise dans les radeaux lipidiques où elle active NOX, et stimule la production de ROS. Pour déterminer si elle est impliquée dans l'homodimérisation du CD40 nous allons stimuler la dimérisation par le cross-linking (XL) puis traiter les cellules B avec un inhibiteur de Rac-1.

Par ailleurs, nous avons réussi à inhiber la réaction allergique au niveau des souris C57BL/6 sensibilisées à l'ovalbumine. En effet, nous avons démontré l'inhibition de l'inflammation pulmonaire, l'atténuation de l'hyperréactivité bronchique, et le blocage de la production d'IgE au niveau des poumons, suite au blocage de l'interaction CD40/CD154 par les anticorps anti-CD154 (MR-1) ou anti-CD40 (FGK).

Actuellement, nous sommes en train de générer des souris Knock-in exprimant le CD40 mutant qui ne forme pas des homodimères (CD40-C238A). En utilisant le même modèle de souris immunisées à l'ovalbumine, nous voulons élucider le rôle des db-

CD40 homodimères dans le développement de l'inflammation des voies respiratoires. Au jour 32, les souris seront sacrifiées et les tissus seront récoltés et fixés dans du formol tamponné à 10% et incorporé dans la paraffine. Des coupes de 0,5 µm seront préparées à partir des poumons et colorées à l'hématoxyline et l'éosine et examinées. De plus, l'AHR induite par la méthacholine sera mesuré comme décrite précédemment. D'autre part, nous évaluerons les concentrations sériques et les concentrations dans le lavage alvéolaire bronchique d'IgE par ELISA. Pour les différentes expériences, des souris déficientes en CD40 seront utilisées comme contrôle.

De plus, nous voudrions tester l'homodimérisation du CD40 au niveau des cellules B humaines provenant de patients asthmatiques, comparée à celle des cellules B de donneurs sains. Suite à la purification des lymphocytes B de ces 2 groupes, le test d'homodimérisation du CD40 sera réalisé par western blot.

Enfin, en bloquant la liaison du CD40 à son principal ligand CD154, nous avons atténué l'asthme chez notre modèle de souris C57BL/6 immunisé à l'ovalbumine, vu que nous avons atténué les caractéristiques de cette maladie. Le blocage de cette liaison pourrait représenter une méthode thérapeutique qui traite les maladies allergiques. Jusqu'à nos jours, il n'existe pas une thérapie qui guérie l'asthme, En effet, tous les médicaments utilisés sont des anti-inflammatoires à base de glucocorticoïdes, des bronchodilatateurs et des antihistaminiques, qui aident à soulager les symptômes. Par exemple, l'Omalizumab (anticorps humanisé anti-IgE) [209], ou le Mepolizumab (anticorps humanisé anti-IL5) [210], sont des traitements actuellement utilisés. Ainsi, nos résultats nous permettront de mettre en place de nouvelles approches et cibles thérapeutiques afin d'atténuer les réponses inflammatoires induites par l'exposition aux allergènes.

Bibliographie

1. Paulie S, E.-H.B., Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P., *Ap50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother* 1985. **20(1)**: p. 23-28.
2. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67(1)**: p. 2-17.
3. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58(1)**: p. 4-43.
4. Santilli, F., et al., *CD40/CD40L system and vascular disease*. *Intern Emerg Med*, 2007. **2(4)**: p. 256-68.
5. Danese, S. and C. Fiocchi, *Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease*. *Crit Rev Immunol*, 2005. **25(2)**: p. 103-21.
6. Tan, J., et al., *CD40 is expressed and functional on neuronal cells*. *Embo J*, 2002. **21(4)**: p. 643-52.
7. Klein, D., et al., *CD40 activation in human pancreatic islets and ductal cells*. *Diabetologia*, 2008.
8. 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.
9. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. *Science*, 2000. **288(5475)**: p. 2351-4.
10. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. *Trends Biochem Sci*, 1998. **23(2)**: p. 74-9.
11. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. *Microsc Res Tech*, 2000. **50(3)**: p. 184-95.
12. 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.
13. Aggarwal B.B, *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003 Sep. **3(9)**: p. 745-56.
14. Hollenbaugh, D., et al., *The role of CD40 and its ligand in the regulation of the immune response*. *Immunol Rev*, 1994. **138**: p. 23-37.
15. Gruss, H., J. Duyster, and F. Herrmann, *Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease*. *Ann Oncol*, 1996. **7 Suppl 4**: p. 19-26.
16. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. *Eur J Immunol*, 1995. **25(6)**: p. 1749-54.
17. Fischer, K.P., et al., *Identification and characterization of functional CD154 (CD40 ligand) in the Pekin duck*. *Dev Comp Immunol*, 2007. **31(1)**: p. 61-71.
18. Yacoub, D., et al., *CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2013. **288(50)**: p. 36083-93.
19. Karpusas, M., et al., *2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand*. *Structure*, 1995. **3(12)**: p. 1426.
20. Fanslow, W.C., et al., *Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function*. *Semin Immunol*, 1994. **6(5)**: p. 267-78.

21. Kaufman, J., P.J. Sime, and R.P. Phipps, *Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1862-71.
22. 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.
23. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
24. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
25. Leveille, C., et al., *CD40 Ligand Binds to {alpha}5beta1 Integrin and Triggers Cell Signaling*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(8): p. 5143-5151.
26. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
27. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
28. Hassan GS, Y.D., Alaaeddine N, Nadiri A, Merhi Y, Mourad W., *CD154: the atherosclerotic risk factor in rheumatoid arthritis?* Arthritis Res Ther., 2013 Feb 22. **15**(1): p. 206.
29. Hassan, G.S., et al., *Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses*. Curr Immunol Rev, 2009. **5**: p. 285-299.
30. 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.
31. El Fakhry, Y., et al., *Functional Interaction of CD154 Protein with alpha5beta1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to alpha11beta3 Integrin and CD40 Molecules*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 18055-66.
32. Dahlback B, *Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S*. Biochem J., 1983 Mar 1. **209**(3): p. 847-56.
33. Williams, K.T., et al., *C4b binding protein binds to CD154 preventing CD40 mediated cholangiocyte apoptosis: a novel link between complement and epithelial cell survival*. PLoS One, 2007. **2**(1): p. e159.
34. Walport MJ, *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001 Apr 5. **344**(14): p. 1058-66.
35. Blom AM, V.B., Dahlback B, *Complement inhibitor C4b-binding protein--friend or foe in the innate immune system?* mol Immunol., 2004. **40**(18): p. 1333-46.
36. Brodeur SR, A.F., Bacharier LB, Blom AM, Mizoguchi E, Fujiwara H, Plebani A, Notarangelo LD, Dahlback B, Tsitsikov E, Geha RS., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. Immunity, 2003 Jun. **18**(6): p. 837-48.
37. Lindquist S, C.E., *The heat-shock proteins*. Annu Rev Genet., 1988. **22**: p. 631-77.
38. Pilon M, S.R., *Protein translocation: how Hsp70 pulls it off*. Cell, 1999 Jun 11. **97**(6): p. 679-82.
39. Suzue K, Y.R., *Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24*. J Immunol, 1996 Jan 15. **156**(2): p. 873-9.
40. Lussow AR, B.C., van Embden J, Van der Zee R, Verdini AS, Pessi A, Louis JA, Lambert PH, Del Giudice G, *Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules*. Eur J Immunol., 1991 Oct. **21**(10): p. 2297-302.
41. Perraut R, L.A., Gavaille S, Garraud O, Matile H, Tougne C, van Embden J, van der Zee R, Lambert PH, Gysin J, et al., *Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants*. Clin Exp Immunol, 1993 Sep. **93**(3): p. 382-6.

42. Lehner T, B.L., Wang Y, Tao L, Sing M, Spallek R, van der Zee R., *Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity.* Eur J Immunol., 2000 Feb. **30**(2): p. 594-603.
43. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 775-86.
44. Bradley JR, P.J., *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs).* Oncogene, 2001 Oct 1. **20**(44): p. 6482-91.
45. Zapata JM, R.J., *TRAF1: lord without a RING.* Sci STKE, 2002 May 21. **2002**(133): p. pe27.
46. Xu LG, L.L., Shu HB., *TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis.* J Biol Chem, 2004 Apr 23. **279**(17): p. 17278-82.
47. Zotti T, V.P., Stilo R., *The seventh ring: exploring TRAF7 functions.* J Cell Physiol, 2012 Mar. **227**(3): p. 1280-4.
48. Ritterhoff S, F.C., Grabitzki J, Lochnit G, Skurat AV, Schmitz ML, *The WD40-repeat protein Han11 functions as a scaffold protein to control HIPK2 and MEKK1 kinase functions.* EMBO J, 2010 Nov 17. **29**(22): p. 3750-61.
49. Pullen, S.S., et al., *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization.* Biochemistry, 1999. **38**: p. 10168-77.
50. Xie, P., et al., *Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling.* J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5388-400.
51. Munroe ME, B.G., *A costimulatory function for T cell CD40.* J Immunol, 2007 Jan 15. **178**(2): p. 671-82.
52. Ha, Y.J., et al., *Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40(phox), a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase.* J Immunol, 2004. **172**(1): p. 231-9.
53. Davies, C.C., et al., *TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(22): p. 9806-19.
54. Peters AL, B.G., *Differential TRAF3 utilization by a variant human CD40 receptor with enhanced signaling.* J Immunol, 2010 Dec 1. **185**(11): p. 6555-62.
55. 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.
56. Hauer J, P.S., Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, Engelmann H, *TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2005 Feb 22. **102**(8): p. 2874-9.
57. Fotin-Mleczek, M., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation.* J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 677-85. .
58. Ghoreschi K, L.A., O'Shea JJ, *Janus kinases in immune cell signaling.* Immunol Rev., 2009 Mar. **228**(1): p. 273-87.
59. Hanissian, S. and R. Geha, *Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells.* Immunity, 1997. **6**(4): p. 379-87.
60. Ihle JN, *STATs: signal transducers and activators of transcription.* Cell, 1996 Feb 9. **84**(3): p. 331-4.
61. Girouard, J., et al., *Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression.* Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 773-80.

62. Chan FK, *Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling*. Cytokine, 2007 Feb. **37**(2): p. 101-7.
63. Galbiati F, R.B., Lisanti MP, *Emerging themes in lipid rafts and caveolae*. Cell, 2001 Aug 24. **106**(4): p. 403-11.
64. Brown DA, L.E., *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. J Biol Chem, 2000 Jun 9. **275**(23): p. 17221-4.
65. Vidalain, P.O., et al., *CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts*. Embo J, 2000. **19**(13): p. 3304-3313.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Kaykas A, W.K., Sugden B, *CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex*. EMBO J, 2001 Jun 1. **20**(11): p. 2641-54.
73. Nadiri, A., et al., *CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events*. Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2358-67.
74. 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.
75. Radhika Rastogi, X.G., Fengwu Li, and Yuchuan Ding, *NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease*. Front Cell Neurosci, 2016. **10**(301).
76. Paravicini TM, T.R., *Redox signaling in hypertension*. Cardiovasc Res, 2006 Jul 15. **71**(2): p. 247-58.
77. Trachootham D, A.J., Huang P., *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nat Rev Drug Discov., 2009 Jul. **8**(7): p. 579-91.
78. Andersen JK, *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004 Jul. **10 Suppl**: p. S 18-25.
79. Shukla V, M.S., Pant HC., *Oxidative stress in neurodegeneration*. Adv Pharmacol Sci., 2011. **2011**(572634).
80. Haigis MC, Y.B., *The aging stress response*. Mol Cell, 2010 Oct 22. **40**(2): p. 333-44.
81. Paul D. Ray, B.-W.H., and Yoshiaki Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell signal, 2012 May. **24**(5): p. 981-990.
82. Sumimoto H., M.K., Takeya R., *Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases*. Biochem Biophys Res Commun, 2005 Dec 9. **338**(1): p. 677-86.
83. Takeya R, U.N., Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H, *Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases*. J Biol Chem, 2003 Jul 4. **278**(27): p. 25234-46.

84. Yu L, Q.M., Cross AR, Dinauer MC, *Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998 Jul 7. **95**(14): p. 7993-8.
85. Tsunawaki S, Y.K., *Relationships of p40(phox) with p67(phox) in the activation and expression of the human respiratory burst NADPH oxidase*. J Biochem, 2000 Nov. **128**(5): p. 777-83.
86. Lapouge K, S.S., Groemping Y, Rittinger K, *Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox*. J Biol Chem, 2002 Mar 22. **277**(12): p. 10121-8.
87. Ago T, K.F., Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H, *Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003 Apr 15. **100**(8): p. 4474-9.
88. Foy, T., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 591-617.
89. Yellin, M.J., et al., *T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 666-74.
90. Liu, Y.J., et al., *Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2*. Immunity, 1995. **2**(3): p. 239-48.
91. Ballantyne, J., et al., *Efficient recombination of a switch substrate retrovector in CD40-activated B lymphocytes: implications for the control of CH gene switch recombination*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1336-47.
92. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. **53**(7): p. 1035-43.
93. Grewal, I.S., J. Xu, and R.A. Flavell, *Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 617-20.
94. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
95. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 741-6.
96. Iezzi, G., et al., *CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(3): p. 876-81.
97. Peguet Navarro, J., et al., *Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells*. J Immunol, 1995. **155**(9): p. 4241-7.
98. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.
99. Suttles, J., et al., *T cell rescue of monocytes from apoptosis: role of the CD40-CD40L interaction and requirement for CD40-mediated induction of protein tyrosine kinase activity*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(5): p. 651-7.
100. Alaaeddine, N., et al., *CD154: an immunoinflammatory mediator in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 490148.
101. Heller RA, S.K., Fan N, Chang DJ, *The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity*. Cell, 1992 Jul 10. **70**(1): p. 47-56.

102. Hess, S. and H. Engelmann, *A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 159-67.
103. Leveille, C., et al., *CD40- and HLA-DR-mediated cell death pathways share a lot of similarities but differ in their use of ADP-ribosyltransferase activities*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 719-30.
104. 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.
105. Jundi, M., et al., *CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment*. Immunobiology, 2011.
106. Peters, A.L., L.L. Stunz, and G.A. Bishop, *CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 293-300.
107. Elkon K, C.P., *Nature and functions of autoantibodies*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008 Sep. **4**(9): p. 491-8.
108. Carroll MC, *The lupus paradox*. Nat Genet, 1998 May. **19**(1): p. 3-4.
109. Baxendale HE, J.M., Stephens RC, Yuste J, Klein N, Brown JS, Goldblatt D, *Natural human antibodies to pneumococcus have distinctive molecular characteristics and protect against pneumococcal disease*. Clin Exp Immunol, 2008 Jan. **151**(1): p. 51-60.
110. Yurasov S, N.M., *Regulation of autoreactive antibodies*. Curr Opin Rheumatol., 2007 Sep. **19**(5): p. 421-6.
111. Casali P, B.S., Nakamura M, Inghirami G, Notkins AL, *Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset*. Science, 1987 Apr 3. **236**(4797): p. 77-81.
112. Casali P, S.E., *Structure and function of natural antibodies*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **210**: p. 167-79.
113. Harindranath N, I.H., Notkins AL, Casali P., *Structure of the VH and VL segments of polyreactive and monoreactive human natural antibodies to HIV-1 and Escherichia coli beta-galactosidase*. Int Immunol, 1993 Dec. **5**(12): p. 1523-33.
114. Harindranath N, G.I., Ikematsu H, Burastero SE, Wilder RL, Notkins AL, Casali P., *Complete sequence of the genes encoding the VH and VL regions of low- and high-affinity monoclonal IgM and IgA1 rheumatoid factors produced by CD5+ B cells from a rheumatoid arthritis patient*. Int Immunol, 1991 Sep. **3**(9): p. 865-75.
115. Duquerroy S, S.E., Bressanelli S, Fabiane SM, Vaney MC, Beale D, Hamon M, Casali P, Rey FA, Sutton BJ, Taussig MJ, *Crystal structure of a human autoimmune complex between IgM rheumatoid factor RF61 and IgG1 Fc reveals a novel epitope and evidence for affinity maturation*. J Mol Biol, 2007 May. **368**(5): p. 1321-31.
116. Arbuckle MR, M.M., Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB, *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2003 Oct 16. **349**(16): p. 1526-33.
117. 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.
118. 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.
119. Faure, G., et al., *Coexpression of CD40 and class II antigen HLA-DR in Graves' disease thyroid epithelial cells*. %J Clin Immunol Immunopathol. 1997. **84**(2): p. 212-5.
120. Sugiura, T., et al., *Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6593-600.

121. Yamauchi, P.S., et al., *A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1506-12.
122. 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.
123. Klimiuk, P.A., et al., *Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent*. Clin Immunol, 1999. **90**(1): p. 65-78.
124. Tighe, H., et al., *Human immunoglobulin (IgG) induced deletion of IgM rheumatoid factor B cells in transgenic mice*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 599-606.
125. Kyburz, D., et al., *Human rheumatoid factor production is dependent on CD40 signaling and autoantigen*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3116-22.
126. Liu, M.F., et al., *Expression of CD40 and CD40 ligand among cell populations within rheumatoid synovial compartment*. Autoimmunity, 2001. **34**(2): p. 107-13.
127. Sekine, C., et al., *Expression and function of CD40 in rheumatoid arthritis synovium*. J Rheumatol, 1998. **25**(6): p. 1048-53.
128. Kiener, P.A., et al., *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4917-25.
129. Wagner, D.H., Jr., R.D. Stout, and J. Suttles, *Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis*. Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 3148-54.
130. Packard, R.R. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. Clin Chem, 2008. **54**(1): p. 24-38.
131. Lutgens, E., et al., *CD40 and its ligand in atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(4): p. 118-23.
132. Yellin, M.J., et al., *Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(2): p. 209-16.
133. Zheng X, S.M., Ichim TE, Zhang X, Sun H, Zhu F, Shunnar A, Garcia B, Inman RD, Min W, *Treatment of autoimmune arthritis using RNA interference-modulated dendritic cells*. J Immunol, 2010 Jun 1. **184**(11): p. 6457-64.
134. Zheng, X., et al., *RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. R13.
135. Wardemann, H., et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
136. Desai Mehta, A., et al., *Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production*. J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 2063-73.
137. Devi, B.S., et al., *Peripheral blood lymphocytes in SLE--hyperexpression of CD154 on T and B lymphocytes and increased number of double negative T cells*. J Autoimmun, 1998. **11**(5): p. 471-5.
138. Koshy, M., D. Berger, and M. Crow, *Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 826-37.
139. Katsiari, C.G., et al., *Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol, 2002. **103**(1): p. 54-62.
140. Kato, K., et al., *The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 947-55.
141. Peters, A.L., et al., *A novel polymorphism of the human CD40 receptor with enhanced function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1863-71.

142. Bruck, W., *The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage*. J Neurol, 2005. **252 Suppl 5**: p. v3-9.
143. Filion, L.G., et al., *Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis*. Clin Immunol, 2003. **106**(2): p. 127-38.
144. Laman, J.D., M. De Boer, and B.A. Hart, *CD40 in clinical inflammation: from multiple sclerosis to atherosclerosis*. Dev Immunol, 1998. **6**(3-4): p. 215-22.
145. Lutgens, E., et al., *Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile*. J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 391-404.
146. Lievens, D., et al., *The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 206-14.
147. Chatzigeorgiou, A., et al., *CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease*. Biofactors, 2009. **35**(6): p. 474-83.
148. 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.
149. John D. Brannan, a.M.D.L., *Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment*. Front Physiol, 2012 Dec 10. **3**(460).
150. Jun Tian, T.Z., Juan Liu, Zhenhong Guo, and Xuetao Cao, *Platelets promote allergic asthma through the expression of CD154*. Cell Mol Immunol, 2015 Nov. **12**(6): p. 700-707.
151. Akbari, V.L.A.K.S.O., *The Role of Costimulatory Molecules in Allergic Disease and Asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. **151**: p. 179-189.
152. Andrea M. Keane-Myers, W.C.G., Fred D. Finkelman, X.-d. Xhou and Marsha Wills-Karp, *Development of Murine Allergic Asthma Is Dependent Upon B7-2 Costimulation*. J Immunol January 15, 1998. **160**(2): p. 1036-1043.
153. Stacie M. Propst, R.D., Emily Rothstein, Kim Estell and Lisa M. Schwiebert, *Proinflammatory and Th2-Derived Cytokines Modulate CD40-Mediated Expression of Inflammatory Mediators in Airway Epithelia: Implications for the Role of Epithelial CD40 in Airway Inflammation*. J Immunol August 15, 2000. **165**(4): p. 2214-2221.
154. Barrett NA, A.K., *Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation*. Immunity, 2009 Sep 18. **31**(3): p. 425-37.
155. Robinson, D.S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. Bentley, C. Corrigan, S. Durham, B. Kay, *Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N. Engl. J. Med, 1992. **326**(298).
156. Walker, C., E. Bode, L. Boer, T. Hansel, K. Blaser, J. Johann-Christian Virchow, *Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage*. Am. Rev. Respir. Dis, 1992. **146**: p. 109.
157. Wang, J.M., A. Rambaldi, A. Biondi, Z. G. Chen, C. J. Sanderson, A. Montovani. , *Recombinant human interleukin-5 is a selective eosinophil chemoattractant*. Eur. J. Immunol, 1989. **19**: p. 701.
158. Lopez, A.F., C. J. Sanderson, J. R. Gamble, H. R. Campbell, I. G. Young, M. A. Vadas. , *Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function*. J. Exp. Med. , 1988. **167**: p. 219.
159. Yamaguchi, Y., T. Suda, S. Ohta, K. Tominaga, Y. Miura, T. Kasahara, *Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature eosinophils*. Blood, 1991. **78**: p. 2542.

160. Finkelman, F.D., I. M. Katona, J. F. Urban, Jr, J. Holmes, J. Ohara, A. S. Tung, J. G. Sample, W. E. Paul, *Interleukin-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses*. J. Immunol, 1988. **141**: p. 2335.
161. Kung, T.T., D. M. Stelts, J. A. Zurcher, H. Jones, S. P. Umland, R. W. Egan, W. Kreutner, R. W. Chapman, *IFN γ and Abs to interleukin-5 and interleukin-4 inhibit the pulmonary eosinophilia in allergic mice*. Inflamm. Res. , 1995. **44**(Suppl.2): p. S185.
162. Susanne I. Mayr, R.I.Z., Min Zhang, Jean de Sousa-Hitzler, Karen Ngo, Yasuko Kuwabara, Lan Yu, Wai-Ping Fung-Leung and Fu-Tong Liu, *IgE-Dependent Mast Cell Activation Potentiates Airway Responses in Murine Asthma Models*. J Immunol August 15, 2002. **169**(4): p. 2061-2068.
163. Metcalfe, D.D., M. Kaliner, M. A. Donlon, *The mast cell*. Crit. Rev. Immunol., 1981. **3**(23).
164. Galli, S.J., J. J. Costa, *Mast-cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation*. . Allergy, 1995. **50**(851).
165. Redington, A.E., R. Polosa, A. F. Walls, P. H. Howarth, S. T. Holgate, *Role of mast cells and basophils in asthma*. Chem. Immunol, 1995. **62**(22).
166. Rossi, G.L., D. Olivieri, *Does the mast cell still have a key role in asthma?* Chest 1997. **112**(523).
167. Lloyd, C., Gonzalo, JA, Coyle, AJ, Gutierrez-Ramos, JC. , *Mouse models of allergic airway disease*. Adv. Immunol, 2001. **77**: p. 263-295.
168. Robinson, D., *Th-2 cytokines in allergic disease*. Br. Med. Bull, 2000. **56**: p. 956-968.
169. Cohn, L., Homer, RJ, Niu, N, Bottomly, K, *T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production*. J. Exp. Med, 1999. **190**: p. 1309-1318.
170. Grünig G, C.D., Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM., *Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis*. J Exp Med, 1997 Mar 17. **185**(6): p. 1089-99.
171. Lowder TW, K.H., *Regulatory T Cells in Asthma and Airway Hyperresponsiveness*. J Aller Ther, 2011. **S1**: p. 002.
172. Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, S. Romagnani. , *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells*. J Exp Med, 1993. **177**: p. 1199-1204.
173. Kiniwa, M., M. Gately, U. Gubler, R. Chizzonite, C. Fargeas, G. Delespesse, *Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes*. . J. Clin. Invest, 1992. **90**: p. 262-266. .
174. Gavett, S.H., D. J. O'Hearn, X. Li, S. K. Huang, F. D. Finkelman, M. Wills-Karp, *Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice*. J. Exp. Med, 1995. **182**: p. 1527-1536.
175. Kips, J.C., G. J. Brusselle, G. F. Joos, R. A. Peleman, J. H. Tavernier, R. R. Devos, R. A. Pauwels., *Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice*. Am. J. Respir. Crit. Care Med, 1996. **153**: p. 535-539. .
176. Schwarze, J., E. Hamelmann, G. Cieslewicz, A. Tomkinson, A. Joetham, K. Bradley, E. W. Gelfand, *Local treatment with IL-12 is an effective inhibitor of airway hyperresponsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice*. J. Allergy Clin. Immunol, 1998. **102**: p. 86-93.
177. Tournoy, K.G., J. C. Kips, R. A. Pauwels, *Is Th1 the solution for Th2 in asthma?*. . Clin. Exp. Allergy, 2002. **32**: p. 17-29.

178. Isabelle Meyts, P.W.H., Greet Hens, Bart M. Vanaudenaerde, Bert Verbinnen, Hubertine Heremans, Patrick Matthys, Dominique M. Bullens, Lut Overbergh, Chantal Mathieu, Kris De Boeck and Jan L. Ceuppens, *IL-12 Contributes to Allergen-Induced Airway Inflammation in Experimental Asthma*. J Immunol, November 1, 2006. **177**(9): p. 6460-6470.
179. Hummelshoj, L.K.P.L., *Triggers of IgE class switching and allergy development*. Annals of Medicine, 2007. **39**: p. 440–456.
180. Foy, T.M., A. Aruffo, J. Bajorath, J. E. Buhlmann, R. J. Noelle, *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. Annu. Rev. Immunol, 1996. **14**: p. 591.
181. Wiley, J.A., R. Geha, A. G. Harmsen., *Exogenous CD40 ligand induces a pulmonary inflammation response*. J Immunol, 1997. **158**: p. 2932.
182. Wiley, J.A., A. G. Harmsen. , *Bone marrow-derived cells are required for the induction of a pulmonary inflammatory response mediated by CD40 ligation*. Am. J. Pathol, 1999. **154**: p. 919.
183. Lei, X.-F., Y. Ohkawara, M. R. Stämpfli, C. Mastruzzo, R. A. Marr, D. Snider, Z. Xing, M. Jordana, *Disruption of antigen-induced inflammatory responses in CD40 ligand knockout mice*. J. Clin. Invest, 1998. **101**: p. 1342.
184. Francesca Cagnoni, S.O., Julien Giron-Michel, Anna Maria Riccio, Susanna Olsson, Palmiro Dellacasa, Giovanni Melioli, G. Walter Canonica and Bruno Azzarone, *CD40 on Adult Human Airway Epithelial Cells: Expression and Proinflammatory Effects*. J Immunol, March 1, 2004. **172**(5): p. 3205-3214;.
185. Castigli, E., R. Fuleihan, N. Ramesh, E. Tsitsikov, A. Tsytsykova, and R. S. and Geha., *CD40 ligand/CD40 deficiency*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **107**: p. 37–39.
186. Kiener, P.A., P. Moran-Davis, B. M. Rankin, A. F. Wahl, A. Aruffo, and D. and Hollenbaugh., *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes*. J Immunol, 1995. **155**: p. 4917–4925.
187. Stout, R.D., J. Suttles, J. Xu, I. S. Grewal, and R. A. Flavell., *Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice*. J Immunol, 1996. **156**: p. 8-11.
188. Campbell, K.A., P. J. Owendale, M. K. Kennedy, W. C. Fanslow, S. G. Reed, and C. R. Maliszewski., *CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major*. . Immunity, 1996. **4**: p. 283–289.
189. Soong, L., J. C. Xu, I. S. Grewal, P. Kima, J. Sun, B. J. Longley, Jr., N. H. Ruddle, D. McMahon-Pratt, and R. A. Flavell., *Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to Leishmania amazonensis infection*. Immunity, 1996. **4**: p. 263–273.
190. Paul D. Mehlhop, M.v.d.R., Joanne P. Brewer, Alison B. Kisselgof, Raif S. Geha, Hans C. Oettgen, and a.T.R. Martin, *CD40L, but Not CD40, Is Required for Allergen-Induced Bronchial Hyperresponsiveness in Mice*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2000. **23**: p. 646–651.
191. Suzuki, M., et al., *Inhibition of allergic responses by CD40 gene silencing*. Allergy, 2009.
192. Hong GU, P.B., Park JW, Kim SY, Ro JY., *IgE production in CD40/CD40L cross-talk of B and mast cells and mediator release via TGase 2 in mouse allergic asthma*. cell signal, 2013 Jun. **25**(6): p. 1514-25.
193. Ruedl, C., M. F. Bachmann, M. Kopf. , *The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand*. . eur J Immunol., 2000. **30**: p. 2056-2064.
194. TSUTOMU KAWABE, M.M., NAOZUMI HASHIMOTO, KAZUYOSHI IMAIZUMI and YOSHINORI HASEGAWA, *CD40/CD40 LIGAND INTERACTIONS IN IMMUNE RESPONSES AND PULMONARY IMMUNITY*. Nagoya J. Med. Sci., 2011. **73**: p. 69-78.

195. 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.
196. Law CL, G.I., *Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges*. Adv Exp Med Biol., 2009. **647**: p. 8-36.
197. Eliopoulos, A.G. and L.S. Young, *The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 360-7.
198. Kirk, A.D.B., P. J. Tadaki, D. K, Xu, H. and Harlan, D. M., *The role of CD154 in organ transplant rejection and acceptance*. Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B. Biological sciences, 2001. **356**: p. 691-702.
199. Taylor PA, F.T., Korngold R, Noelle RJ, Blazar BR., *Tolerance induction of alloreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40:CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell*. Blood, 2002 Jun 15. **99**(12): p. 4601-9.
200. Vilhardt F, v.D.B., *The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly*. EMBO J, 2004 Feb 25. **23**(4): p. 739-48.
201. Lee, J.R., *Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine treatment*. Mol Cell Biochem, 2003. **252**(1-2): p. 1-7.
202. Jones OTG, W.J., *Oxidant Production by Human B Lymphocytes: Detection of Activity and Identification of Components Involved*. Methods, 1996 Jun. **9**(3): p. 619-27.
203. Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demareux, N., and Krause, K. H., *A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**: p. 37594-37601.
204. Mehlhop, P.D., et al., *CD40L, but not CD40, is required for allergen-induced bronchial hyperresponsiveness in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(5): p. 646-51.
205. Chevion M, B.E., Stadtman ER, *Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage*. Free Radic Res, 2000. **33**(Suppl): p. S99-S108.
206. Stadtman ER, L.R., *Why have cells selected reactive oxygen species to regulate cell signaling events? Hum Exp Toxicol.*, 2002 Feb. **21**(2): p. 83.
207. Lee, J. R., *Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cystein treatment*. . Mol cell Biochem, 2003 Oct. **252**(1-2): p. 1-7.
208. Fulton, D.J.R., *NOX5 and the regulation of cellular function*. Antioxid Redox Signal, 2009 Oct. **11**(10): p. 2443-2452.
209. Kraft, R.D.S.W.M., *Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma*. Am J Respir Crit Care, 2004. **170**.
210. Hargadon, P.H.C.B.B., *Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma*. N Engl J Med, 2009. **360**.

