

Université de Montréal

**Rôle fonctionnel de l'interaction du CD154 avec le CD40
associé au CD20**

par Loubna Al-Zoobi

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)
en microbiologie, infectiologie et immunologie

Novembre, 2018

© Loubna Al-Zoobi, 2018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôle fonctionnel de l'interaction du CD154 avec le CD40
associé au CD20**

par Loubna Al-Zoobi

a été évaluée par un jury composé de :

Dr. Jacques Thibodeau, président rapporteur

Dr. Walid Mourad, directeur de recherche

Dr. Johanne Poudrier, membre interne

Dr. John Di Battista, examinateur externe

Résumé

Le CD154 est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 33-39 KDa appartenant à la famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Cette molécule est exprimée sous forme trimérique, d'une façon inductible et transitoire à la surface de plusieurs types cellulaires et principalement à la surface des lymphocytes T et des plaquettes activées. Le CD154 existe aussi sous une forme soluble de 18 KDa (sCD154) provenant en partie d'un clivage enzymatique de la membrane des cellules T activées et demeure un trimère biologiquement actif. Une corrélation étroite existe entre l'augmentation du niveau plasmatique du sCD154, chez les patients atteints de différentes pathologies auto-immunes ou cardiovasculaires, et la progression de ces pathologies.

Le CD40 est le récepteur principal du CD154. L'interaction du CD154 avec le CD40 induit des signaux bidirectionnels et elle est cruciale lors de la liaison des cellules T aux cellules B induisant par la suite une prolifération cellulaire, une production des cytokines, une différenciation des cellules B, la commutation isotypique des immunoglobulines et l'apoptose. D'autre part, le CD40 se trouve associé physiquement au CD20 à la surface des cellules B. Le CD20 ne possède pas de ligand et son rôle biologique est peu connu. Cependant, il présente des propriétés apoptotiques très importantes suite à sa liaison aux anticorps monoclonaux, tel que le Rituximab. Ce dernier a montré une efficacité très importante dans le traitement des maladies auto-immunes et de différents types de cancer. Outre le CD40, trois autres molécules appartenant à la famille des intégrines, l' α Ib β 3, l' α 5 β 1 et l' α M β 2 ont été identifiées comme récepteurs du CD154. Nous avons montré que le CD154 interagit avec ces quatre récepteurs via différents résidus induisant ainsi différentes réponses biologiques. Cependant, nous avons démontré que seul le CD40, sous sa forme soluble ou membranaire, est capable d'induire le clivage du CD154 de la surface des cellules T. Ce clivage est médié par l'activation des ADAM-10 et ADAM-17 par la voie de la PKC.

Le travail illustré dans cette thèse consiste à étudier le rôle fonctionnel de l'association du CD40 avec le CD20 et l'effet de cette association sur les réponses induites par le couple CD154/CD40; ainsi qu'à étudier l'impact des signaux bidirectionnels, induits par ce couple, dans la régulation de ces réponses.

Les résultats générés dans cette thèse montrent que l'association du CD40 avec le CD20 amplifie la mort cellulaire induite via le CD40 ou via le CD20, et que les signaux provenant du CD40 sont impliqués dans cette amplification. Cette association amplifie aussi le clivage du CD154. Cependant, la délétion du domaine cytoplasmique du CD40 affecte ce clivage, ce qui montre que les signaux provenant du CD40 sont impliqués aussi dans l'amplification de cette réponse cellulaire. De plus, une double délétion des domaines cytoplasmiques du CD40 et du CD154, abolit complètement le clivage du CD154. Et, comme le sCD154 joue un rôle dans la progression de plusieurs maladies, nous avons généré une forme CD154 résistante au clivage qui a montré une cytotoxicité plus importante que la forme normale clivable, due à la rétention du CD154 à la membrane cellulaire induisant des signaux pro-apoptotiques plus soutenus. Cette forme résistante a montré aussi une efficacité plus prononcée dans d'autres réponses cellulaires B comme la prolifération et la production des immunoglobulines.

Ce travail va nous permettre d'élargir nos connaissances sur le rôle du couple CD154/CD40 dans la régulation de certaines réponses cellulaires, ainsi que celui de l'association du CD40 avec le CD20 dans l'amplification de ces réponses visant à optimiser le rendement de ces molécules dans le traitement de plusieurs maladies auto-immunes, cardiovasculaires et même dans le cancer.

Mots-clés : CD154, clivage, CD40, CD20, association, signaux bidirectionnels, réponses cellulaires.

Abstract

CD154 is a 33-39 KDa type II transmembrane glycoprotein, belonging to the TNF (Tumor Necrosis Factor) superfamily. This molecule is expressed in a trimeric, inducible and transient form on the surface of several cell types, mainly on the surface of activated T cells and platelets. CD154 also exists in a soluble form with a molecular weight of 18 KDa (sCD154). This form comes in part from an enzymatic cleavage of the membrane bound CD154 on activated T cells and remains a biological active trimer. A close correlation exists between the increase of sCD154 in the plasma and the progression of the pathology in various autoimmune or cardiovascular diseases.

CD40 is the principal receptor of CD154. The interaction of CD154 with CD40 induces a bidirectional signal which is crucial for T-B cells interaction involving cell proliferation, cytokine production, B-cell differentiation, isotypic immunoglobulin switching and apoptosis. On the other hand, CD40 is physically associated with CD20 on the surface of B cells. Until now, CD20 has no ligand and its biological role is little known. However, this molecule has a very important apoptotic function using monoclonal antibodies such as Rituximab. The latter has shown a very important efficacy in the treatment of cancer and different autoimmune diseases. In addition to CD40, three other receptors of CD154 have been identified: α IIb β 3, α 5 β 1 and α M β 2, belonging to the integrin family. CD154 interacts with these four receptors via different residues and induces different biological responses. However, we have demonstrated that only CD40, in its soluble or membrane form, is capable of inducing CD154 cleavage from the surface of T cells. This cleavage is mediated by the activation of ADAM-10 and ADAM-17 by the PKC pathway.

The work illustrated in this thesis consists in studying the functional role of the association of CD40 with CD20 and the effect of this association on the responses induced by the CD154/CD40 dyad; and in determining the impact of the bidirectional signals, induced by this dyad, in the regulation of these responses.

The results generated here show that the association of CD40 with CD20 amplifies cell death induced via CD40 or via CD20, and that signals from CD40 are involved in this amplification. This association also up-regulated the cleavage of CD154. However, the deletion of the

cytoplasmic domain of CD40 affects this cleavage, showing that the signals from CD40 are also involved in this response. In addition, the deletion of the cytoplasmic domains of both CD40 and CD154, abolished completely the cleavage of CD154. Since sCD154 plays a role in the progression of several diseases, we have generated a non-cleavable form of CD154 that has shown greater cytotoxicity than the cleavable form, due to the retention of CD154 at the cell membrane inducing more pronounced signals. This form also showed more pronounced efficacy in others B cell responses such as proliferation and immunoglobulin production.

This work will allow us to broaden our knowledge on the role of the CD154/CD40 couple in the regulation of many cellular responses, as well as that of the association of CD40 with CD20 in the amplification of these responses in order to optimize the outcome of these molecules in the treatment of several autoimmune diseases, cardiovascular and even in cancer.

Keywords: CD154, cleavage, CD40, CD20, association, bidirectional signaling, cellular responses.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 Structure et expression du CD154.....	3
1.1.1 Découverte du CD154.....	3
1.1.2 Structure du CD154.....	4
1.1.3 Expression du CD154.....	5
1.1.4 La forme soluble du CD154 : naturelle et induite.....	7
1.2 Structure et expression des différents récepteurs du CD154.....	8
1.2.1 Le CD40 : le principal récepteur du CD154.....	8
1.2.1.1 Découverte du CD40.....	8
1.2.1.2 Structure du CD40.....	9
1.2.1.3 Expression du CD40.....	10
1.2.2 Les autres récepteurs du CD154.....	12
1.2.2.1 Les intégrines.....	12
1.2.2.1.1 L'intégrine α IIb β 3.....	15
1.2.2.1.2 L'intégrine α 5 β 1.....	15
1.2.2.1.3 L'intégrine α M β 2.....	16
1.3 Interaction structurale du CD154 avec ses différents récepteurs.....	16
1.3.1 Interaction du CD154 avec le CD40.....	16
1.3.1.1 Découverte de l'interaction.....	16
1.3.1.2 Structure de l'interaction.....	17
1.3.2 Interaction du CD154 avec les intégrines.....	19
1.3.2.1 Découverte de l'interaction.....	19

1.3.2.2	Structure de l'interaction.....	19
1.4	Implication physiologique fonctionnelle de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs	21
1.4.1	L'interaction CD154/CD40	21
1.4.1.1	Les signaux bidirectionnels induits par le couple CD154/CD40.....	21
1.4.1.1.1	Signaux induits via le CD40 suite à sa liaison au CD154.....	21
1.4.1.1.1.1	TRAFs	21
1.4.1.1.1.2	JAK3.....	24
1.4.1.1.2	Signaux induits via le CD154 suite à sa liaison au CD40.....	25
1.4.1.2	Implication fonctionnelle du complexe CD154/CD40	26
1.4.1.2.1	Rôle dans l'immunité humorale	26
1.4.1.2.2	Rôle dans l'immunité cellulaire	28
1.4.1.2.3	Rôle dans la mort cellulaire.....	30
1.4.2	L'interaction CD154/intégrines	31
1.4.2.1	Implication physiologique du complexe CD154/ α IIb β 3	31
1.4.2.2	Implication physiologique du complexe CD154/ α 5 β 1	32
1.4.2.3	Implication physiologique du complexe CD154/ α M β 2.....	32
1.5	L'association du CD154 et du CD40 avec des protéines de surface	33
1.5.1	L'association du CD154 avec le CD28i.....	33
1.5.2	L'association du CD40 avec le CD20.....	34
1.5.2.1	L'association physique entre le CD40 et le CD20.....	34
1.5.2.1.1	Le CD20	34
1.5.2.1.1.1	Structure du CD20.....	35
1.5.2.1.1.2	Expression du CD20.....	36
1.5.2.1.1.3	Fonctions du CD20.....	37
1.5.2.1.1.4	Le CD20 : cible thérapeutique en immunothérapie	39
1.5.2.1.1.4.1	Le Rituximab.....	39
1.5.2.1.1.4.1.1	Mécanismes d'action du Rituximab.....	40
1.5.2.1.1.4.1.1.1	La voie de l'apoptose	40
1.5.2.1.1.4.1.1.2	Les fonctions liées au fragment Fc du Rituximab : le CDC et l'ADCC.....	42

1.5.2.1.1.4.1.2	Le Rituximab en pratique clinique	45
1.5.2.2	La communication fonctionnelle entre le CD40 et le CD20.....	47
1.6	Implication pathologique du complexe CD154/CD40	49
1.6.1	Rôle dans les maladies inflammatoires.....	49
1.6.1.1	Athérosclérose.....	50
1.6.2	Rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques	52
1.6.2.1	Arthrite rhumatoïde.....	54
1.6.2.2	Le lupus érythémateux disséminé.....	55
1.6.2.3	Sclérose en plaques	56
1.6.2.4	Les maladies auto-immunes et inflammatoires de l'intestin.....	57
1.6.3	Le cancer	58
1.6.4	Le sCD154 et les syndromes cardiovasculaires.....	60
1.7	Le complexe CD154/CD40 et le traitement thérapeutique.....	61
1.8	L'hypothèse et les objectifs du travail	63
Chapitre 2.	L'association physique du CD40 avec le CD20 à la surface cellulaire amplifie la mort cellulaire induite par le Rituximab.	65
2.1.	Mise en contexte	66
2.2	Contribution des co-auteurs	67
2.3	Résumé.....	68
Chapitre 3.	Le rôle des signaux provenant du CD40 et de son association au CD20 dans le clivage du CD154	105
3.1	Mise en contexte	106
3.2	Contribution des auteurs	107
3.3	Résumé.....	108
Chapitre 4.	Le CD154 résistant au clivage augmente les réponses cellulaires induites via le CD40 sans affecter la transduction du signal via le CD154	129
4.1	Mise en contexte	130
4.2	Contribution des auteurs	131
4.3	Résumé.....	132
Discussion	166
Conclusion et perspectives	177

Bibliographie..... 182

Liste des tableaux

Tableau I.	Le niveau d'expression du CD154 à la surface des différents types cellulaires	
	6
Tableau II.	Le niveau d'expression du CD40 à la surface de plusieurs types cellulaires	
	11
Tableau III.	Le rôle du complexe CD154/CD40 dans la régulation de la réponse immunitaire cellulaire.	
	29

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. La structure du gène et de la protéine CD154 humain.....	5
Figure 2. La structure du gène et de la protéine du CD40 humain	10
Figure 3. Les différentes sous-populations des intégrines	13
Figure 4. Les résidus impliqués dans l'interaction CD154/CD40.....	18
Figure 5. Interaction du CD154 avec ses différents récepteurs et les résidus impliqués	20
Figure 6. La structure des membres de la famille des TRAF	23
Figure 7. La signalisation intracellulaire induite par le CD40.....	25
Figure 8. La structure CD20	36
Figure 9. Les mécanismes de signalisation pro-apoptotiques induits par le Rituximab	42
Figure 10. Les différentes voies d'activation du complément induites suite à la liaison du Rituximab au CD20	44
Figure 11. Les mécanismes induits par le complexe CD154/CD40 dans l'auto-immunité	53

Chapitre 2

Figure 1. Rituximab/CD20 induced cell death in human B cells and in some but not all B cell lines	96
Figure 2. PMA-priming and cross-linking Rituximab with a secondary antibody sensitizes Ramos cells to cell death.....	97
Figure 3. Rituximab dose-dependent cell death of HEK-293/hCD20WT cells	98
Figure 4. Rituximab-induced cell death is dependent on the level of CD20 expression ..	99
Figure 5. Rituximab-induced cell death via CD20 is independent of Fc receptors.....	100
Figure 6. The physical association of CD20 with CD40 enhances cell death via CD20.	101

Figure 7. Inhibiting CD40 homodimer formation upregulates cell death induced by CD20	102
Figure 8. The physical association of CD20 with CD40 enhances cell death via CD40.	103
Figure 9. A combination of anti-CD20 and anti-CD40 antibodies enhances the cell death response.	104

Chapitre 3

Figure 1. Signaling via CD40 on B cells is required for CD154 shedding	125
Figure 2. Signaling via CD40 on epithelial cells enhances CD154 cleavage from cell surface	126
Figure 3. The cleavage of CD154 from cell surface is regulated by signaling via both CD154 and CD40.	127
Figure 4. The association of CD40 with CD20 enhances its induction of CD154 cleavage from cell surface	128

Chapitre 4

Figure 1. CD154-EM maintains its ability to interact with the CD40.	158
Figure 2. CD154-EM is resistant to cleavage from the cell membrane upon its stimulation with soluble CD40	159
Figure 3. CD154-EM is resistant to cleavage from the cell membrane upon its stimulation with membrane-bound CD40.	160
Figure 4. CD154-EM induces MAPKs activation in a comparable way to CD154-WT	161
Figure 5. CD154-EM induces apoptosis in CD40-positive lymphoma B Cells	162
Figure 6. CD154-EM induces prominent B cell proliferation as evaluated by CFSE staining	163
Figure 7. CD154-EM induces B cell homotypic adhesion	164
Figure 8. CD154-EM induces prominent Ig production	165

Liste des abréviations

ADAM-10	<i>A Desintegrin And Metalloproteinase domain containing protein-10</i>
ADAM-17	<i>A Desintegrin And Metalloproteinase domain containing protein-17</i>
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AID	<i>Activation-Induced cytidine Deaminase</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APRIL	<i>A Proliferation Inducing Ligand</i>
AR	Arthrite Rhumatoïde
ATP	Adenosine Triphosphate
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
Bak	<i>Bcl-2 homology Antagonist Killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 Associated X protein</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
Bik	<i>Bcl-2 Interacting Killer</i>
C4BP	<i>C4 Binding Protein</i>
Cbp	<i>C-terminal src kinase binding protein</i>
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément
CIA	<i>Collagen Induced Arthritis</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
DC	<i>Dendritic cells</i>
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FcγRIIb	Récepteur pour les fragments Fc des immunoglobulines G
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HIGM-X	syndrome d'Hyper-IgM lié à l'X
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
ICAM-1	Molécules d'adhésion intracellulaire1

ICOS	<i>Inducible T-cell COStimulator</i>
IFNγ	Interferon gamma
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
JAK-3	<i>Janus family Kinase-3</i>
JNK	Jun N-terminal Kinase
KGD	Lysine/Glycine/Acide aspartique
LED	Lupus érythémateux disséminé
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMP-1	<i>Latent Membrane Protein-1</i>
LT-α	Lymphotoxine-alpha
MAC	Complexes d'attaque membranaire
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase
MS4A1	<i>Membrane Spanning 4 domains, groupe A, membre 1</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PI3-K	Phosphoinositide 3-kinase
PLCγ	Phospholipase C γ
PNN	Polynucléaires Neutrophiles
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
RGD	<i>Arginine/Glycine/Acide aspartique</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen species</i>
sCD154	<i>soluble CD154</i>
sCD40-Ig	<i>soluble CD40 Immunoglobulin</i>
SEP	Sclérose En Plaques
SNC	Système Nerveux Central
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>

TCR	<i>T Cell Receptor</i>
Tfh	<i>T follicular helper</i>
Th	<i>T helper</i>
THD	<i>TNF Homology Domain</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFRs	<i>TNF Receptor superfamily</i>
TNFSF5	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5</i>
TNFRSF5	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5</i>
TPA	<i>TétradécanoylPhorbol Acétate</i>
TRAFs	<i>TNF Receptor-Associated Factors</i>
TRAP	<i>TNF-related activation protein</i>
UNG	<i>Uracil-DNA Glycosylase</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>

*Je dédie ce travail à tous ceux qui étaient là pour m'aider, me supporter,
me soutenir, m'aimer...*

À vous, mes chers parents, papa Mounir et maman Sadika

À toi, mon mari, Nizar,

À vous, mes enfants, Sabine et Jad,

Remerciements

Tout particulièrement, j'adresse mes remerciements les plus vifs et les plus sincères à mon directeur de recherche, Dr. Walid Mourad, Ph.D, qui a cru en moi et qui a contribué à mon éveil scientifique. Je ne saurais lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa rigueur scientifique et ses encouragements qui, durant toutes ces années de travail, m'ont permis de trouver les ressources nécessaires pour mener à terme ce travail. Dr. Walid, veuillez trouver l'expression de mon profond respect et ma haute considération.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire du Dr. Walid Mourad pour leur collaboration, leur support amical, et leur encouragement tout au long de ce travail.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi à tous les membres du jury, pour l'amabilité avec laquelle ils ont accepté de juger ce travail.

Finalement, une pensée très forte à mes parents, mon père Mounir, ma mère Sadika, mes frères Abdul-Fatah, Alaa et ma soeur Berna, et plus particulièrement mon mari Nizar et mes enfants, Sabine et Jad, qui m'ont toujours encouragé et qui m'ont donné un magnifique modèle de persévérance. De plus, je remercie mon mari Nizar pour tout son amour, sa confiance, sa patience et son soutien.

Ma reconnaissance va à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

À vous tous et toutes, un grand Merci !

Chapitre 1. Introduction

L'immunité est le terme choisi pour désigner le système de défense biologique d'un organisme vivant, qui se charge de préserver l'intégrité du soi contre toute attaque extérieure ou intérieure. Notre système immunitaire se définit ainsi comme étant l'ensemble de cellules, organes, tissus et mécanismes moléculaires, qui agissent d'une façon coordonnée et hiérarchisée afin de préserver l'intégrité de notre organisme des agents pathogènes (non soi). Deux lignes de défense sont distinguées lors de la mise en place d'une réponse immunitaire contre un organisme étranger; une réponse innée comme première ligne de défense, assurée majoritairement par les cellules phagocytaires, et une réponse adaptative ou acquise comme deuxième ligne de défense faisant intervenir les lymphocytes T et B qui sont les chefs d'orchestre de l'immunité adaptative. La réponse adaptative se caractérise aussi par la présence d'une mémoire immunitaire à long terme.

L'activation des lymphocytes T nécessite deux principaux signaux, lors d'une présentation antigénique par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le premier signal consiste en l'interaction de haute affinité entre le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et le récepteur des cellules T (TCR, *T cell receptor*). Alors que le deuxième signal est médié par l'interaction entre plusieurs molécules de costimulation. La transduction des signaux via le TCR et le CD28 induit l'expression du CD154 (CD40 ligand) à la surface des cellules T. Par la suite, le CD154 se lie au CD40, son principal récepteur, exprimé à la surface des CPA. L'interaction du CD154 avec le CD40 induit une augmentation de l'expression du CD80/CD86 sur les CPA, qui à son tour renforce le signal induit par le CD28. Cette interaction permet ensuite l'activation des CPA, qui vont sécréter des cytokines qui orienteront la réponse immunitaire induite, ainsi que l'activation des lymphocytes T qui seront aptes à activer les lymphocytes B pour produire des anticorps ou à activer les macrophages pour détruire les pathogènes intracellulaires. L'ensemble de ces interactions résulte en un équilibre entre l'activation et la résolution de la réponse immunitaire. Le couple CD154/CD40 joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme. Toute dérégulation de l'interaction du CD154 avec son principal récepteur, le CD40, ou même avec ses autres récepteurs mène au développement de plusieurs maladies auto-immunes, inflammatoires, cardiovasculaires et même le cancer.

1.1 Structure et expression du CD154

Plusieurs membres de la superfamille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*) jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire en contrôlant une variété de fonctions cellulaires. Parmi les membres de cette famille figure le CD154, nommé aussi CD40L (*CD40 Ligand*), gp39, TNFSF5 (*Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5*), TRAP (*TNF-related activation protein*), qui joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Comme tous les membres de la famille des TNF, le CD154 peut être ancré dans la membrane cellulaire ou sous une forme soluble. Cette molécule est originalement identifiée au niveau des cellules immunitaires.

1.1.1 Découverte du CD154

En 1989, Paulie et al. ont commencé à décortiquer les mécanismes impliqués dans l'activation de son principal récepteur, le CD40, une glycoprotéine appartenant à la famille des TNFR (*TNF Receptor superfamily*). Ils ont pensé que sa molécule activatrice est un facteur de croissance qui fonctionne de manière autocrine [1]. En 1992, Armitage et al. ont identifié, cloné et testé une molécule de 39 KDa, qui est capable d'activer le CD40 des souris. Cette molécule a été nommée gp39 [2]. De plus, Hollenbaugh et al. ont utilisé des amorces pour cloner le gp39 humain, en se basant sur la séquence décrite par Armitage et al. afin de caractériser cette molécule [3]. Ensuite, ils ont transfecté cette molécule dans des cellules de mammifères de type Cos-7, et ils ont observé la liaison d'une forme soluble du CD40 (sCD40-Ig, *soluble CD40 Immunoglobulin*) sur ces cellules. Après avoir vérifié le poids du gp39 produit par les cellules Cos-7, ils ont étudié la prolifération des cellules B induite par le gp39 : la forme membranaire du gp-39 est capable de stimuler légèrement la prolifération des cellules B, et cette réponse est amplifiée en présence d'un co-stimulant comme PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) ou un anti-CD20. De plus, cette réponse induite par le gp39 est bloquée en présence du sCD40 [3].

1.1.2 Structure du CD154

C'est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 33 à 39 KDa [2, 4]. Le gène codant du CD154 est situé sur le chromosome X dans le locus q26.3-q27.1, et il est constitué principalement de 5 exons dont l'exon I code pour la région intracellulaire et transmembranaire, alors que les exons II à V codent pour la région extracellulaire de la protéine (**Figure 1**) [5]. Cette protéine transmembranaire est composée de 261 acides aminés dont 22 acides aminés se localisent dans le domaine cytoplasmique, 24 acides aminés dans le domaine transmembranaire et 215 acides aminés dans le domaine extracellulaire [6, 7]. Elle possède un domaine d'homologie (20% d'homologie) avec les protéines de la famille du TNF (THD : *TNF Homology Domain*) dans la région extracellulaire (**Figure 1**) [8]. Malgré cette faible homologie, la structure tridimensionnelle du CD154 est semblable à d'autres membres de la famille des TNF, comme le lymphotoxine-alpha (LT- α) et le TNF- α [7]. Le CD154 est exprimé sous forme homo-trimérique et composé de trois monomères associés par des liaisons non covalentes à la membrane cellulaire [9]. Cette trimérisation est médiée par deux tyrosines, deux histidines et une leucine. Cette structure facilite son interaction avec le CD40 et elle est nécessaire pour l'induction des signaux intracellulaires.

En plus de la forme membranaire, le CD154 existe aussi sous une forme soluble de 18KDa [10, 11]. Cette forme soluble demeure fonctionnelle et garde toujours sa capacité de former un trimère. En effet, cette forme provient presque exclusivement d'un clivage enzymatique au niveau de la membrane des cellules T et des plaquettes activées ou d'un relargage intracellulaire. Il a été démontré que les deux formes, soluble et membranaire, proviennent d'un même gène et ne résultent pas d'un épissage alternatif de l'ARN messenger parce qu'il n'existe pas une séquence d'initiation de traduction spécifique pour la forme soluble [10].

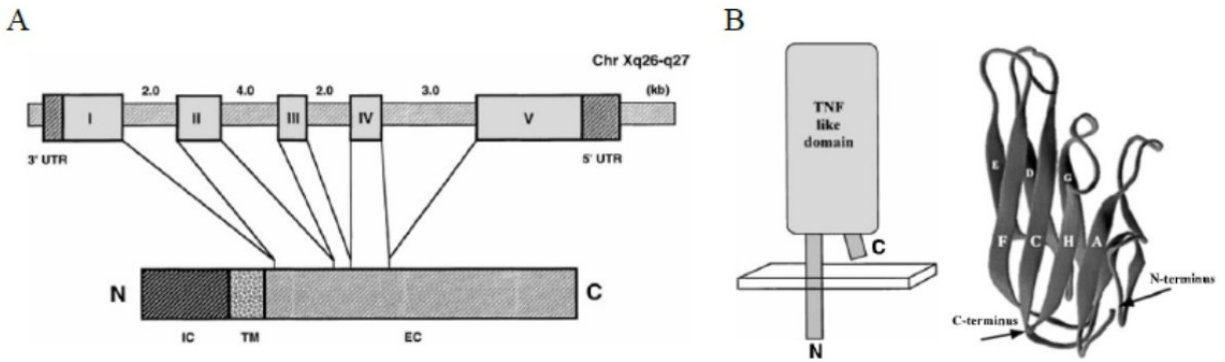


Figure 1. La structure du gène et de la protéine CD154 humain

A) Le gène codant pour le CD154 humain possède cinq exons constituant les différentes régions de la protéine (IC= intracellulaire; TM= transmembranaire; EC= extracellulaire). B) Structure schématique et cristallographique de la protéine du CD154 présentant le domaine d'homologie des TNF. (Tirée de *Van Kooten C. et al.,2000 [7]* avec autorisation du *Journal of Leukocyte Biology*).

1.1.3 Expression du CD154

Le CD154 est exprimé surtout par les lymphocytes T activés. On le retrouve exprimé à la surface des cellules T CD4+ activées et sur une petite population de T CD8+. Cependant, il n'est pas exprimé à la surface des cellules T au repos [7]. L'expression de cette molécule est induite et transitoire. Elle peut être exprimée mais faiblement de 5 à 15 minutes suivant la stimulation, ce qui indique la présence intracellulaire de protéines déjà synthétisées (protéines *de novo*) [12]. Cette expression atteint son maximum environ six heures suite à la stimulation des cellules T et une diminution de cette expression est observée entre 12 et 24 heures suivant l'induction [12]. Cette expression est modulée par l'activation des facteurs de transcription NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) dépendante de la calcineurine comme NFAT-c1 et NFAT-c2 mais aussi de l'activation de la voie du STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) [13].

L'expression du CD154 est régulée par la liaison du TCR à l'antigène et par d'autres molécules de co-stimulation, notamment le CD3 et/ou le CD28 et l'ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*) [14]. D'autres médiateurs, tels que les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-4 et le TNF α , ont montré une capacité à induire l'expression du CD154 à la surface des lymphocytes T [15].

Le CD154 est présente aussi, mais d'une façon moins importante, à la surface des cellules hématopoïétiques activées comme les basophiles, les éosinophiles, les cellules tueuses naturelles (cellules NK, *Natural Killer*), les macrophages et les cellules dendritiques (DC), ainsi qu'à la surface des cellules non hématopoïétiques activées comme les plaquettes, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales et endothéliales [16] (**Tableau I**).

Type cellulaire	Expression du CD154	
	Cellules au repos	Cellules activées
Cellules T CD4+	-	+++
Macrophages	+	++
Plaquettes	-	+++
Cellules dendritiques	+	+
Neutrophiles	+	+
Cellules endothéliales	+	+
Cellules Musculaires Lisses	+	+

Tableau I. Le niveau d'expression du CD154 à la surface des différents types cellulaires

Le CD154 est exprimé à la surface suite à l'activation des cellules immunitaires. Le (-) représente une absence d'expression, (+) représente une faible expression, (++) représente une expression moyenne et le (+++) représente une forte expression. (Modifié de *Lievens, D. et al., 2009* [17] avec autorisation du journal *Thrombosis and Haemostasis*).

1.1.4 La forme soluble du CD154 : naturelle et induite

Après la découverte du CD154, en 1992, Hollenbaugh et al. ont remarqué une zone de clivage proche de la partie cytoplasmique, mais il n'y avait pas encore d'évidence de l'existence d'une forme soluble du CD154 (sCD154) [3]. En 1995, Graf et al. ont montré que les lymphocytes T humains activés n'expriment pas juste la forme membranaire mais aussi ils sécrètent une forme sCD154. Cette protéine soluble de 18 KDa a été isolée et séquencée; la séquence d'acides aminés débute par une méthionine 113 du CD154 et comprend le domaine d'homologie des TNF [10]. Ils ont suggéré que cette forme est le résultat d'un clivage protéolytique du CD154 membranaire dans un compartiment intracellulaire. Comme pour tous les membres de la famille des TNF, ce groupe a suggéré que cette forme soluble peut lier le CD40 et l'activer.

En 1996, Pietravalle et al. ont confirmé que le sCD154 est une forme clivée du CD154 membranaire, et que ce clivage se fait dans les microsomes suite à l'activation des cellules T [18]. Ils ont montré aussi que cette forme soluble de 18 KDa est un homotrimère et elle est capable, comme l'anti-CD40, de stimuler la prolifération des cellules B en présence d'IL-4.

En 1999, Aukrust et al. ont pu découvrir une autre source du sCD154. En stimulant le plasma riche en plaquettes avec un peptide agoniste du récepteur à la thrombine, ils ont observé une augmentation significative de la concentration du sCD154 dans le surnageant [19]. De plus, dans le sérum des patients atteints du syndrome coronarien aigu, ils ont pu détecter une concentration élevée du sCD154. En 2002, plusieurs groupes ont établi que les plaquettes activées demeurent la source principale du sCD154 [11, 20].

En 2006, Matthies et al. ont observé une diminution de l'expression du CD154 suite à l'activation des cellules T. Cette diminution est due à un clivage enzymatique du CD154 membranaire, mais les mécanismes impliqués dans ce clivage sont peu connus [21]. En 2013, nous avons démontré que le CD40 est le principal récepteur du CD154 impliqué dans le clivage de cette protéine des cellules T activées, ce processus dépend de l'activation spécifique des métalloprotéinases ADAM-10 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain containing protein-10*) et ADAM-17 [22].

Une autre forme membranaire du CD154 dépourvue du domaine cytoplasmique a été détectée. Deux hypothèses ont été avancées afin d'expliquer la présence de cette forme; elle peut être due à la protéolyse ou elle est issue de la présence d'un autre site d'initiation de la traduction au niveau de la paire de base 61 qui représente l'acide aminé méthionine 21 au niveau de la protéine [9].

Toujours dans ce contexte, d'autres groupes ont pu décrire, dans le surnageant des cellules T ainsi que lors de la production du CD154 en *E.coli*, une forme plus courte du CD154 débutant par l'acide aminé 149 [18, 23]. Mais cette forme reste mal connue et mal étudiée parce que celle issue des cellules T n'a pas été séquencée dans cette étude, de plus les bactéries ne produisent pas d'une façon naturelle le CD154.

1.2 Structure et expression des différents récepteurs du CD154

1.2.1 Le CD40 : le principal récepteur du CD154

Le CD40 est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des TNFR. Elle est nommée également TNFRSF5 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 5*) et *B-cell surface antigen CD40*.

1.2.1.1 Découverte du CD40

En 1984, Paulie et al. ont produit un anticorps dirigé contre un antigène appelé « Bp50 » exprimé à la surface des cellules de la vessie et contre les cellules B de lymphome en immunisant des souris avec les cellules de carcinome vésical [24]. En 1985, ils ont montré que le Bp50 est présent à la surface de plusieurs lignées cellulaires B en utilisant des anticorps monoclonaux comme le G28.5 et le S2C6 [25]. En 1986, Clark et al. ont prouvé que cet antigène est capable d'induire la prolifération des cellules B préalablement activées par un anti-CD20 ou un anti-

IgM [26]. Et de même d'autres groupes ont montré ce rôle en présence d'IL-4 [27]. Après quelques années, ils ont octroyé au Bp50, le nom du CD40. En 1989, le ligand du CD40 n'était pas encore connu. Ils ont suggéré que cette molécule peut être naturellement activée par un facteur de croissance produit d'une façon autocrine [1]. Après avoir découvert le CD154 comme ligand principal du CD40, deux autres ligands ont été identifiés; soient les protéines C4 binding protein (C4BP), une protéine régulatrice du complément et la heat shock protein 70 (HSP70) qui fait partie de la famille des chaperons. Le rôle de la liaison de ces deux protéines au CD40 reste mal connu. L'interaction C4BP/CD40 peut induire l'amplification de l'expression du CD154 et du CD86 et ainsi l'induction de la commutation de classe des immunoglobulines [28]. L'interaction HSP70/CD40 est capable d'induire la sécrétion des chimiokines [29].

1.2.1.2 Structure du CD40

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, de 43 à 50 KDa, appartenant à la famille des récepteurs des TNF [30]. Le gène du CD40 se retrouve sur le chromosome 20 sur le locus q12.13.2 [31]. Ce dernier comprend 9 exons, dont l'exon I code pour la séquence promotrice de la protéine, les exons II à VI codent pour le domaine extracellulaire, l'exon VII pour le domaine transmembranaire et les exons VIII et IX pour le domaine intracellulaire du CD40. C'est une protéine de 255 acides aminés constituée de trois domaines : une région extracellulaire de 171 acides aminés, une région transmembranaire de 22 acides aminés et une courte région cytoplasmique de 62 acides aminés [32]. Le CD40 humain est composé de deux sites de N-glycosylation au niveau des asparagines 153 et 180 [33]. Le domaine extracellulaire du CD40 est formé d'une séquence répétitive riche en cystéines. Cette séquence est divisée en quatre domaines comprenant chacun un arrangement de deux parmi quatre sous-unités (A1, A2, B1 et B2) [7] (**Figure 2**).

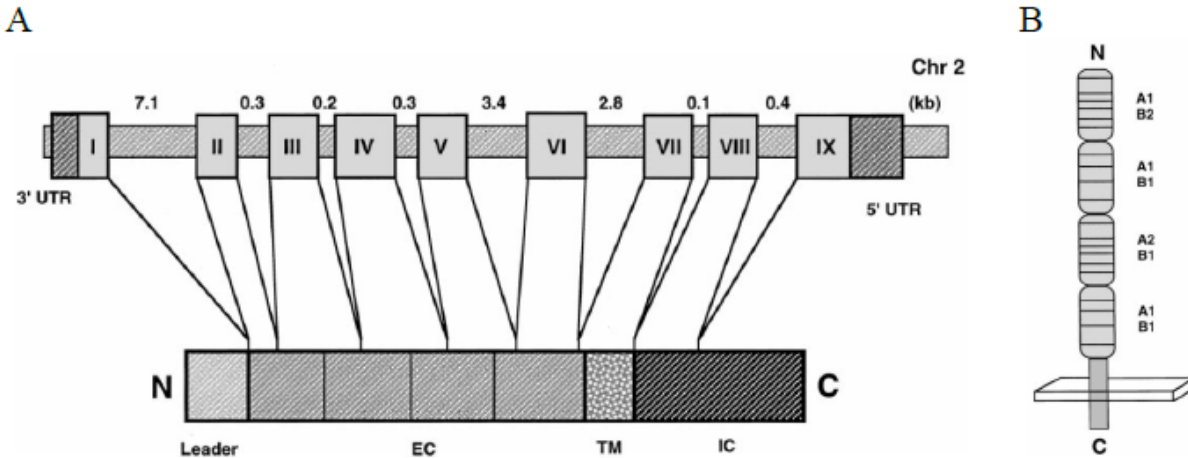


Figure 2. La structure du gène et de la protéine du CD40 humain

A) Le gène codant pour le hCD40 contient 9 exons. Les exons II, III, IV, V et VI codent pour le domaine extracellulaire (EC), l'exon VII pour le domaine transmembranaire (TM) et les exons VIII et IX pour le domaine intracellulaire (IC) de la protéine. B) Le domaine extracellulaire de la protéine hCD40 contient une séquence de 20 résidus cystéines divisée en quatre domaines comprenant chacun deux sous-domaines (A1 : B2, A1 : B1, A2 : B1, A1 : B1). (Tirée de Van Kooten C. *et al.*, 2000 [7] avec autorisation du *Journal of Leukocyte Biology*).

1.2.1.3 Expression du CD40

Le CD40 a été découvert tout d'abord à la surface des lymphocytes B. Elle est présente à tous les stades du développement des lymphocytes B, la stimulation du CD40 est capable d'induire de nombreux signaux dépendants du stade de développement lymphocytaire B.

En effet, le CD40 est reconnu comme un récepteur dont l'expression est largement répandue dans l'organisme. Des études plus approfondies ont permis de détecter sa présence aussi bien à la surface des cellules hématopoïétiques que non hématopoïétiques telles que les monocytes/macrophages, les plaquettes, les DC, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les basophiles, les synoviocytes et les fibroblastes [7, 16] (**Tableau II**). En effet, le niveau d'expression du CD40 et son rôle varient d'un type cellulaire à l'autre [7]. Plusieurs études ont démontré aussi l'expression du CD40 à la surface de certaines cellules tumorales.

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

Tableau II. Le niveau d'expression du CD40 à la surface de plusieurs types cellulaires

Une augmentation de l'expression du CD40 est observée suite à l'activation des différents types cellulaires. Le (-) représente une absence d'expression, (+) représente une faible expression, (++) représente une expression moyenne et le (+++) représente une forte expression. (Modifié de *Lievens, D. et al., 2009 [17]* avec autorisation du journal *Thrombosis and Haemostasis*).

Généralement, le CD40 est exprimé d'une façon constitutive sur la plupart des types cellulaires. Mais le niveau d'expression de cette protéine peut être amplifié en présence de plusieurs stimuli ceux-ci incluent les cytokines, telles que le TNF- α , l'Interferon gamma (IFN γ), le granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et les interleukines (IL-1, -2 et -4) [16]. D'autres stimuli sont également connus comme les anticorps contre l'IgM ou le CD20, le lipopolysaccharide et les esters de phorbol comme le tétradécanoylphorbol acétate (TPA) ou le PMA [16, 34]. De plus, la présence du virus bacille *Mycobacterium tuberculosis*, le virus Epstein-Barr *latent membrane protein* (LMP-1) [16] et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peuvent aussi simuler l'expression du CD40 [35].

Le CD40 est généralement exprimé sous une forme monomérique à la surface des cellules, mais il existe toujours une certaine ambiguïté quant à l'arrangement de multimère du CD40. En fait, une forme dimérique [36] et même trimérique a été aussi observée à la surface des cellules immunitaires [37]. Notre laboratoire a démontré que l'homodimérisation du CD40 est due à la formation d'un pont disulfure [36]. Ainsi, nous avons montré aussi que l'unique cystéine présente à la position 238 (C238) dans la partie cytoplasmique est responsable de la dimérisation du CD40 [38]. Aussi, nous avons pu montrer que l'homodimérisation du CD40 se fait au niveau des radeaux lipidiques et que cette homodimérisation est nécessaire pour l'activation de la voie du PI3-K (Phosphoinositide 3-kinase) et de l'Akt [38].

1.2.2 Les autres récepteurs du CD154

Le CD40 fut longtemps considéré comme le seul récepteur du CD154. Cependant, au cours des quelques dernières années, trois autres récepteurs ont été identifiés, soient les intégrines: $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ et $\alpha IIb\beta 3$. Malgré que le CD40 demeure le principal récepteur de haute affinité du CD154, ces nouveaux récepteurs semblent occuper des fonctions bien particulières dans différentes conditions physiopathologiques.

1.2.2.1 Les intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhésion et de signalisation. Elles constituent une famille de récepteurs transmembranaires qui lient des molécules de la matrice extracellulaire (MEC), et qui interagissent aussi avec des protéines associées au cytosquelette d'actine par la partie intracellulaire. Ces molécules jouent un rôle crucial dans la motilité cellulaire et contrôlent plusieurs processus cellulaires. Elles sont impliquées dans le transfert d'informations entre la cellule et son environnement conjonctif, grâce à leur liaison avec des protéines G et au recrutement des protéines tyrosine kinases cytoplasmiques [39].

Les intégrines ont une structure constitutivement inactive hétérodimérique, associant une sous-unité alpha et une sous-unité bêta. Il existe 18 sous-unité α et 8 sous-unité β qui sont

capables d'hétérodimériser pour former 24 intégrines différentes [40]. Les intégrines peuvent être subdivisées en plusieurs groupes selon leur ligand et leur ressemblance fonctionnelle: les intégrines à laminine, les intégrines à collagène, les intégrines leucocytaires et les intégrines reconnaissant les motifs RGD (Arginine/Glycine/Acide aspartique) [41] (**Figure 3**).

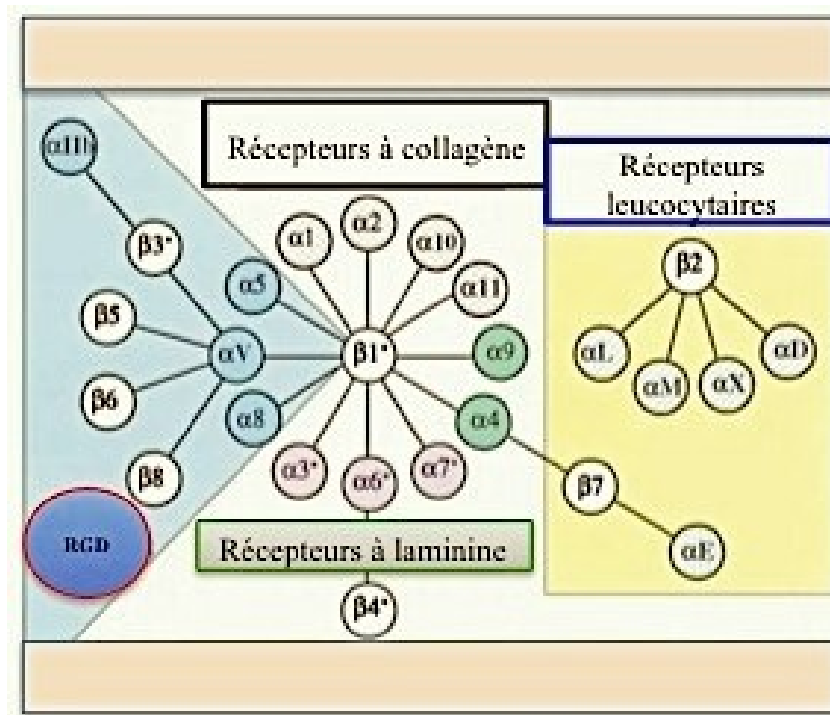


Figure 3. Les différentes sous-populations des intégrines

Cette figure représente les différentes associations entre les sous-unités α et les sous-unité β et le ligand correspondant pour chaque sous-population. (Modifiée de *Hynes, R. O. et al., 2002* [41] avec autorisation du *Cell Journal*).

Les intégrines sont des protéines de type I dont la majeure partie se trouve à la surface de la membrane et une petite partie se trouve intracellulaire. La partie extracellulaire possède une configuration repliée (forme inactive) susceptible de se déplier sous l'effet de certains signaux provenant de l'intérieur de la cellule, ce qui permet d'exposer les sites d'interaction avec la MEC (forme active) [42].

Les sous-unités α , ayant un poids moléculaire entre 120 et 180 KDa, comportent un domaine propulseur (propeller) en forme d'hélices à sept lames, supporté par un corps formé d'une cuisse (thigh), d'un genou (genu) et de deux mollets (calf 1 et calf 2) [43]. Le domaine à sept lames est impliqué dans la liaison de l'intégrine à son ligand mais aussi dans l'hétérodimérisation du récepteur [44].

Les sous-unités β , ayant un poids moléculaire qui varie entre 90 et 115 KDa, comportent un domaine βA globulaire d'interaction avec la matrice intégré entre des domaines d'hybridation, des domaines présentant une homologie avec la structure de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), un domaine PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin), riche en résidus cystéines, nécessaire pour le maintien de la forme inactive de l'intégrine, et un domaine cytoplasmique (β -tail) capable de lier plusieurs protéines cytoplasmiques.

Au niveau extracellulaire, chaque intégrine est capable de lier des ligands spécifiques au niveau de la MEC comme les collagènes, les laminines, la vitronectine, la fibronectine, les métalloprotéinases, l'angiostatine, et autres [45]. Au niveau intracellulaire, les intégrines sont associées à des protéines adaptatrices régulant la motilité au niveau du cytosquelette, sans être directement liées à l'actine, en particulier la paxilline à celui de la sous-unité α et la taline au niveau de la sous-unité β . Ces protéines sont nécessaires pour les interactions avec de nombreuses autres protéines telles que la kindline, la tensine, la filamine, l'actinine, et autres [41].

En effet, les intégrines assurent une signalisation bidirectionnelle nécessaire pour le transfert des informations entre la cellule et la MEC: une signalisation *inside-out* permettant aux signaux intracellulaires d'activer les intégrines en les redressant et en démasquant leurs sites de liaison aux ligands et une signalisation *outside-in* permettant à la cellule de recevoir et de transmettre des signaux de survie ou de prolifération suite à son attachement à la MEC [46]. La signalisation intracellulaire fait intervenir des protéines kinases spécialisées, comme la FAK (*Focal adhesion kinase*) ou l'ILK (*Integrin-linked kinase*), ces protéines recrutées vont activer à leur tour les voies de MAPK, PI3K, CrK/Cas et autres [47, 48]. Les voies de signalisation induites par les intégrines contrôlent plusieurs réponses cellulaires dont la survie, la prolifération et la migration cellulaire. De plus, les intégrines semblent jouer un rôle dans l'hémostase, la thrombose mais aussi dans le développement du cancer [49].

1.2.2.1.1 L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

L' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, nommée aussi GPIIb/IIIa ou CD41/CD61, est une glycoprotéine transmembranaire exprimée exclusivement à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes. Une signalisation *inside-out* induite par plusieurs agonistes plaquettaires, comme la thrombine, l'ADP, le collagène ou épinéphrine, conduit à un changement de conformation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ menant ainsi à l'activation de cette dernière [41, 46]. Une fois active, elle va améliorer son affinité à ses ligands naturels dont la fibronectine, le fibrinogène, et le facteur von Willebrand [11]. La liaison se fait au niveau de la séquence motif RGD trouvée sur les ligands d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Cette liaison est nécessaire pour l'agrégation et l'adhérence des plaquettes au niveau de la lumière du vaisseau sanguin. Cette intégrine a aussi un rôle important dans l'hémostase. Une étude a démontré que des mutations au niveau des gènes codants pour la sous-unité α ou β de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ chez les patients atteints de *Glanzman thrombostenia*, mènent à des hémorragies et à des problèmes d'hémostase [50].

1.2.2.1.2 L'intégrine $\alpha\text{5}\beta\text{1}$

L' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, le récepteur principal de la fibronectine, est exprimé à la surface des différents types cellulaires comme les plaquettes, les cellules T, les monocytes, les cellules épithéliales [51]. De plus, plusieurs tissus expriment cette intégrine dont la peau, le muscle cardiaque, les poumons, les intestins, la rétine, les amygdales et les vaisseaux sanguins [45, 52]. La forme active de l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ est capable de lier le motif RGD de la fibronectine et du fibrinogène [53, 54]. Cette intégrine contribue à stimuler plusieurs réponses immunitaires comme l'adhésion, la migration, la survie et la prolifération cellulaire. Son taux d'expression varie en fonction de la réponse immunitaire induite. La présence de plusieurs stimuli comme l'IL-6, la TGF- β et le PMA stimule l'expression de l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ à la surface de plusieurs types cellulaires [55, 56]. La surexpression de cette intégrine à la surface des lymphocytes T augmente l'activité cellulaire et améliore l'interaction de ces cellules avec les protéines de la MEC.

1.2.2.1.3 L'intégrine α M β 2

L' α M β 2, connue aussi sous le nom Mac-1 ou CD11b/CD18, est la principale intégrine leucocytaire, appartenant à la famille des intégrines β 2. Elle est exprimée à la surface des monocytes, des macrophages, des DC et des neutrophiles. Cette intégrine lie naturellement le fibrinogène et la vitronectine. Elle est aussi capable de lier le C3bi et des molécules d'adhésion comme l'héparine et l'ICAM-1 (molécules d'adhésion intracellulaire1) [57-59]. Son rôle principal consiste à l'adhésion et à la transmigration des leucocytes vers le site inflammatoire [60].

1.3 Interaction structurale du CD154 avec ses différents récepteurs

1.3.1 Interaction du CD154 avec le CD40

Les études sur l'interaction CD154/CD40 ont démontré son importance dans la régulation de la réponse immunitaire cellulaire et humorale menant au contrôle de plusieurs maladies affectant l'humain. Une interaction altérée entre ces deux molécules peut aboutir au développement de plusieurs maladies auto-immunes, inflammatoires et même au cancer.

1.3.1.1 Découverte de l'interaction

L'importance de l'interaction CD154/CD40 a été démontrée chez les patients atteints du syndrome d'hyper-IgM lié à l'X (HIGM-X). Ces patients souffrent d'anémie, de diarrhées chroniques, d'hépatites et cirrhoses du foie, dues à des infections répétées et chroniques, des infections récurrentes des voies respiratoires, de neutropénie et d'hyperplasies des organes lymphoïdes [61]. Ces symptômes sont dus principalement à l'incapacité de produire des anticorps d'isotypes IgG, IgE et IgA, nécessaires pour une bonne réponse immunitaire de type humorale permettant le contrôle des infections. Cependant, ces patients ont un niveau normal

ou élevé d'IgM et d'IgD. Cette immunodéficience HIGM-X est due à un mal fonctionnement des lymphocytes T. Ces derniers sont incapables d'ordonner les lymphocytes B d'induire la commutation de classe isotypique [62]. Plusieurs études ont été menées afin d'identifier la cause de cette perte de fonctions des cellules T chez ces patients. Plusieurs mutations ont été détectées au niveau du gène codant pour le CD154. Jusqu'à présent, plus de 217 patients et 105 mutations différentes ont été rapportés dans la banque de donnée [63, 64]. Parmi ces mutations, certaines peuvent être ponctuelles et peuvent affecter ainsi la stabilité de la structure du CD154 et même l'interaction CD154/CD40 [63]. De plus, des insertions ou des délétions ont été identifiées au niveau des acides nucléiques menant à l'apparition d'un codon de terminaison (codon-stop) prématuré menant à une absence de l'expression du CD154.

1.3.1.2 Structure de l'interaction

Selon l'étude co-cristallographique et suite à une étude par mutagenèse dirigée, plusieurs résidus impliqués dans l'interaction du CD154 avec le CD40 ont été identifiés. En effet, les résidus à charges basiques lysine 143 (K143), tyrosine 145 (Y145), arginine 203 (R203) et arginine 207 (R207) du CD154 et les résidus asparagine 84 (N84), glutamine 74 (Q74) et glutamine 117 (Q117) du CD40 semblent être critiques dans la liaison CD154/CD40 [65, 66]. Cette interaction polaire entre les résidus du CD154 et du CD40 est entourée d'un mur de résidus hydrophobiques, ce qui stabilise l'interaction entre ces deux protéines. Bajorath et al ont démontré que les résidus Y145 et R203 du CD154 sont les plus importants dans cette interaction [67].

Comme le CD40 peut être exprimé à la surface membranaire sous forme monomérique ou sous forme trimérique, Anand et al. ont proposé deux modèles d'interaction possible entre le CD154 et le CD40 [68]. Le premier modèle consiste à la liaison entre le CD154 trimérique et le CD40 exprimé sous forme trimérique, nécessaire pour induire une affinité plus importante entre ces deux molécules. Le deuxième modèle suggère la liaison entre le CD154 trimérique avec deux CD40 monomériques, nécessaire pour induire un signal intracellulaire plus important [68]. Autres groupes ont montré que l'interaction de la forme trimérique du CD154 au CD40 monomérique est capable d'induire la dimérisation ou la trimérisation de ce dernier. D'autre

part, notre groupe a démontré que l'homodimérisation du CD40 est due à la formation d'un pont disulfure entre deux molécules et est médié par une cystéine intracellulaire à la position 238 [38]. En effet, nous avons démontré que l'interaction CD154/CD40 mène à la translocation de ces deux protéines vers les radeaux lipidiques, et cette localisation dans ces microdomaines mène à l'activation de plusieurs voies de signalisation [38, 69].

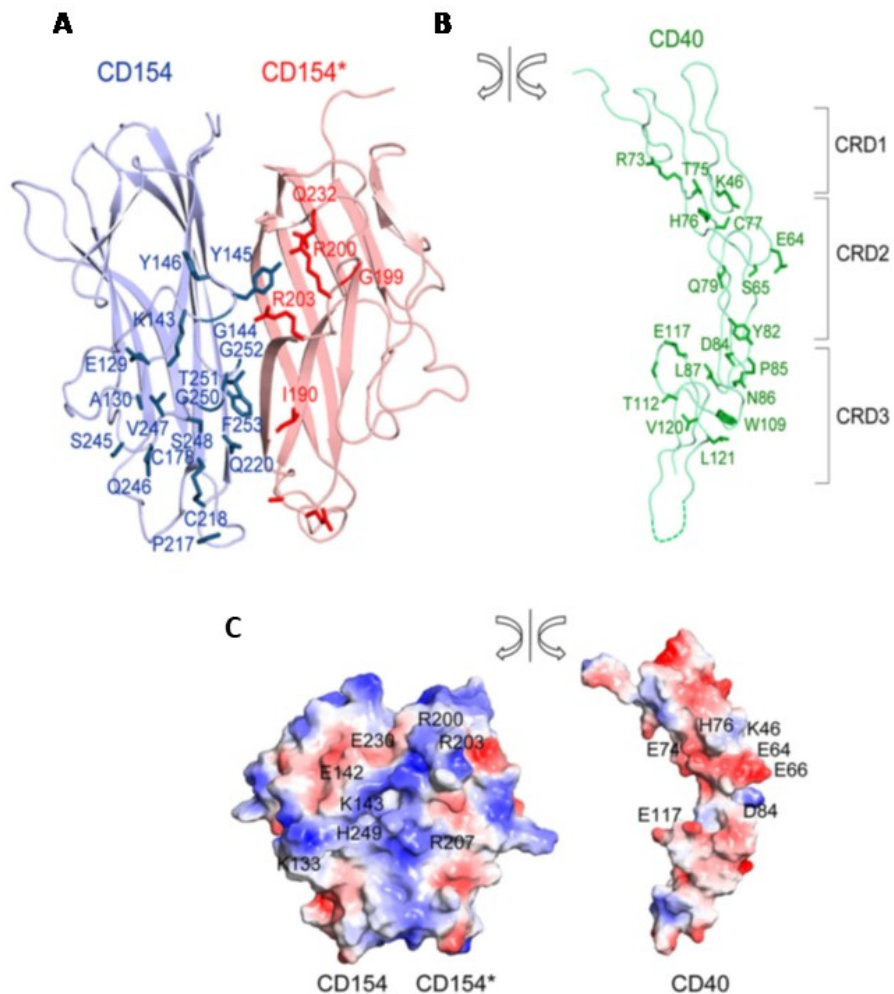


Figure 4. Les résidus impliqués dans l'interaction CD154/CD40.

Cette figure représente : A) les 17 acides aminés du premier monomère du CD154 (représenté en bleu) et 5 acides aminés du deuxième monomère (représenté en rouge) qui sont impliqués dans la liaison avec un monomère du CD40. B) les résidus du CD40 qui sont impliqués dans cette liaison. C) les résidus chargés négativement (en rouge) et positivement (en bleu) au niveau et autour des surfaces de liaison. À gauche, la surface des deux monomères de CD154 et à droite

celle d'un monomère du CD40. (Tirée de *An et al.*, 2011 [70] avec autorisation du *Journal of Biology Chemistry*).

1.3.2 Interaction du CD154 avec les intégrines

1.3.2.1 Découverte de l'interaction

En 2000, Mehlhop et al. ont montré que les souris déficientes pour le CD154 sont protégées contre une hyperactivité bronchiale induite par un allergène, contrairement aux souris déficientes pour le CD40 [71]. D'où l'hypothèse que le CD154 est capable de lier des récepteurs autres que le CD40. Dans une autre étude menée par Andre et al, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ a été identifiée comme un récepteur du CD154 à la surface des plaquettes activées [72]. Cette liaison est médiée grâce au motif RGD du CD154 humain. Et, en 2007, notre laboratoire a démontré que le sCD154 était capable de lier des cellules monocytaires qui n'expriment pas le CD40 [73]. Cette liaison a été inhibée par une forme soluble de l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ ou par un anticorps dirigé contre cette intégrine. D'où la découverte de l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ comme étant un récepteur pour le CD154. Aussi, en 2007, Zirlik et al. ont pu montrer que le sCD154 est capable aussi de lier l' $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ exprimé à la surface des cellules d'ovaires de hamster (cellules CHO) [74].

1.3.2.2 Structure de l'interaction

Plusieurs cellules peuvent exprimer simultanément différents récepteurs du CD154. Il s'avère donc possible que le CD154 se lie simultanément avec deux ou trois de ses récepteurs. Ce phénomène n'est évidemment possible que si les résidus impliqués dans l'interaction du CD154 avec ses récepteurs sont différents. En effet, il a été démontré que la liaison du sCD154 au CD40 exprimé à la surface d'une lignée lymphocytaire B, n'est pas inhibée en présence d'une forme soluble de l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, ce qui indique que le CD154 est capable de lier simultanément ces deux différents récepteurs [73].

Même si l' $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, l' $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ et l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sont tous des membres de la superfamille des intégrines, chaque récepteur est capable de lier le CD154 différemment. En fait, les formes actives et inactives de l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sont capables de lier le CD154 par son motif RGD, et

spécifiquement par le résidu Acide Aspartique 117 (D117) [75]. Alors que seule la forme inactive de l' $\alpha 5\beta 1$ lie le CD154, contrairement à son ligand naturel, la fibronectine. Récemment, nous avons identifié les résidus impliqués dans cette interaction soient les résidus Asparagine 151 (N151) et Glutamine (Q166) du CD154 [76]. Quant au $\alpha M\beta 2$, seule la forme active est capable de lier le CD154. Cette liaison se fait au niveau de la séquence EQLKSKTL du domaine I de l' $\alpha M\beta 2$ [60]. Nous avons démontré que le CD154 lie l' $\alpha M\beta 2$ via les mêmes résidus qui sont impliqués dans sa liaison au CD40, soit les résidus Y145 et R203 [76].

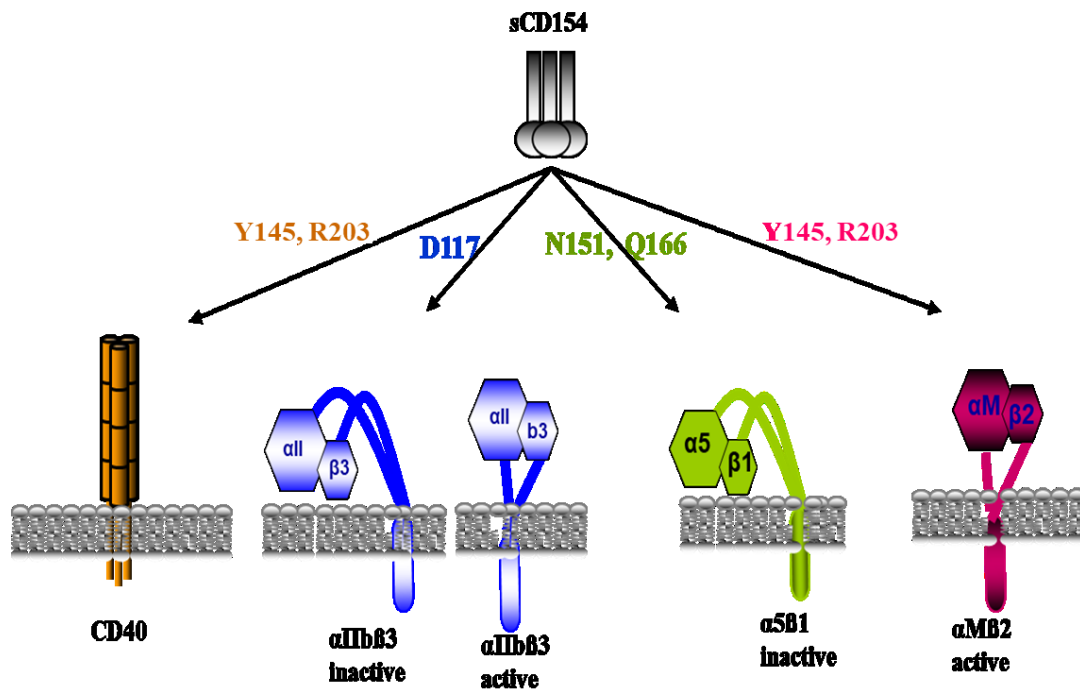


Figure 5. Interaction du CD154 avec ses différents récepteurs et les résidus impliqués

Le CD154 interagit avec le CD40 via les résidus Y145 et R203 du CD154, avec la forme active et inactive de l' $\alpha IIb\beta 3$ via le résidu D117 du CD154, avec la forme inactive de l' $\alpha 5\beta 1$ via les résidus N151 et Q166 du CD154 et avec la forme active de l' $\alpha M\beta 2$ via les résidus Y145 et R203 du CD154. (Modifiée de *G.S Hassan et al*, 2009 [77] avec autorisation du journal *Cell Press*).

1.4 Implication physiologique fonctionnelle de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs

1.4.1 L'interaction CD154/CD40

Les différentes réponses cellulaires induites suite à l'interaction du CD154 avec ses récepteurs sont la conséquence directe de l'activation des voies de signalisation intracellulaires spécifiques. Plusieurs études se sont intéressées aux voies de signalisation déclenchées par le couple CD154/CD40, contrairement aux voies de signalisations induites par la liaison CD154/intégrines qui restent très peu connues.

1.4.1.1 Les signaux bidirectionnels induits par le couple CD154/CD40

1.4.1.1.1 Signaux induits via le CD40 suite à sa liaison au CD154

Les voies de signalisation induites via le CD40 ont été largement étudiées au niveau des cellules B. L'induction des voies de signalisation spécifiques dépend du niveau d'expression du CD40. De forme naturellement trimérique à la membrane, le CD154 induit la trimérisation du CD40 ainsi que la translocation du CD40 vers les radeaux lipidiques. Comme le CD40 est dépourvu d'un domaine kinase [7], cette protéine requiert le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices qui se lient au domaine cytoplasmique du CD40, principalement les TRAFs (*TNF receptor-associated factors*) [78] et les JAK-3 (*Janus family Kinase-3*) [79, 80] activant ainsi plusieurs cascades de signalisation.

1.4.1.1.1.1 TRAFs

Les TRAFs sont les principales protéines adaptatrices impliquées dans l'induction du signal par le CD40. La relocalisation de ces protéines et leur interaction avec le CD40 déclenchent l'activation de plusieurs voies de signalisation comme la voie des MAPK telle que la voie du p-38, ERK, Akt et JNK (*Jun N-terminal Kinase*), la voie du facteur nucléaire- κ B (*Nuclear Factor- κ B*, NF- κ B), la voie phospholipase C γ (*Phospholipase C γ* , PLC γ) et la voie de la PI3 kinase [81] (**Figure 7 p.25**).

La famille des TRAFs comprend six membres (TRAF1, 2, 3, 4, 5, 6) possédant une structure similaire (**Figure 6**). Ces protéines sont constituées d'un domaine C-terminal carboxylé qui s'associe aux récepteurs et d'un domaine N-terminal qui est nécessaire pour les interactions homo- et hétéro-trimérique entre les TRAFs. Elles sont formées aussi d'un domaine de zing finger, variable d'un membre à l'autre, qui est responsable de l'association du TRAF aux protéines kinases et les différents facteurs de transcriptions [82]. De plus, elles sont constituées d'un domaine RING (*Really Interesting New Gene Domain*) riche en cystéines, ce domaine est nécessaire pour l'activation des différentes voies de signalisation [83, 84]. Récemment, une nouvelle protéine adaptatrice ayant une structure similaire aux TRAFs a été identifiée, nommée TRAF7. Cette dernière se distingue des autres TRAFs par la présence de sept répétitions du motif WD40 (composé de tryptophane (W) et d'acide aspartique (D)) hautement conservé [85, 86]. Une étude a démontré que le TRAF7 est capable d'induire spécifiquement le MAPKKK3 nécessaire pour l'activation d'AP-1 (*Activator Protein-1*) et de CHOP (*C/EBP-homologous protein*) [87].

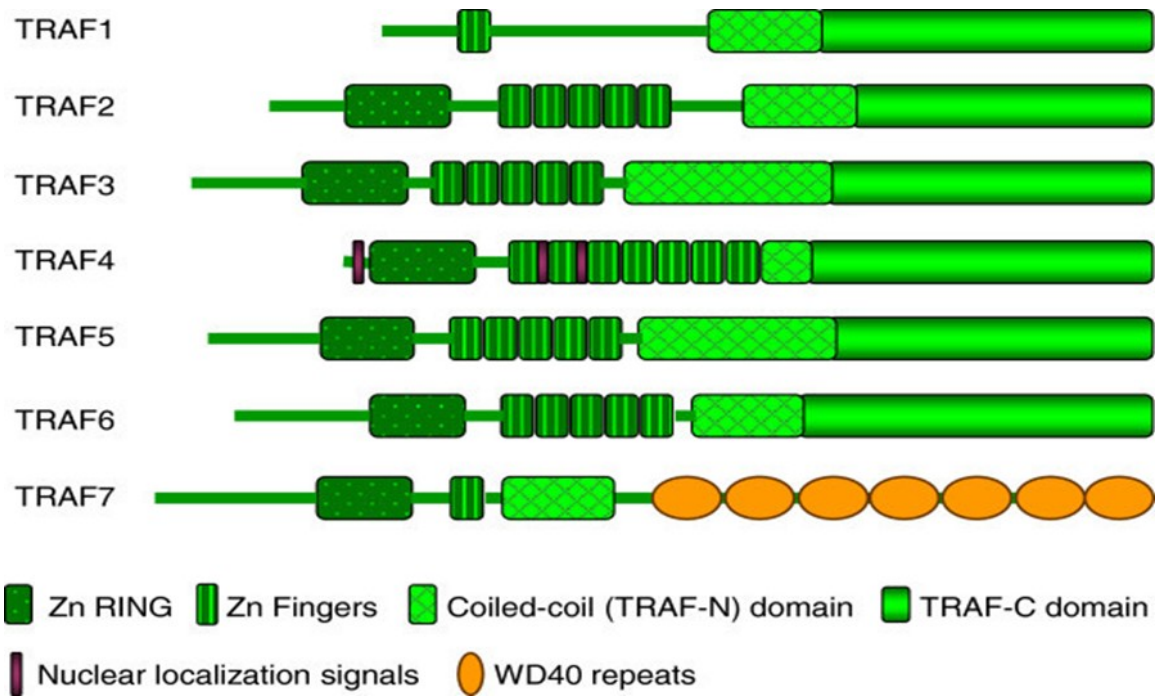


Figure 6. La structure des membres de la famille des TRAF

Les 7 TRAFs ont une structure similaire et les différents domaines des TRAF sont représentés par des symboles : un domaine TRAF N-terminal, un domaine TRAF C-terminal, un domaine « Zing finger » et un domaine RING. Les TRAF4 possèdent de plus 3 signaux de localisations nucléaires. Et la région C-terminal du TRAF7 est composée de 7 répétitions du domaine WD40. (Tirée de *Xie et al.*, 2013 [88] avec autorisation du *Journal of Molecular Signaling*).

La liaison des différents membres du TRAF au CD40 se fait via des résidus différents et leur activité varie d'un type cellulaire à l'autre. Les TRAF2 et 3 ont une affinité élevée pour le CD40, alors que les TRAF1, 5 et 6 ont une faible affinité [89]. La liaison du CD40 au TRAF2 est impliquée dans la prolifération des cellules B, la synergie entre le CD40 et le BCR (*B cell receptor*), ainsi que dans la dégradation du TRAF3, qui agit principalement comme un inhibiteur du TRAF2 [90]. En effet, il a été démontré que le TRAF2 induit l'activation de la voie JNK. L'activation de cette voie est bloquée par le TRAF3. Une surexpression du TRAF3 dans les cellules épithéliales est capable d'induire l'activation de la voie NF- κ B, contrairement aux cellules B [91, 92]. Ce qui montre que le TRAF3 possède différentes fonctions dépendamment du type cellulaire. Quant au TRAF6, il peut se lier directement au CD40 ou indirectement via le TRAF2. Cette liaison induit l'activation de la voie ERK1/2 des MAPK. Une stimulation du

CD40, au niveau des cellules B, induit une surexpression et une activation du TRAF6. Cette activation joue un rôle dans la production d'IL-6 [93]. De plus, le TRAF6 est requis pour la différenciation des cellules B en plasmocytes [94].

1.4.1.1.2 JAK3

La plupart des voies de signalisation induites via le CD40 et les diverses réponses cellulaires qui s'en suivent suite à l'interaction du CD40 par le CD154 dépendent presque exclusivement des TRAF. Par contre, d'autres molécules signalétiques impliquées dans la signalisation induite par le CD40 et indépendante des TRAF ont été identifiées, telles que les JAK3 (**Figure 7**). La liaison du JAK3 au CD40 conduit à l'activation du facteur de transcription STAT5, et à sa translocation vers le noyau cellulaire régulant ainsi l'expression des gènes du TNF- α , IL-6 et INF- γ [95]. De plus, il a été démontré que le recrutement des JAK3 au CD40 stimulé peut induire l'expression des molécules telles que le CD23, la lymphotoxine-alpha (LT- α) et l'ICAM-1 par le biais du STAT3 dans les cellules B [96].

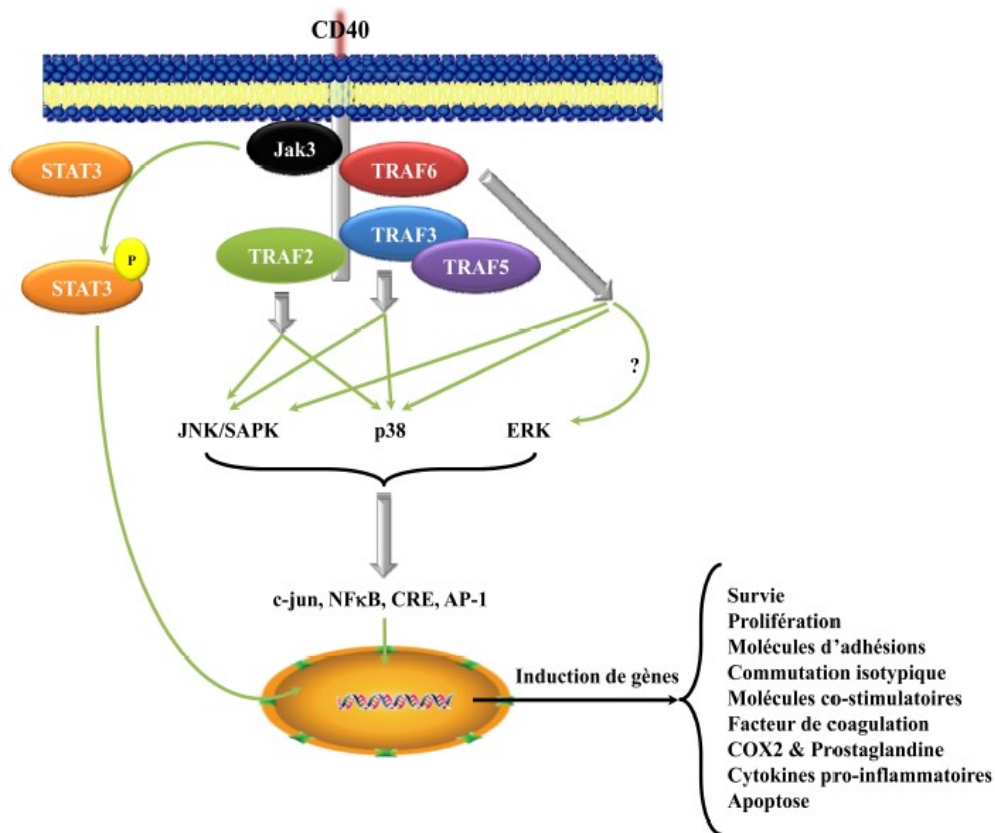


Figure 7. La signalisation intracellulaire induite par le CD40

La stimulation du CD40 induit le recrutement des TRAF et Jak3 qui vont stimuler l'activation de plusieurs protéines kinases. Ces dernières induisent l'activation de divers facteurs de transcription menant ainsi à plusieurs réponses biologiques. (Inspirée de *Grammer AC. et Lipsky PE. 2000 [97]* avec autorisation du *Advances in Immunology Journal*).

1.4.1.1.2 Signaux induits via le CD154 suite à sa liaison au CD40

La liaison du CD154 avec le CD40 est considérée comme bidirectionnelle. L'importance des signaux induits via ces deux molécules a été démontré au niveau des souris CD154 *knock-out* ou CD40 *knock-out* où une altération des réponses cellulaires a eu lieu comme la commutation de classe isotypique, la génération du centre germinatif et la production de cytokines [98, 99]. L'administration d'une forme soluble du CD40 aux souris CD40 *knock-out* permet restaurer le signal via le CD154 et initier la formation du centre germinatif [99]. Cependant cette administration ne permet pas aux cellules B d'induire la commutation de classe isotypique. Suite à la liaison CD154/CD40, plusieurs signaux intracellulaires peuvent être

induits via le CD40 mais aussi via le CD154. Cependant les signaux qui sont induits via le CD154 restent très peu connus. Une étude a montré que le transfert des cellules T CD4+, déficientes en CD154 et spécifiques pour un antigène, dans des souris sauvages n'induit pas la prolifération de ces cellules après stimulation avec le même antigène [100]. D'autre part, il a été démontré que la liaison des cellules T CD4+ exprimant le CD154 aux DC exprimant le CD40 induit la production d'IL-2, IL-4, IL-5 IL-10 et d'IFN- γ par les cellules T [101-103]. Les travaux réalisés par El Fakhry et al., dans notre laboratoire, ont montré que suite à l'engagement du CD154 par le CD40 une activation des voies ERK1/2 et p-38 est induite via le CD154 [104]. Cette liaison induit aussi la translocation du CD154 vers les radeaux lipidiques. Cette translocation est nécessaire pour l'activation de la voie PKC- α/δ , de la voie p-38 [104]. Notre groupe a démontré aussi que l'association du CD154 aux radeaux lipidiques dépend de la partie transmembranaire du CD154 et que cette association est primordiale pour l'activation de la voie Akt et à la production d'IL-2 [105].

1.4.1.2 Implication fonctionnelle du complexe CD154/CD40

Le complexe CD154/CD40 joue un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire. Il est impliqué dans l'immunité humorale et la production d'anticorps, dans l'immunité cellulaire et la régulation des médiateurs inflammatoires, mais aussi dans l'apoptose cellulaire.

1.4.1.2.1 Rôle dans l'immunité humorale

Le complexe CD154/CD40 occupe une fonction importante dans la régulation de l'immunité humorale. L'importance de cette interaction a été démontrée par les manifestations et les symptômes cliniques observés chez les patients souffrant du syndrome HIGM lié à l'X [106-109], ainsi que par la délétion des gènes du CD154 et du CD40 [110-113], ou même par l'utilisation des anticorps bloquant cette interaction [114-116]. L'absence de l'interaction CD154/CD40 a comme conséquence un défaut sévère de la production des anticorps IgG, IgA et IgE suite à une infection pathogénique, d'où le rôle crucial de cette interaction dans la commutation de classe isotypique dépendante de la présence des lymphocytes T.

Le couple CD154/CD40 a montré aussi son rôle dans l'immunité humorale grâce aux interactions entre les CPA comme les DC, les cellules B et les cellules T [117]. Suite à une infection pathogénique, les DC activées exprimant le CD40 vont interagir avec le CD154 des cellules T, ce qui mène à une augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices B7-1/B7-2 ou CD80/CD86, et à la sécrétion de l'IL-10 et l'IL-12 par les DC [117-119]. Ensuite, les cellules T activées vont se différencier en cellules T effectrices. Ces dernières vont se lier aux lymphocytes B via l'interaction CD154/CD40 ce qui induit la sécrétion de l'IL-2 et l'IL-4 par les cellules T [120]. En présence de ces cytokines, les lymphocytes B vont se proliférer et se différencier en plasmocytes, productrices d'immunoglobulines [121, 122]. L'interaction CD154/CD40 va induire aussi la sécrétion de l'IL-6, IL-10 et le TNF- α par les cellules B, ainsi que l'augmentation de l'expression d'ICAM-1, LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité CMH de classe I et de classe II au niveau des ces cellules, facilitant aussi la prolifération et la différenciation de ces cellules [33, 123-125]. De plus, l'interaction du CD154 des DC avec le CD40 des cellules B facilite la sécrétion, par les DC, des protéines activatrices des cellules B comme le BAFF (*B cell Activation Factor*) ou le BLys (*B lymphocyte Stimulator*) et l'APRIL (*A Proliferation Inducing Ligand*) qui participent aussi à la prolifération, la différenciation des cellules B et à la commutation de classe isotypique [121]. BAFF et APRIL jouent un rôle essentiel aussi dans l'homéostasie des lymphocytes B [122]. En effet, la production et la diversification des anticorps sont régulées par le couple CD154/CD40 dont la commutation de classe isotypique au niveau des régions constantes des anticorps et l'hypermutation somatique au niveau des segments variables des chaînes légères et lourdes qui sont essentielles pour la diversification des anticorps. La liaison du CD154 au CD40 induit le recrutement des protéines adaptatrices TRAF au niveau du domaine cytoplasmique du CD40 conduisant ainsi à l'activation de la voie du NF κ B via le complexe protéique IKK. La translocation du NF κ B vers le noyau mène à l'activation de la transcription des gènes AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) et UNG (*Uracil-DNA Glycosylase*) [126].

En plus de l'activation du CD40 par le CD154, l'apport des cytokines est nécessaire pour l'orientation de la commutation de classe isotypique. Alors que certaines études ont démontré que l'interaction CD154/CD40 seule peut être suffisante pour induire la sécrétion des IgA et

IgG alors que l'ajout d'IL-4 est nécessaire pour la production d'IgE [127, 128]. De plus, l'interaction des cellules B folliculaires avec les cellules Tfh (*T follicular helper*), qui se fait par la liaison du CD40 au CD154, est nécessaire pour le maintien du centre germinatif, la prolifération des cellules B, la survie cellulaire B, la commutation isotypique, la différenciation en plasmocytes et la production des cellules B mémoires [81].

Comme les signaux induits par le couple CD154/CD40 sont bidirectionnels, une coopération entre les différentes voies de signalisations mène à la régulation de la réponse immunitaire humorale.

1.4.1.2.2 Rôle dans l'immunité cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire commence par la reconnaissance spécifique d'un antigène par les lymphocytes T au niveau des CPA et s'en suit un processus de prolifération et de différenciation des ces lymphocytes T en clones de cellules effectrices tels que les lymphocytes Th (*T helper*) qui vont jouer un rôle important dans l'expansion des cellules T et B, qui reconnaissent l'antigène, et le recrutement d'autres types cellulaires dans le but de détruire l'agent pathogène, et des lymphocytes T cytotoxiques capables de détruire directement les cellules infectées par l'agent pathogène grâce à la libération des molécules cytotoxiques telles que la perforine. Elle se caractérise aussi par la sécrétion de plusieurs médiateurs inflammatoires par les cellules immunitaires. Le couple CD154/CD40 formé lors de l'interaction entre les lymphocytes T/B, les DC, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les plaquettes, les monocytes/macrophages et autres entraînent la sécrétion de plusieurs médiateurs inflammatoires comme les cytokines, les métalloprotéinases (MMPs), les chimiokines, les molécules d'adhésion et les facteurs de croissance. Ces médiateurs sont nécessaires pour l'activation et le recrutement des cellules immunitaires aux sites inflammatoires suite à une infection à des pathogènes [129, 130].

L'interaction T/B folliculaires, médiée par le CD154 et le CD40, permet aux cellules T auxiliaires de se différencier en cellules Tfh exprimant le CXCL13 (*Chemokine, motif C-X-C, ligand 13*), CD154 et l'ICOS, et induit la sécrétion d'IL-21 [81]. De plus, la formation du complexe CD154/CD40 est nécessaire pour l'activation des cellules Th et la production d'IL-12 qui induit une réponse de type Th1 des lymphocytes T [7].

L'interaction du CD154 avec le CD40 exprimé à la surface des cellules non hématopoïétiques telles que les cellules musculaires lisses va stimuler la sécrétion de plusieurs chimiokines, cytokines et métalloprotéinases (MMP1, 2, 3 et 9). De plus, la liaison du CD154 avec le CD40 exprimé par les cellules endothéliales induit l'activation de ces cellules ainsi que le recrutement des cellules T, des monocytes, de macrophages au site inflammatoire. Ceci est due à la sécrétion des IL-1, IL-6, IL-8, la surexpression de VCAM-1 et d'ICAM-1 [131]. Le complexe CD154/CD40 est capable aussi de stimuler l'expression de plusieurs molécules co-stimulatrices et la sécrétion des cytokines telles que l'IL-8, le TNF- α , le MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*), nécessaire pour l'expansion des cellules T et l'activation de plusieurs CPA [132-134]. Le **tableau III** présente le rôle du complexe CD154/CD40 dans la régulation de plusieurs médiateurs inflammatoires nécessaire pour le contrôle de la réponse immunitaire cellulaire et inflammatoires qui facilitent l'activation et le recrutement des cellules aux sites inflammatoires.

Cytokines	Chimiokines	MMP	Molécules d'adhésion	Facteurs de croissance	Facteurs Pro-coagulants
↑ IL-1 α/β	↑ IL-8	↑ MMP-1	↑ LFA-1	↑ VEGF	↑Facteur tissulaire
↑ IL-2	↑ MIP-1 α/β	↑ MMP-2	↑ ICAM-1	↑ FGF	↓Thrombomoduline
↑ IL-4	↑ RANTES	↑ MMP-3	↑ VCAM-1	↑ M-CSF	
↑ IL-5	↑ MCP-1	↑ MMP-7	↑ E-sélectine	↑ GM-CSF	
↑ IL-6	↑ ABCD-1	↑ MMP-8	↑ P-sélectine	↓ TGF- β	
↑ IL-10	↑ CCR1	↑ MMP-9	↑ VLA-1		
↑ IL-12	↑ CCR5	↑ MMP-10			
↑ IL-15		↑ MMP-11			
↑ IL-18		↑ MMP-12			
↑ TNF- α/β		↑ MMP-13			
↑ INF- γ					

Tableau III. Le rôle du complexe CD154/CD40 dans la régulation de la réponse immunitaire cellulaire.

1.4.1.2.3 Rôle dans la mort cellulaire

Le complexe CD154/CD40 intervient d'une façon très importante dans la régulation de la réponse immunitaire. Outre son rôle dans le maintien de la réponse immunitaire, l'activation et la prolifération cellulaire, ce couple agit aussi bien dans l'induction de la survie que dans la mort cellulaire [135].

Il existe différents types de mort cellulaire telle que la nécrose, l'apoptose, l'autophagie et la sénescence. La nécrose et l'apoptose sont les deux formes majeures de la mort cellulaire. Les stimuli peuvent être les mêmes mais la distinction entre ces deux formes reste surtout au niveau de la morphologie cellulaire. La nécrose, une forme passive et accidentelle, consiste à une inhibition de la production d'ATP (*Adenosine Triphosphate*). Ce processus résulte d'une perte de l'intégrité membranaire conduisant à un découlement du contenu cellulaire. Cette forme joue un rôle important dans le recyclage des cellules. Alors que l'apoptose, une forme de mort cellulaire programmée, dépend de la présence d'ATP. Les signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose comprennent une fragmentation nucléaire, une dégradation de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique), une condensation de la chromatine ainsi que la formation des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules voisines [136].

Le CD40 peut être exprimé à la surface de plusieurs cellules malignes comme les leucémies lymphoblastiques, les lymphomes non hodgkiniens et plusieurs carcinomes [137]. L'activation du CD40 exprimé à la surface de ces dernières, déclenche des effets antiprolifératifs et apoptotiques. Notre laboratoire a bien démontré que la mort des lignées cellulaires provenant d'un lymphome de Burkitt est induite suite à l'engagement du CD40 et s'en suit une perméabilisation du lysosome ainsi qu'une diffusion de la cathepsine B dans le cytoplasme de ces cellules [138]. De plus, cette mort cellulaire nécessite la présence d'un dérivé réactif de l'oxygène, le ROS (*Reactive Oxygen species*). Nous avons montré aussi que la mort cellulaire induite par le CD40 dépend de son interaction avec la molécule adaptatrice, le TRAF6 [138].

Plusieurs études ont montré qu'en réponse du CD154, le CD40 exprimé par les cellules lymphoblastiques B induit une augmentation de l'expression des protéines apoptotiques telles que Bax (*Bcl-2 Associated X protein*), Bik (*Bcl-2 Interacting Killer*), et Bak (*Bcl-2 homology Antagonist Killer*), favorisant ainsi l'activation de la caspase-3 [139, 140]. Alors que d'autres

études ont montré que la mort cellulaire induite par le CD40, au niveau des tumeurs urothéliales, nécessite l'activation de la voie JNK et des caspases -3 et -9 [141]. Dans ce contexte, Elmetwali T. et al. ont montré que le CD154 membranaire induit la mort des lignées cellulaires provenant d'un carcinome de la vessie suite au recrutement du TRAF3 qui induit à son tour l'activation de la voie JNK et de la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette équipe a démontré aussi que le recrutement du TRAF6, induisant la survie par l'activation de la voie de l'Akt, est bloqué par l'intervention du TRAF3 [142].

L'induction de la mort cellulaire par le complexe CD154/CD40 dépend du type cellulaire en question mais aussi du niveau d'expression du CD40. Il a été démontré qu'un faible niveau d'expression du CD40 induit un signal de prolifération cellulaire alors qu'une forte expression du CD40 est capable d'induire un signal de mort ou d'un arrêt de la croissance cellulaire [142].

Étant donné que la liaison du CD154 au CD40 peut conduire à des effets anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques au niveau des cellules tumorales, ce couple peut constituer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de nombreuses complications associées à certains types de cancers.

1.4.2 L'interaction CD154/intégrines

1.4.2.1 Implication physiologique du complexe CD154/ α IIB β 3

Prasad et al. ont montré que la liaison du sCD154 à l' α IIB β 3 des plaquettes induit l'activation de ce dernier, par un signal *outside-in*, et stimule ainsi l'activation et l'agrégation plaquettaire [143]. Cette activation est nécessaire pour la stabilisation du thrombus plaquettaire *in vivo*. La liaison du CD154 à cette intégrine induit la phosphorylation des résidus tyrosine au niveau du domaine cytoplasmique de la chaîne β 3 [143]. Cette phosphorylation est indispensable pour stabiliser les thrombi artériels. Ces résultats montrent que le CD154, suite à son interaction avec l' α IIB β 3, constitue un agoniste plaquettaire qui réagit d'une manière autocrine et spécifique pour régler la biologie des plaquettes. Il a été démontré que l'administration du sCD154 est capable aussi de réduire le stade de la thrombose chez les souris CD154 *knock-out* [72]. En effet, l'utilisation d'un antagoniste de l' α IIB β 3, comme l'integrilin,

est capable d'inhiber l'activation plaquettaire, tandis que l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction du CD154 avec le CD40 n'affecte pas cette activation [143].

1.4.2.2 Implication physiologique du complexe CD154/ α 5 β 1

La liaison du sCD154 avec l' α 5 β 1 a montré aussi un rôle dans l'activation des plaquettes indépendamment de l' α IIb β 3, suggérant ainsi un rôle dans la thrombose [144]. Aussi, notre groupe a pu montrer que le sCD154 est capable de se lier aux monocytes exprimant l' α 5 β 1 inactive induisant ainsi la phosphorylation de la voie d'ERK1/2 et la surexpression de l'IL-8 [73]. De plus, Fakhry et al. ont montré que le sCD154 lie le CD40 et l' α 5 β 1 des monocytes induisant ainsi une synergie de réponses cellulaires comme l'activation des voies p38 et ERK1/2, et la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 [75].

Autres études ont montré que le CD154 des lymphocytes T, provenant des patients asthmatiques, est capable d'interagir avec l' α 5 β 1 des fibroblastes bronchiques [145]. Cette interaction induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les fibroblastes [145]. Le blocage de cette liaison réduit d'une façon considérable la production d'IL-6 qui joue un rôle dans le remodelage de la muqueuse bronchique.

1.4.2.3 Implication physiologique du complexe CD154/ α M β 2

La liaison du CD154 à l' α M β 2 accorde à cette intégrine un rôle important dans les réponses immunitaires, la coagulation et l'inflammation. En effet, Zirlik et al ont montré que cette liaison favorise l'adhésion et la transmigration des neutrophiles et des monocytes au niveau de la plaque athérosclérotique, est donc impliquée dans la formation néo-intimale, une composante clé de l'athérosclérose [74]. Le sCD154 était capable de stimuler l'expression du α M β 2 à la surface des neutrophiles, et améliore le recrutement de ces cellules au niveau de la plaque athérosclérotique [74]. De plus, Wolf et al ont montré que l'inhibition de l'interaction du CD154 avec l' α M β 2 atténue l'accumulation des monocytes au niveau du site inflammatoire mais aussi réduit d'une façon considérable la formation d'une plaque d'athérome [60].

Une étude récente a montré le rôle de l'interaction CD154/ α M β 2 dans la production d'IL-12 par les CPA comme les cellules dendritiques et les macrophages [146]. Cette étude montre que les souris CD154 *knock-out* et les souris CD40 *knock-out* sont sensibles à une infection par le *Leishmania major*. Alors que suite à l'injection d'IL-12, les souris CD40 *knock-out* seront résistantes à long terme [146], ce qui n'est pas le cas des souris CD154 *knock-out*. Cependant, un blocage de l'interaction du CD154/ α M β 2 chez les souris CD40 *knock-out* et suite à une injection d'IL-12 rend ces souris sensibles à cette infection. D'où le rôle du CD154/ α M β 2 dans la production de cette interleukine ainsi qu'au maintien d'une réponse immunitaire Th1 suite à une infection par le *Leishmania major* [146].

1.5 L'association du CD154 et du CD40 avec des protéines de surface

Plusieurs molécules peuvent être associées avec le CD154 ou le CD40 à la surface cellulaire. Cette association semble avoir un rôle dans la modulation de certaines réponses biologiques induites par le CD154 ou par le CD40.

1.5.1 L'association du CD154 avec le CD28i

Le CD28, molécule co-stimulatrice, impliquée dans la formation de la synapse immunologique suite à sa liaison au ligand B7 et joue un rôle crucial dans la stimulation des cellules T naïves [147]. Le CD28i est un isoforme du CD28 qui ne possède pas un motif de liaison au ligand B7. En 2004, Mikolajczak et al. ont démontré que le CD154 se trouve associé au CD28i à la surface des lignées cellulaires T [148]. Par microscopie confocale, ils ont observé une co-localisation et une co-internalisation du CD154/CD28i dans des vésicules cytoplasmiques suite à l'engagement du CD154. De plus, ils ont montré une amplification de l'activation des voies JNK et NF κ B induites via le CD154 suite à une stimulation simultanée du CD154 et du CD28i [148]. Le CD28i agit comme une molécule adaptatrice et peut avoir un rôle modulateur des réponses cellulaires induites par le CD154.

1.5.2 L'association du CD40 avec le CD20

1.5.2.1 L'association physique entre le CD40 et le CD20

Il a été démontré que l'engagement du CD40 et du CMH de classe II exprimés à la surface des lignées cellulaires B induit une adhésion homotypique cellulaire en induisant les signaux intracellulaires nécessaires pour l'activation des récepteurs d'adhésion cellulaire [149]. Cette adhésion, induite par le CD40 et le CMH de classe II, se fait dépendamment et même indépendamment des molécules d'adhérence, le LFA-1. En 1999, notre laboratoire a produit un anticorps monoclonal murin, le *mAb R21*, capable d'abolir complètement l'adhésion homotypique des lignées cellulaires B (LFA-1 négative) déclenchée par le CD40 et par le CMH de classe II [150]. Cependant, cet anticorps n'est pas capable d'empêcher l'adhésion homotypique des lignées cellulaires B (LFA-1 positive) dépendante du LFA-1 et de la stimulation du CD40 et du CMH de classe II. Les analyses biochimiques ont montré que la cible de cet anticorps est une molécule exprimée spécifiquement à la surface des cellules B, nommée le CD20. Nous avons montré que cette molécule se trouve associée physiquement avec le CD40 et le CMH de classe II à la surface de plusieurs lignées cellulaires B. Cette association ne dépend pas de l'expression simultanée de ces molécules. Nos résultats montrent que le CD20 est associé physiquement au CD40 et au CMH de classe II et pourra avoir un effet modulateur sur leurs fonctions [150].

Suite à ces résultats, Léveillé et al. ont pu montrer par la suite que le CD40 pourra être aussi associé au CMH de classe II à la surface des cellules B. De plus, ils ont démontré que, suite à la stimulation du CD40, un faible pourcentage de cette molécule se trouve associée au CMH de classe II au niveau du cytosquelette [151].

1.5.2.1.1 Le CD20

Le CD20, nommé aussi Bp35, est une phosphoprotéine non glycosylée appartenant à la famille de tétraspanines. Découverte par Stachenko et al. en 1980 [152], elle a été identifiée à l'aide des anticorps monoclonaux qui sont capables de la lier tels que le B1 [153] et l'IF5 [154]. Le CD20 est parmi les premiers antigènes de différenciation des lymphocytes B humains, elle

est considérée comme un marqueur spécifique des cellules B [152, 155]. L'intérêt de cette molécule n'a cessé de s'accroître du fait qu'elle est considérée comme une cible privilégiée pour l'immunothérapie.

1.5.2.1.1.1 Structure du CD20

Le gène du CD20 fait partie du groupe des gènes MS4A1 (*membrane spanning 4 domains, groupe A, membre 1*), il est localisé sur le chromosome 11 en position 11q12-13 [156]. Son promoteur contient des sites de fixation pour un certain nombre de facteurs de transcription tels que Pip ou PU., Oct-1 (*Octamer-1*) et Oct-2 (*Octamer-2*) [155, 157].

La protéine CD20 est composée de 297 acides aminés, Elle est constituée de quatre domaines transmembranaires en forme d'hélice α , avec des extrémités amino- et carboxy-terminales intracytoplasmiques et deux boucles extracellulaires dont une petite et une grande composée de 43 acides aminés située entre le troisième et le quatrième domaine transmembranaire (**Figure 8**) [158]. Elle possède un poids moléculaire qui varie entre 33 et 37 KDa.

Le domaine cytoplasmique du CD20 possède de nombreux résidus sérine et thréonine qui sont des sites potentiels de phosphorylation suite à l'activation de la molécule par de diverses activateurs (les esters de phorbol, le BCR et des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD20). Le domaine extracellulaire contient la plupart des épitopes connus par les anti-CD20 (résidus situés en position 142 à 184), dont les résidus Alanine 170 et Proline 172 semblent être les plus importants [159]. De plus, les résidus situés en position 219 à 225 dans la partie C-terminale semblent être critique dans l'interaction du CD20 avec les radeaux lipidiques.

Il existe environ 73% d'homologie entre le CD20 humain et murin, leur domaine extracellulaire au niveau du grand boucle se diffère de 16 sur 43 acides aminés [160].

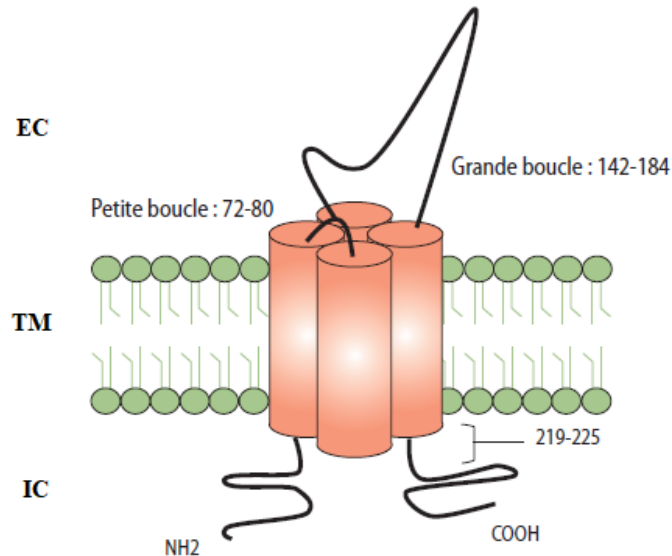


Figure 8. La structure CD20

La protéine CD20 est schématisée avec son domaine extracellulaire (EC) formé de deux boucles, quatre domaines transmembranaire (TM) et deux extrémités N- et C-terminal intracellulaires (IC) (Inspirée de *Cartron G. et al.* [161] avec autorisation du *Journal of the American Society of Hematology*).

1.5.2.1.1.2 Expression du CD20

Le CD20 est exprimé à la surface des cellules pré-B et persiste tout au long de la différenciation lymphoïde B jusqu'à ce qu'il disparaisse au stade plasmocytaire. En effet, cette molécule ne se trouve pas exprimée au niveau des cellules hématopoïétiques, ni des cellules pro-B [162]. Ce profil d'expression permet de comprendre que son ciblage par un anticorps cytolytique n'induit pas une diminution significative du taux d'immunoglobulines, et n'affecte pas la reconstitution du pool des lymphocytes B.

La protéine CD20 est exprimée sous forme monomérique à la surface membranaire, mais elle peut être aussi exprimée sous forme de dimères ou de tétramères associés eux-mêmes dans des complexes protéiques avec d'autres protéines comme le CD40, les protéines du CMH de classe II, le p75/50 ou le Cbp (*C-terminal src kinase binding protein*) et le CD32b ou le FcγRIIb

(récepteur pour les fragments Fc des immunoglobulines G). Cette association pourrait interférer avec les fonctions associées à ces protéines [161].

Étant exprimé par les cellules B, le CD20 a été détecté à la surface des cellules B tumorales [163-165]. La modulation de l'expression du CD20 à la surface des cellules B et surtout des cellules B tumorales a été étudié dans le but d'améliorer l'activité cytolytique des anticorps dirigés contre le CD20.

Il a été démontré que le niveau d'expression de CD20 par des lignées lymphomateuses semble être augmenté en présence de certaines cytokines comme l'IFN- α , l'IFN- γ , le TNF- α , le GM-CSF, l'IL-1 l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-6 [161, 166, 167]. Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de l'expression du CD20 restent mal connus. Alors que d'autres études ont montré que la présence d'IL-4 conduit à la diminution de l'expression du CD20 à la surface des cellules B normales et leucémiques sans affecter la quantité du messenger du CD20 [168].

Le niveau d'expression du CD20 peut affecter la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément. Il a été démontré que les anticorps cytolytiques anti-CD20 sensibilisent plus les cellules provenant de la leucémie lymphoïde chronique à la lyse par le complément en présence d'une forte expression du CD20 [169, 170].

1.5.2.1.1.3 Fonctions du CD20

Jusqu'à présent le CD20 n'a pas de ligand connu et sa structure membranaire ne représente pas la structure d'un récepteur. Les souris déficientes en CD20 n'ont pas d'anomalies immuno- phénotypiques particulières, ou de déficit des fonctions cellulaires B [171]. Pour cela, sa fonction biologique est restée pour longtemps méconnue. Récemment, des données expérimentales ont associé au CD20 un rôle de canal calcique, jouant ainsi un rôle dans l'homéostasie calcique intracellulaire [172].

Pour appréhender la fonction du CD20, cette dernière a été ciblée par des anticorps monoclonaux [162, 173]. Le premier clone qui a été développé est le clone B1 qui correspond au Tositumomab dans sa version thérapeutique [153].

En fait, plusieurs clones dirigés contre le CD20 ont été développés qui manifestent différentes réponses, les clones B1, 2H7 et C2B8 sont capables d'induire une inhibition de la prolifération cellulaire alors que le clone 1F5 induit une activation et une prolifération cellulaire [162, 174]. L'activation du CD20, induite par l'1F5, stimule l'activation de plusieurs protéines kinases appartenant à la famille Src comme Lyn, Fyn et Lck. La phosphorylation de ces dernières induit l'activation de plusieurs voies de signalisation comme la voie de PLC- γ , la voie de MAPKines et la voie du PKC [175, 176]. Cette activation est dépendante du niveau d'expression et de la répartition membranaire du CD20.

Jusqu'à présent deux épitopes au niveau du CD20 sont reconnus menant à des effets moléculaires différents [177, 178]. Par exemple, les anticorps qui reconnaissent les épitopes de type I, tels que le Rituximab, le Veltuzumab, l'Ofatumumab, l'Ublituximab, sont capables d'induire la translocation du complexe CD20/anticorps au sein des radeaux lipidiques. Ceci conduit à la co-localisation du CD20 et des protéines de signalisation menant à un signal calcique ainsi qu'à l'apoptose caspase-dépendante. Cette translocation se fait d'une façon identique au BCR suggérant une coordination entre les molécules [179, 180].

Les anticorps qui reconnaissent les épitopes de type II comme le B1, l'Obinutuzumab et le Tositumomab ne sont pas capables d'induire la translocation du complexe CD20/anticorps vers les radeaux lipidiques alors qu'ils sont capables de favoriser l'adhésion homotypique qui mène à un réarrangement des filaments d'actine conduisant ainsi à une libération des protéases comme les cathepsines. Ces dernières sont capables d'induire une cytotoxicité cellulaire indépendante des caspases [181]. De plus, les anticorps de type I sont capables de lier deux fois plus le CD20 que les anticorps de type II [177].

De plus, ils ont démontré que la liaison du CD20 aux anticorps ne s'accompagne pas d'une modulation de l'expression du CD20 ou d'une libération de cette molécule de la surface membranaire [182].

D'autres réponses biologiques sont induites suite à la liaison du CD20 aux anticorps, on peut citer une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II [26], une diminution du niveau d'expression du BCR [183] et le décapage du Fc ϵ RII (CD23) [184, 185].

1.5.2.1.1.4 Le CD20 : cible thérapeutique en immunothérapie

Le CD20 représente une bonne cible antigénique en immunothérapie passive. Cette molécule, qui est un marqueur spécifique des cellules B, est fortement exprimée à la surface cellulaire du stade pré-B au stade de B mémoires. De plus, elle est exprimée d'une façon importante à la surface des cellules B malignes où elle sert comme une cible aux traitements visant à éliminer les cellules B tout en épargnant les plasmocytes producteurs des anticorps [186-188]. Donc, le prendre comme cible thérapeutique n'affecte pas le renouvellement des cellules immunitaires, ni la production des anticorps et donc n'expose pas les patients à des risques d'infections.

Les principaux anticorps monoclonaux anti-CD20 développés à des fins thérapeutiques sont le Rituximab, l'Ofatumumab, l'Ibritumomab, l'Obinutuzumab, le Tositumomab, l'Ublituximab. En effet, le Rituximab est le premier anticorps monoclonal utilisé, à visée thérapeutique, en hématologie. Il a été utilisé dans le cadre des lymphomes où les cellules B, exprimant le CD20, représentent 80% des lymphomes [189]. Et depuis, de nombreuses études cliniques ont montré son efficacité et sa tolérance [190-192]. Alors que, les autres anticorps comme l'Ibritumomab et le Tositumomab sont couplés à des molécules radioactives, telles que l'Yttrium 90 et l'iode-131 respectivement. L'Ibritumomab a été utilisé dans le traitement des rechutes de lymphomes folliculaires et le Tositumomab dans les lymphomes non-hodgkiniens [193]. Mais la toxicité des agents radioactifs limite leur utilisation. Le Rituximab présente l'anti-CD20 le plus fréquemment utilisé en pratique clinique et semble être un agent thérapeutique prometteur.

1.5.2.1.1.4.1 Le Rituximab

Le Rituximab a été produit par Biogen Idec Inc. en 1994. Il a été nommé aussi IDEC-C2B8, Mabthera ou Rituxan. C'est un anticorps monoclonal chimérique, murin humanisé dirigé contre le CD20 humain [194]. En 1998, le Rituximab a obtenu son autorisation de mise sur le marché aux États-Unis [189].

Cet anticorps chimérique est produit par génie génétique, il est constitué des régions variables d'immunoglobulines Fab murines dirigés contre le CD20 humain, ces régions sont fusionnées à des régions constantes Fc d'une chaîne lourde $\gamma 1$ (IgG1) humaine lié à une chaîne légère κ humaine. Il a été produit par les cellules de mammifères (ovaires de hamster chinois) et purifié par chromatographie d'affinité et d'échange d'ions [161, 189].

Le Rituximab lie le CD20 via un épitope situé sur la grande boucle extracellulaire. Cette boucle possède une importance particulière par la présence des deux cystéines en position 167 et 183 permettant la formation d'un pont disulfure et nécessaire pour maintenir la conformation de l'épitope du Rituximab [195].

1.5.2.1.1.4.1.1 Mécanismes d'action du Rituximab

Comme les fonctions de la cible, CD20, sont peu connues, les modes d'action du Rituximab sont partiellement élucidés. Suite à sa liaison au CD20, le Rituximab est capable d'induire la translocation de cette molécule vers les radeaux lipidiques [177, 196]. De plus, il a été démontré que cette liaison est suivie d'une perte d'expression du CD20 surtout au niveau des cellules provenant des patients atteints de leucémie chroniques [182]. Ceci a été observé *in vitro*, suite à l'incubation des cellules B avec des macrophages où ces derniers captent des fragments de la surface cellulaire dans lequel se trouve le complexe CD20-Rituximab [197]. Ce phénomène est nommé « rasage ou shaving » du CD20. Plusieurs études ont montré que la présence d'une forte concentration du Rituximab est responsable du rasage du CD20 où le complexe CD20/Rituximab se lie aux récepteurs Fc γ RI des macrophages. Pour cette raison, il est recommandé de diminuer la dose du Rituximab [198]. À l'issue de ces études, la dose du Rituximab a été standardisée à 375 mg/m² de surface corporelle.

En revanche, le Rituximab pourra induire la déplétion lymphocytaires B complète par plusieurs mécanismes d'action:

1.5.2.1.1.4.1.1.1 La voie de l'apoptose

Plusieurs études, réalisées *in vitro*, ont démontré que la liaison du Rituximab au CD20 induit la voie de l'apoptose, une mort cellulaire programmée [161]. Même si le rôle biologique

du CD20 reste mal connu, les différentes voies de signalisations impliquées dans l'induction de l'apoptose ont été élucidées.

Il a été démontré que la fixation du Rituximab au CD20 est capable d'induire un changement de conformation de ce dernier par le biais de la phosphorylation de plusieurs protéines intracellulaires comme la phosphorylation de la phospholipase C, PLC γ 2 par les protéines kinases Lyn, Fyn et Lck (**Figure 9**). Ceci assure une augmentation du flux calcique vers le secteur intracellulaire, donc une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium et il s'ensuit une activation de la caspase-3 menant ainsi au blocage du cycle cellulaire en phase S [173, 199]. Alors que d'autres études ont montré que suite à la translocation du complexe CD20-Rituximab au sein des radeaux lipidiques, l'activité des Src kinases se trouvent inhibée conduisant ainsi à l'inhibition de la voie p38 Kinases et de l'activité NF- κ B et donc le répresseur transcriptionnel YY1 n'empêche plus l'expression des récepteurs de mort cellulaire, comme le FAS (**Figure 9**) [161]. De plus, Stel *et al.* ont montré que le Rituximab stimule la réorganisation des radeaux lipidiques facilitant l'agrégation des récepteurs de mort cellulaire et conduit ainsi au recrutement et à l'activation de la caspase-8 et l'induction de la mort cellulaire [177, 199].

En effet, le Rituximab est capable aussi d'induire la translocation de la sphingomyélinase acide (A-SMase) vers le feuillet externe de la membrane où il hydrolyse les sphingolipides membranaires en céramides et phosphocholines qui sont des inhibiteurs du cycle cellulaire. Il a été démontré aussi que le Rituximab est capable de réduire l'expression des protéines anti-apoptotiques Mc11, Bcl-2 et XIAP. De plus, il est capable d'inactiver une boucle autocrine d'inhibition de l'apoptose déclenchée par l'IL-10 (**Figure 9**) [161, 200].

Enfin, les différents mécanismes d'action du Rituximab dépendent de plusieurs paramètres comme la concentration de l'anticorps, du pontage antigénique (anticorps seul ou anticorps réticulé avec un anticorps secondaire) et de la cellule cible.

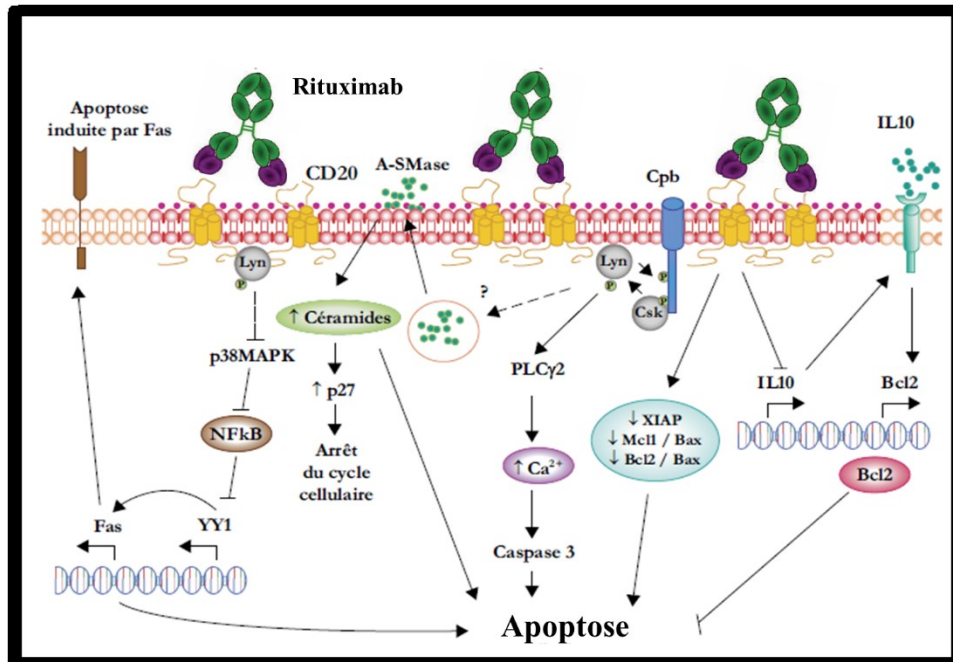


Figure 9. Les mécanismes de signalisation pro-apoptotiques induits par le Rituximab

La sensibilisation des cellules cibles par le Rituximab induit plusieurs voies de signalisation intracellulaires capables de déclencher l'apoptose. (Inspirée de *Cartron G. et al., 2004 [161]* avec autorisation du *Journal of the American Society of Hematology*).

1.5.2.1.1.4.1.1.2 Les fonctions liées au fragment Fc du Rituximab : le CDC et l'ADCC

La portion Fc du Rituximab est formée de la sous-classe IgG1 parce que cet isotype possède une demi-vie plus longue et des activités cytolytiques importantes. Cet anticorps a été sélectionné pour ses fonctions effectrices : sa capacité à fixer le complément (Cytotoxicité dépendante du complément, CDC) et d'induire une cytotoxicité de type Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

a-CDC

L'activation de la voie CDC est l'un des mécanismes de la lyse induite par le Rituximab suite à sa liaison au CD20. Le complexe Rituximab-CD20 est capable de déclencher la voie

classique et la voie alterne de l'activation du complément pour induire la cytotoxicité dépendante du complément (**Figure 10**). En effet, la voie classique découle de la capacité du fragment Fc du Rituximab à fixer la première protéine du complément, le C1q. Cette dernière est responsable de l'initiation de l'activation du complément par la voie classique. Le C1q, une fois fixée au Fc et activé, hydrolyse le C4 en C4b et le C2 en C2b formant ainsi le complexe C4b2b nommé aussi C3 convertase. Cette dernière hydrolyse C3 en C3b. Alors que la voie alterne est initiée par la fixation du complément C3b aux surfaces activatrices, cette protéine est le résultat de l'hydrolyse du C3. Ces deux voies conduisent à la génération des C3 convertases et des C5 convertases responsables de la formation du C3b et du C5b, conduisant à une étape amplificatrice du C3 et du C5 [161]. Les fragments C3a et C5a qui se détachent de cette réaction sont chimiotactiques pour les polynucléaires neutrophiles (PNN), de plus ils mènent à l'activation des cellules effectrices immunitaires augmentant ainsi la mort cellulaire. Une séquence de réaction se produit pour former le complexe d'attaque membranaire (MAC) (**Figure 9**). La régulation de la voie CDC est liée aux protéines inhibitrices du complément, en particulier le CD35 ou CR1 (*Complement Receptor type1*), le CD46 ou MCP (*Membrane Cofactor Protein*), le CD59 ou MIRL (*Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*) et le CD55 ou DAF (*Decay Accelerating Factor*) [201]. L'étude de l'expression de ces protéines inhibitrices du complément peut prédire l'efficacité de la voie CDC déclenchée par le Rituximab.

La sensibilité à la CDC induite par le Rituximab dépend de la cellule cible, du niveau d'expression du CD20, mais aussi de la répartition membranaire du CD20. Il a été démontré que la redistribution du CD20 au sein des radeaux lipidiques augmente la fixation du C1q à la portion Fc du Rituximab et cette fixation nécessite deux molécules du Rituximab suffisamment proches [161].

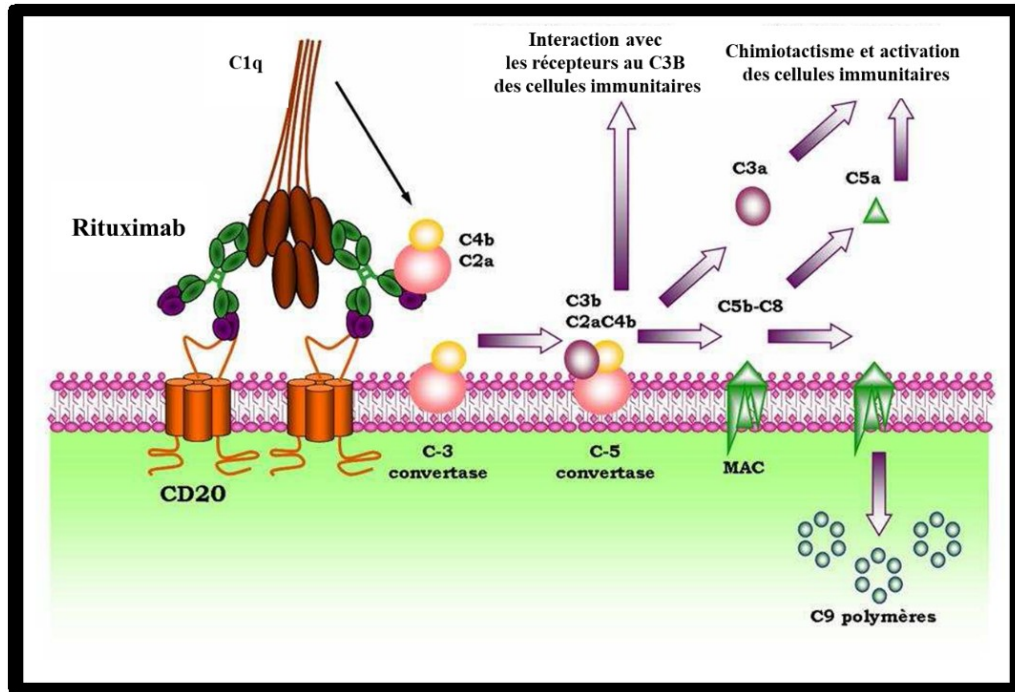


Figure 10. Les différentes voies d'activation du complément induites suite à la liaison du Rituximab au CD20

La translocation du Rituximab/CD20 vers les radeaux lipidiques induit l'activation des voies classique et alterne du complément. (Modifiée de Cartron G. et al., 2004 [161] avec autorisation du *Journal of the American Society of Hematology*).

b-ADCC

L'ADCC est un mécanisme impliquant la liaison du fragment Fc du Rituximab au récepteur Fc γ exprimé par les cellules effectrices dont les cellules NK, les monocytes, les macrophages et les PNN. La liaison CD20/Rituximab/Fc γ R provoque l'activation de ces cellules effectrices, ce qui entraîne la lyse des cellules B soit par phagocytose, soit par la libération des granules cytotoxiques [202, 203].

En effet, l'implication de ces cellules effectrices dans la réponse au Rituximab a été étudié chez les souris déficientes en chaîne γ associée aux Fc γ R où ces souris sont incapables de répondre au traitement [204]. Il existe trois types de récepteurs Fc γ R, les Fc γ RI de forte affinité ou CD64, les Fc γ RII inhibiteurs ou CD32 et les Fc γ RIII de faible affinité ou CD16. En effet, il existe un polymorphisme au sein des récepteurs Fc γ R pouvant expliquer la variabilité

de la déplétion lymphocytaire B dans les lymphomes et les maladies auto-immunes suite à un traitement avec le Rituximab [205].

Les cellules NK et les macrophages ainsi que leur récepteur de surface, les FcγRIIIa, ont montré un rôle important dans la lyse cellulaire B suite au traitement avec le Rituximab. En effet, un dimorphisme phénylalanine (F) ou valine (V) en position 158 du récepteur FcγRIIIa peut affecter l'affinité de ce récepteur au fragment Fc d'IgG1 et donc sa capacité d'activer les cellules effectrices. Plusieurs études ont démontré qu'il existe un lien entre le dimorphisme de ce récepteur et la réponse au Rituximab parce qu'il semble que l'allotype 158 (V) possède une affinité plus importante au Fc d'IgG1 humaine que l'allotype (F). Leurs résultats montrent que le Rituximab déclenche une déplétion lymphocytaire B dix fois plus importante en présence des cellules NK exprimant le FcγRIIIa de forte affinité (V) que les cellules NK exprimant le FcγRIIIa de faible affinité (F) [204, 206]. Donc, la dose du Rituximab nécessaire pour induire une bonne réponse doit être dix fois supérieure chez les patients portant l'allèle de faible affinité (F). Cette relation génotype/phénotype montre fortement l'implication de ces cellules effectrices exprimant le FcγRIIIa à leur surface dans l'effet cytotoxique thérapeutique du Rituximab [203].

1.5.2.1.1.4.1.2 Le Rituximab en pratique clinique

En 1994, le Rituximab a été introduit dans la pratique clinique et en 2001, il a montré son efficacité dans le traitement de 300 000 patients ayant des hémopathies B. Présentement, il est utilisé avec succès pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens de type folliculaire, des lymphomes à grandes cellules, des lymphomes du manteau, des leucémies à tricholeucocytes, de certaines formes de leucémies lymphoïdes chroniques et autres [207]. Le rituximab est de plus en plus fréquemment utilisé dans les maladies auto-immunes médiées par des anticorps en permettant de rétablir la tolérance lymphocytaire B.

L'efficacité du Rituximab a été rapportée dans différentes maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaques, la neutropénie auto-immune, la purpura thrombotique idiopathique et autres [208]. Une fois que le Rituximab est administré chez les patients, une éradication maximale des cellules B auto-

réactives est observée et donc une diminution de la production des auto-anticorps, ce qui prévient l'amplification de la maladie [189, 209]. Mais une réapparition des cellules B dans le sang est détectée après un mois et jusqu'à trois ans, dépendamment de la réponse des patients au traitement et de la maladie. Il a été démontré aussi que le Rituximab est capable de purger les organes lymphoïdes secondaires de leur cellules B mais aussi les organes lésés par l'auto-immunité, comme dans la synoviale des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde (PR) [210-212].

En effet, Edwards et Cambridge ont montré, en 2001, l'efficacité du Rituximab dans le traitement des cinq premiers patients atteints du PR et ceci est due à la modification de la coopération cellules B-cellules T [213]. Après une année de traitement, la plupart des patients ont montré une réapparition des symptômes de la maladie due à la repopulation lymphocytaire B. Mais un nouveau cycle de traitement avec le Rituximab a montré un succès chez la majorité des patients. En 2008, cet anticorps a eu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des patients atteints de la PR.

De plus, le Rituximab a montré aussi son efficacité dans le traitement des patients atteints de la sclérose en plaques (SEP), mais il est encore en phase II des études cliniques. Ces études ont constaté que deux perfusions du Rituximab chez ces patients sont nécessaires pour réduire le nombre des lésions inflammatoires cérébrales [214]. Cet anticorps n'a pas montré des effets secondaires graves chez ces patients [215].

En effet, la concentration et l'activité du Rituximab est variable d'un patient à l'autre. Cet anticorps thérapeutique est injecté en perfusion intraveineuse une fois par semaine pendant quatre semaines et la posologie recommandée est de de 375 mg/m² de surface corporelle pour le traitement des patients souffrant d'un lymphome folliculaire non-hodgkinien. La demi-vie du Rituximab est estimée à 3 jours après la première perfusion et à 8 jours suite à la quatrième perfusion [216]. Alors que, chez les patients atteints de la polyarthrite rhumatoïdes, deux injections de Rituximab de 1 g/m² de surface corporelle à 14 jours d'intervalle étaient recommandées et la demi-vie est estimée à 20 jours [217]. Et chez les patients atteints de SEP, deux injections de 1000 mg du Rituximab à 15 jours d'écart a montré une réduction de l'aggravation des lésions cérébrales et de la fréquence des poussées de cette maladie [214].

L'efficacité du Rituximab dépend de la quantité administrée et de l'intervalle entre deux perfusions. La déplétion lymphocytaire B induite par cet anticorps dure de 6 à 9 mois chez la plupart des patients après l'arrêt des perfusions [207].

Des effets secondaires peuvent survenir chez certains patients comme les réactions allergiques dues à l'activation élevée du système du complément comme la fièvre, hypotension, malaise et autres, et des prescriptions de corticoïdes et anti-histaminiques seront nécessaire avant l'administration du Rituximab. De plus, des réactions cytokiniques dues à la libération massive des cytokines peuvent apparaître chez les patients atteints d'hémopathies B [218]. Malgré la résistance des plasmocytes dépourvue du CD20 à la réaction induite par le Rituximab, une rare hypogammaglobulinémie est observée chez certains patients comme dans les myélomes et la PR [219]. Le taux sérique de BAFF, qui se trouve anormalement élevé chez les patients atteints du PR et du lupus érythémateux disséminé (LED), s'est vu augmenté suite à l'injection du Rituximab. Cette molécule peut être une forme résistante à la lyse cellulaire induite par cet anticorps [220, 221]. De plus, des infections virales, de la neutropénie, de la myocardite ont été observées chez certains patients suite au traitement.

1.5.2.2 La communication fonctionnelle entre le CD40 et le CD20

Tel que décrit plus haut, le CD40 se trouve physiquement associé avec le CD20 à la surface des cellules B [150]. D'autres études ont suggéré l'existence d'une communication fonctionnelle entre ces deux molécules.

Anolik *et al.* ont montré que la liaison du CD40 exprimée à la surface des lymphocytes B normaux avec le CD154 des fibroblastes déclenche une diminution de l'expression du CD20 après 15 min de stimulation [222]. Ils ont constaté que, suite à la stimulation du CD40, le CD40 et le CD20 sont colocalisés vers les radeaux lipidiques et sont ensuite internalisés ensemble dans des vésicules cytoplasmiques. L'internalisation du CD20 provoque une diminution de l'expression du CD20 de la surface des cellules B, induite par la stimulation du CD40. Cette diminution de l'expression amplifie le flux calcique intracellulaire induisant ainsi l'activation,

la prolifération et la différenciation des cellules B [222]. Donc, le CD40 peut réguler l'activité du CD20.

L'engagement du CD20 favorise un flux calcique intracellulaire nécessaire à la transition des cellules B de la phase G0 à la phase G1 [162]. De plus, l'activation du CD40 induit la progression du cycle cellulaire des cellules B de la phase G1 vers la phase S [223]. En effet, Smiers *et al.* ont pu montrer que la stimulation du CD20 ou du CD40, exprimés à la surface des cellules B malignes provenant de patients atteints de leucémie lymphoblastique aigüe, induit une prolifération cellulaire B mais cette réponse est plus importante lors d'une stimulation simultanée de ces deux molécules [223]. Ils ont montré aussi que la prolifération induite par le CD20 et le CD40 est indépendante des molécules co-stimulatrices comme l'IL-3, l'IL-4 ou l'IL-7, et que la présence d'autres facteurs de croissance n'a pas d'effet synergique sur cette réponse [223].

D'autres groupes ont étudié l'effet du Rituximab sur les réponses induites par le CD40. Ils ont montré que le traitement des patients atteints du LED avec le Rituximab affecte les signaux médiés par la voie CD154/CD40 et ainsi les réponses cellulaires B induites par cette voie. Une modification du répertoire cellulaire B a été observée suite à ce traitement. Une étude réalisée par Tokunaga M. *et al.* a montré une amélioration rapide des manifestations cliniques comme les troubles sensoriels, les crises hémolytiques, le fonctionnement cardiaque et autres, suite au traitement des patients atteints de LED avec le Rituximab. Cette manifestation clinique a duré 6-7 mois après le traitement. Une réapparition des cellules B est observée après 7 mois de traitement [224]. L'analyse phénotypique de cette nouvelle population des cellules B a montré une diminution du niveau d'expression des molécules co-stimulatrices, CD40 et CD80. Cette diminution peut affecter l'activation des cellules T et donc une perturbation du taux d'IgG a été observée [224]. Le Rituximab induit donc non seulement une réduction de la quantité des cellules B mais aussi une réduction de la qualité et de l'activité de ces cellules. De même, d'autres études, réalisées chez des patients atteints un lymphome non-hodgkinien, ont pu observer une repopulation lymphocytaire B après 6 mois suivant leur traitement avec le Rituximab. Cette repopulation, provenant de l'activation des cellules B naïves, se caractérise aussi par une faible capacité d'expression du CD40 et du CD80 conduisant ainsi à une hypogammaglobulinémie [225].

D'autre part, une étude effectuée par Jak *et al.* (2011) a montré que les cellules B provenant des patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) sont résistantes à certains médicaments cytotoxiques, mais une stimulation *in vitro* via le CD40 sensibilise ces cellules à la mort cellulaire, sauf en présence du Rituximab. Ils ont montré aussi que cette mort cellulaire présente une cinétique rapide (quelques heures) et dépend du niveau de calcium extracellulaire et de la production du ROS, cependant elle est indépendante des caspases et de la p53 [226].

En conclusion, la communication fonctionnelle entre le CD40 et le CD20 pourra moduler plusieurs réponses induites par ces deux molécules, et peut être due à l'association physique qui existe entre ces deux molécules.

1.6 Implication pathologique du complexe CD154/CD40

Comme le couple CD154/CD40 est impliqué d'une façon importante dans les deux types de réponses immunitaires humorale et cellulaire, il en fait de ce complexe un régulateur immunitaire de choix. Une dérégulation des mécanismes induits par ce complexe peut mener à des réponses dévastatrices conduisant ainsi à un développement ou une progression des maladies auto-immunes, inflammatoires et même du cancer.

1.6.1 Rôle dans les maladies inflammatoires

Comme le couple CD154/CD40 joue un rôle crucial dans plusieurs mécanismes et réponses immunitaires, il n'est pas surprenant qu'il soit impliqué dans le développement et la progression d'une série de pathologies vasculaires et autres. L'intervention de ce couple dans l'inflammation a été démontré par un accroissement de l'expression des molécules d'adhésion. Une fois que le CD40 est activé, à la surface des cellules endothéliales, et lié au CD154 des cellules T, une extravasation des cellules immunitaires à travers les parois des vaisseaux vers le

site inflammatoire et une induction ou augmentation de la sécrétion des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires a été observé. Le rôle du complexe CD154/CD40 dans l'inflammation a été soulignée chez les souris CD154 *knock-out*, où la réponse inflammatoire à un stimulus antigénique est presque abolie [227].

1.6.1.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie artérielle chronique caractérisée par l'accumulation des dépôts graisseux et d'autres substances au niveau de la tunique interne des artères. Ces dépôts conduisent à l'apparition des plaques d'athérome dans l'intima. Durant la progression de cette maladie inflammatoire, il y aura une accumulation de plusieurs cellules du système vasculaire et cytokines inflammatoires au niveau de la lésion, mèneront ainsi à la détérioration de la MEC [228].

Le complexe CD154/CD40 occupe une fonction immunitaire et inflammatoire très importante au niveau de cette maladie. Ces deux molécules sont des acteurs clés dans la formation et la stabilité de la plaque d'athérome, puisqu'elles peuvent influencer des évènements majeurs comme le recrutement des leucocytes et la production des cytokines pro-inflammatoires et des MMPs. Le CD40 et le CD154 se trouvent surexprimées à la surface des cellules impliquées dans l'initiation et la maturation des lésions athéroscléroses comme les leucocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes [17, 131, 229].

Des modèles murins ont souligné le rôle crucial du CD154 dans le développement de la plaque d'athérome : Match et al. ont démontré que l'administration d'un anticorps anti-CD154 sur les souris dyslipidémiques LDLR^{-/-} (*low density lipoprotein receptor*) a pour conséquence une réduction de la taille de la plaque d'athérome mais aussi une réduction de son contenu en lipides et une augmentation de son contenu en collagène [230]. Ces résultats ont été confirmés aussi par le groupe de Lutgens et al. qui a démontré que l'absence du CD154 chez les souris CD154^{-/-}/ApoE^{-/-} (Apolipoprotéine E) montre une surface de la plaque beaucoup moins importante que chez les souris ApoE^{-/-} [231].

D'autres études ont démontré que l'activation des cellules T via le CD154 et des cellules endothéliales via le CD40 induisent la sécrétion des cytokines inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-15 et le MCP-1 ainsi que l'expression des molécules d'adhésion comme VCAM, ICAM-1 et LFA-1, ceci conduit à la formation et au développement de la lésion qui est due au recrutement et au transmigration des leucocytes aux sites de lésions [129, 133, 229, 232-234]. De plus, il a été démontré que l'interaction du CD154 des cellules T infiltrées avec le CD40 des macrophages stimule la sécrétion des IL-1, IL-6 et IL-12 et des MMPs comme les MMP-1, les MMP-3 et les MMP-9 menant ainsi à la prolifération et à la migration des cellules musculaires lisses vers l'intima [229, 235]. L'activation des cellules musculaires lisses suite à la liaison aux cellules T, par le biais de l'interaction CD154/CD40, stimule la sécrétion des cytokines comme l'IL-8 et le MCP-1 [235, 236]. Cette interaction mène à l'amplification de la réaction inflammatoire et à la formation de la plaque athéromateuse. De plus, l'interaction du CD154 exprimé à la surface des leucocytes avec le CD40 exprimé par les fibroblastes aide à la libération des cytokines chimiotactiques comme l'IL-6 et l'IL-8 [237, 238]. En effet, l'accumulation des fibroblastes au niveau de l'intima contribue aussi aux réactions inflammatoires.

La rupture de la plaque constitue l'étape finale des phénomènes associés à l'athérosclérose. Cette étape contribue à l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire, aboutissant ainsi à la formation d'un thrombus. En effet, l'activation des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et de macrophages via le CD154 stimule la sécrétion des MMPs, comme MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 et MMP-13 et ces MMPs semblent être impliqués dans la rupture de la plaque athérosclérotique [229].

Plusieurs études ont montré que l'activation et l'agrégation plaquettaire sont dues principalement à la liaison du CD154 avec l' α IIb β 3 [72, 143]. André P. et al. ont démontré que les souris déficientes en CD154 présentent un défaut de thrombose due à une instabilité des agrégats plaquettaires, et que ce défaut est restauré suite à l'injection chez ces souris du sCD154 recombinant [72]. Ce groupe a montré que cette instabilité est due à l'interaction CD154 avec l'intégrine plaquettaire α IIb β 3 et non avec le CD40, ceci a été confirmé par le fait d'utiliser du sCD154 muté au niveau de la séquence KGD (Lysine/Glycine/Acide aspartique), incapable de lier l' α IIb β 3. L'injection de cette forme soluble muté chez les souris déficientes en CD154 ne

rectifie pas les défauts présentes chez ces souris. De plus, les souris qui sont déficientes en CD40 n'affectent pas l'induction de la thrombose [72].

1.6.2 Rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques

L'auto-immunité est définie par la rupture des mécanismes responsable de la tolérance et de l'induction d'une réponse immunitaire contre les composants du soi. On parle de la rupture des mécanismes impliqués dans la tolérance centrale, soit la sélection négative au niveau de la moelle osseuse et du thymus, ainsi que de la tolérance périphérique. Cette rupture se traduit par une sélection et un maintien des cellules B et T auto-réactives, d'où la production des auto-anticorps de forte affinité, des complexes immuns ou des cellules T cytotoxiques auto-réactives. Ceci peut mener à la symptomatologie clinique. Les facteurs déclencheurs de l'auto-immunité peuvent s'agir des facteurs génétiques comme une prédisposition génétique ou des facteurs environnementaux, probablement une infection [239]. Une réaction accrue du complexe CD154/CD40 peut mener à une réaction immunitaire exagérée et ainsi au développement de certaines complications auto-immunes.

Plusieurs mécanismes d'action induits par le complexe CD154/CD40 peuvent contribuer au développement des maladies auto-immunes dépendantes des cellules T :

Premièrement, au niveau du thymus, la sélection négative des cellules T auto-réactives est contrôlée par les cellules épithéliales médullaires exprimant le CD40. L'activation du CD40 suite à son interaction avec le CD154 pourrait contribuer à la production des clones de cellules T auto-réactives, en permettant à ces cellules de s'échapper des mécanismes de sélection négative (**Figure 11**). La production de ces clones peut être due à un défaut d'activation ou à une activation exagérée des signaux impliqués dans ce processus [239]. En effet, il a été démontré qu'une coopération entre le CD40 et RANK (*Receptor Activator for NF- κ B*), un récepteur activateur du NF- κ B, est nécessaire pour stimuler ce processus [240]. Une anomalie de ce signal peut mener à la production des clones auto-réactives.

Deuxièmement, l'auto-immunité induite par le complexe CD154/CD40 peut se produire aussi au niveau des organes lymphoïdes secondaires, où se déroule l'immunité adaptative (**Figure 11**) [239]. Une activation accrue du CD40 implique une augmentation de l'interaction du CD154 des cellules T avec le CD40 des cellules B ou autres CPAs, cette interaction exagérée induit une surproduction de cytokines et des auto-anticorps [241].

Enfin, au niveau des tissus cibles, une surexpression du CD40 sur des cellules cibles où le CD40 se trouve normalement faiblement exprimé ou même inexistant à la surface de certaines cellules, peut mener à une réponse auto-immune (**Figure 11**). Cette surexpression qui mène à une interaction exagérée pourrait aboutir à une production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines [239]. Ceci a pour effet de détruire le tissu ciblé et le recrutement des cellules inflammatoires.

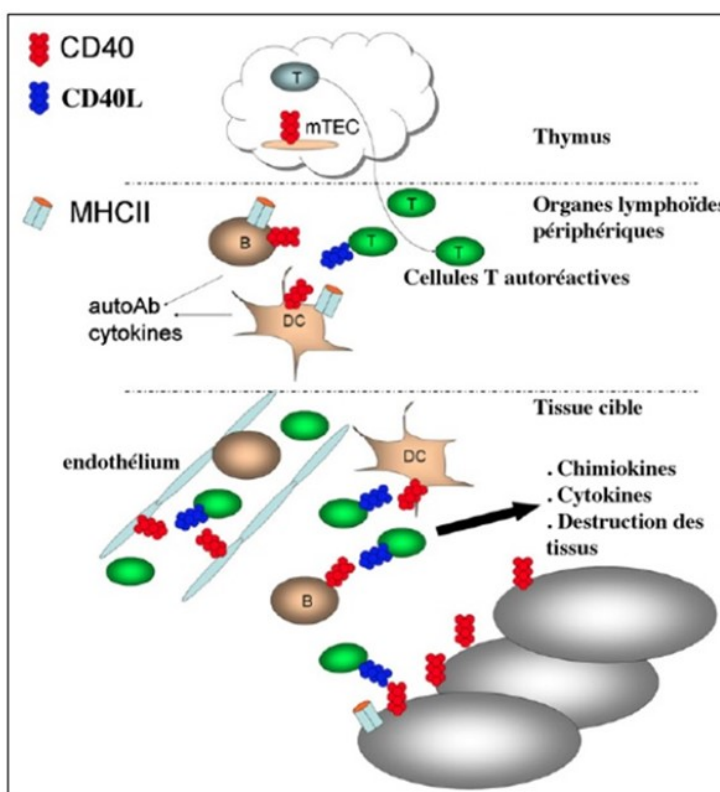


Figure 11. Les mécanismes induits par le complexe CD154/CD40 dans l'auto-immunité

L'interaction du CD154 avec le CD40 peut aboutir à l'induction de l'auto-immunité : 1- au niveau du thymus, au cours de la sélection négative des cellules T, ce qui permet à certaines

cellules T auto-réactives d'échapper à la sélection du thymus, 2- au niveau des organes lymphoïdes secondaires où les cellules T se lient aux cellules B ou autres CPA comme les DC, 3-au niveau des tissus cibles où la signalisation induite par le CD40 activé conduit à la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires, menant ainsi à la destruction des tissus ciblés et le recrutement de cellules inflammatoires. (Modifiée de *Peters, A.L. et al.*, 2009 [239] avec autorisation du journal *Seminars in Immunology*).

Vu leur expression à la surface des cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, le CD154 et le CD40 peuvent être impliqués dans différentes maladies auto-immunes. Dans cette partie, nous allons décrire les complications induites par le complexe CD154/CD40 dans plusieurs maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires de l'intestin.

1.6.2.1 Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune inflammatoire chronique caractérisée par une infiltration des cellules immunitaires au niveau des articulations menant à une augmentation de la production des cytokines, des chimiokines et des MMPs. Elle se manifeste par des synovites persistantes et des auto-anticorps dirigés contre le facteur rhumatoïde et des peptides citrullinés. Cette maladie entraîne une inflammation et une destruction des articulations [242].

Le CD154 et le CD40 semblent jouer un rôle crucial dans l'initiation et le développement de l'AR. Le CD154 se trouve surexprimé à la surface des cellules T circulantes et au niveau de la synovie chez les patients souffrant de l'AR. Cette expression aberrante du CD154 conduit à une augmentation de la production des immunoglobulines par les cellules B (hypergammaglobulinémie), et à une sécrétion plus élevée de l'IL-12 par les DC et les macrophages synoviaux [243-245]. De plus, le CD40 est surexprimé aussi sur les fibroblastes et les cellules synoviales par la présence de le TNF- α et l'IFN- γ [239]. La surexpression du CD40 induit une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-15, l'IL-17, le TNF et le MCP-1, ce qui amplifie les réactions inflammatoires liées à l'AR et conduit ainsi à la destruction des articulations [246, 247]. La liaison du CD154 des cellules T activées avec le CD40 des fibroblastes stimule la production du VEGF induisant ainsi la néo-vascularisation synoviale. De plus, cette interaction augmente l'expression des

molécules d'adhésion, comme l'E-selectine, ICAM-1 et VCAM-1, à la surface des fibroblastes à l'origine du recrutement des cellules immunitaires au niveau du site d'inflammation [239]. Il faut mentionner aussi que le taux sérique du sCD154 se trouve très élevé chez les patients d'AR.

Le rôle du dyade CD154/CD40 dans l'initiation de l'AR a été démontré dans un modèle murin lors de l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD154, avant l'initiation de l'arthrite induite par le collagène (modèle de l'arthrite expérimentale chez la souris, CIA, Collagen Induced Arthritis), dans lequel l'utilisation de cet anticorps prévient le développement de l'AR. Alors que l'injection de ce même traitement chez les souris ayant déjà développé l'AR n'a pas pu renverser les complications induites par le CIA [248, 249]. Ceci indique que le couple CD154/CD40 occupe une place cruciale dans les événements physiopathologique précoces de l'AR.

1.6.2.2 Le lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique qui touche plusieurs organes comme la peau, les articulations, les reins, les poumons et le système nerveux. Elle se caractérise par une hyperactivation des lymphocytes B à l'origine de la production des auto-anticorps dirigés contre l'ADN et autres composants nucléaires des cellules du tissu conjonctif [250].

Plusieurs études se sont intéressées à étudier le rôle du CD154 et CD40 dans la physiopathologie du LED. Koshy et al ont montré que le CD154 se trouve surexprimé à la surface des cellules T chez les patients lupiques et cette surexpression est corrélée à l'intensité de la maladie [251]. Or, d'autres groupes ont montré que cette surexpression du CD154 se trouve aussi à la surface des cellules B et des monocytes [252-254]. Le CD154 des cellules B des patients lupiques semble être fonctionnel parce que ces cellules sont capables de produire *in vitro* des anticorps selon un mécanisme dépendant du CD154. Le rôle des cellules B exprimant le CD154 dans le développement du LED a été démontré dans un modèle murin, des souris transgéniques pour les cellules B CD154+ ont pu développer avec l'âge une maladie lupus « like » caractérisée par une glomérulonéphrite et la production spontanée d'anti-ADN ce qui

suggère que la présence du CD154 ectopique à la surface des cellules B est suffisante pour induire le développement d'une maladie auto-immune [254].

Les patients atteints du LED présentent un taux sérique élevé du sCD154, ceci est corrélé avec l'intensité de la maladie [255, 256]. Le sCD154 se trouvent sous forme trimérique et fonctionnel. Aussi, *in vitro*, ils ont montré que le sCD154 est toujours capable d'induire l'expression des marqueurs d'activation, CD86 et CD95, à la surface des cellules B [256].

Plusieurs études ont utilisé un modèle expérimental du LED chez la souris (modèle NZBxNZW) issu d'un croisement de deux lignées appelées NZB (*New Zealand Black*) qui présente une prolifération anormale des cellules B ainsi qu'une augmentation de la production d'IgM, et NZW (*New Zealand White*) qui présente quelques dépôts glomérulaires d'immunoglobulines et une production tardive d'auto-anticorps de type anti-nucléaires. Ce modèle de souris a montré une insuffisance rénale et un taux élevé des anticorps anti-ADN. En effet, l'injection d'un anticorps anti-CD154 est capable d'améliorer et même prévenir les complications pathologiques liées au LED. L'administration de cet anticorps a prolongé la durée de vie des souris et a amélioré la fonction rénale [257-260].

1.6.2.3 Sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) caractérisée par une infiltration des cellules mononucléaires telles que les cellules T (CD4+, CD8+) et les cellules B, des cellules myéloïdes comme les DC, les monocytes et les macrophages ainsi que les cellules gliales au niveau du cerveau et de la moelle épinière induisant la destruction de la myéline des fibres nerveuses [261].

La physiopathologie de la SEP a été étudiée dans un modèle murin « Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale » (EAE). Suite à une immunisation des souris avec des composants de la myéline et une infiltration des cellules immunitaires au niveau du SNC [261]. Ces souris présentent au niveau de la moelle épinière des cellules exprimant fortement le CD40 lors de la phase aiguë et de la phase de rechute de la maladie SEP, alors que le CD154 se trouve

fortement exprimé que lors de la phase de rechute de la maladie [262]. En effet, les souris déficientes en CD154 sont protégées contre l'EAE. Ceci est dû à un défaut de maturation et d'activation des CPA [263]. De plus, l'administration d'un anti-CD154 chez la souris au début de la phase d'induction de l'EAE prévient le développement de la SEP [264]. Plusieurs études ont montré que le blocage de l'interaction du CD154 avec le CD40 peut prévenir la différenciation des cellules T vers une réponse immunitaires Th1, ceci peut induire ainsi une différenciation de ces cellules vers une réponse immunitaire non pathogénique Th2 au niveau du SNC [265-267].

Le CD40 se trouve exprimé aussi à la surface des cellules gliales, l'activation de cette molécule conduit à la sécrétion d'IL-12 et du TNF menant ainsi à l'apoptose cellulaire [268-270]. D'autres études ont observé que les souris ayant une délétion du CD40 spécifiquement au niveau des cellules gliales développe une EAE moins sévère comparée aux souris sauvages [269, 271].

1.6.2.4 Les maladies auto-immunes et inflammatoires de l'intestin

Deux principales maladies auto-immunes connues au niveau de l'intestin sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Ces deux maladies sont des affections chroniques qui se caractérisent par la présence d'une inflammation au niveau des voies gastro-intestinales, due à une infiltration d'un nombre important des cellules T et B, ainsi que des macrophages au niveau de l'épithélium intestinale [272]. Cette inflammation du tube digestif est liée à une réaction immunitaire excessive de l'organisme contre des bactéries ou des virus présents dans la flore intestinale. Elles se caractérisent principalement par des crises de douleurs abdominales et de diarrhée causant ainsi la fatigue et une perte de poids.

Les patients atteints de maladie de Crohn présentent une surexpression du CD154 à la surface des cellules T ainsi que des taux sériques élevées du sCD154. De plus, le CD40 se retrouve aussi surexprimé à la surface des cellules endothéliales micro-vasculaires de la muqueuse intestinale [273]. En effet, plusieurs modèles expérimentaux murins, obtenus par mutagenèse des gènes codant pour des composants du système immunitaire comme les souris déficientes pour la molécule de CMH de classe II, pour le TCR, pour l'IL-2 et autres, ont montré

l'importance du système CD154/CD40 dans l'inflammation intestinale. L'administration d'un anti-CD154, chez la souris qui présente les premiers symptômes de colites, est capable de prévenir le développement de la maladie et inhibe l'infiltration des cellules immunitaires au niveau de l'épithélium intestinal [274, 275]. Même après quatre semaines qui suit le déclenchement de la maladie, l'anti-CD154 est capable de réduire chez la souris les complications associées [275].

En 2005, un groupe a étudié le rôle d'un antagoniste spécifique du CD154, ch5D12, sur le traitement des patients atteints d'une maladie de Crohn. L'injection de cet inhibiteur bloque l'interaction CD154/CD40 et a montré des effets bénéfiques. En effet, 72% des patients ont montré une réponse positive au traitement et 22% sont entrés en rémission de cette maladie [276].

1.6.3 Le cancer

Le cancer, résultant d'une accumulation d'anomalies dans le matériel génétique, se caractérise par une prolifération cellulaire anormalement élevée au sein d'un tissu normal de l'organisme. Cette prolifération cellulaire incontrôlée est due à l'échappement de la cellule aux mécanismes de régulation, à l'insensibilisation aux signaux anti-prolifératifs, et à l'indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent normalement la multiplication cellulaire.

Le complexe CD154/CD40 a été considéré comme un outil de survie et de croissance cellulaire au niveau des cellules tumorales du lymphome non hodgkinien, du lymphome de Burkitt et de la leucémie lymphoïde chronique [277, 278]. Basé sur les hauts niveaux d'expression du CD154 et du CD40 à la surface de ces cellules tumorales, les premières études ont suggéré que ce complexe semble faciliter le développement et la progression du cancer. Il faut ajouter aussi que le niveau d'expression du CD154 sur certaines cellules tumorales est corrélé positivement avec l'activité tumorale de ces cellules [279]. En effet, le complexe CD154/CD40 induit l'expression des MMPs, spécifiquement les MMP-2 et -9 au niveau des cellules tumorales, qui sont capable de dégrader la MEC, ceci favorise la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation des métastases [280]. De plus, une étude a démontré que

l'interaction CD154/CD40 était capable d'induire une activité angiogénique par la production d'un facteur de croissance, VEGF, au niveau des cellules tumorales [281].

Alors que d'autres études ont associé un rôle direct du complexe CD154/CD40 dans la pathogenèse du cancer. Certaines cellules tumorales sont capables de maintenir leur survie et leur croissance cellulaire en ciblant l'expression et l'interaction de ces deux molécules. Une étude a démontré que les cellules T CD4⁺ provenant des patients atteints de la leucémie lymphoïde cherchent à éliminer leur expression en CD154 soit par un défaut de mobilisation membranaire après l'activation cellulaire, soit par un clivage enzymatique [282]. Ceci permet aux cellules tumorales de s'échapper des réactions anti-tumorales des cellules T cytotoxiques et des cellules NK. D'autres études ont montré la présence d'une forme soluble du CD40 (sCD40) à un niveau très élevé en circulation détecté chez les patients atteints de la leucémie myéloïde, ce qui réduit la réponse cellulaire induite suite à son interaction au CD154 membranaire ainsi que l'activité tumorale [283]. En effet, plusieurs études portées sur différents types de cancer comme le cancer des ovaires, des poumons et la leucémie, ont détecté une concentration très élevée du sCD154 sérique chez les patients atteints de ces types de cancer [284-287]. De plus, une diminution du niveau d'expression du CD154 membranaire a été observé chez ces patients, ce qui conduit à induire un signal de survie et de prolifération des cellules tumorales due à la diminution de l'intensité de la liaison CD154/CD40 [288].

Le complexe CD154/CD40 est capable d'induire des fonctions anti-tumorales contrôlant la croissance de la tumeur [287]. Les effets anti-tumoraux associés à ce complexe sont induites soit par des mécanismes directes, soit par des mécanismes indirectes. L'engagement du CD40 des cellules tumorales par le CD154 est capable d'induire, d'une façon directe, la mort de ces cellules en activant les cellules T cytotoxiques et les cellules NK [289]. Il a été démontré que les macrophages activés via le CD40, par sa liaison au CD154, induit la production d'IL-12 nécessaire pour l'activation des cellules NK mais aussi pour le développement des cellules Th1, qui sont d'importants inducteurs de l'immunité cellulaire [290]. Par ailleurs, la liaison du CD154 avec le CD40 des cellules tumorales est capable aussi de déclencher, d'une façon indirecte, un signal pro-apoptotique en augmentant l'expression des molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 et des protéines membranaires comme le TAP-1, le transporteur peptidique de l'antigène-1 [291-293]. Ceci permet la reconnaissance et l'interaction

aux cellules immunitaires antitumorales, favorisant ainsi la mort cellulaire. De plus, il a été démontré que la stimulation des cellules de la leucémie lymphoblastique B et du lymphome folliculaire par le CD154 augmente aussi l'expression du récepteur apoptotique, le FAS, et aussi des molécules d'adhésions co-stimulatrices comme le CD80 et CD86 [294].

D'autre part, une étude a montré que le sCD154 induit un signal de survie des cellules tumorales, contrairement au CD154 membranaire qui induit un signal de mort cellulaire suite à sa liaison au CD40 des cellules cancéreuses [141]. Sauf en présence des inhibiteurs des voies de signalisation de survie ou des protéines inhibitrices de synthèse, le sCD154 peut induire la mort des cellules tumorales [295].

1.6.4 Le sCD154 et les syndromes cardiovasculaires

Comme le couple CD154/CD40 est impliqué dans le développement de l'athérosclérose, plusieurs études cliniques ont étudié la relation entre le niveau circulant du sCD154 et l'incidence de plusieurs syndromes cardiovasculaires tels que les syndromes coronariens aigus comme l'infarctus du myocarde aigue et l'angine instable, et les syndromes coronariens stables comme l'angine stable et la maladie coronarienne stable.

Plusieurs études ont mesuré le niveau du sCD154 dans le plasma des patients atteints de ces syndromes et ils ont observé une augmentation significative du niveau plasmatique de cette molécule soluble. Cette augmentation peut être due à une activation accrue des cellules T et des plaquettes et non du degré de l'inflammation de la maladie, puisque la concentration élevée du sCD154 ne semble pas être dépendante des autres marqueurs inflammatoires comme l'IL-6, VCAM-1, ICAM-1 et la troponine [296, 297]. Ceci fait du sCD154 un facteur de risque des évènements cardiovasculaires plus important que les autres.

En 2003, Heeschen et al. ont étudié la corrélation entre le niveau du sCD154 dans le plasma et le risque de complications associées aux syndromes cardiovasculaires [298]. L'étude a été faite chez 1088 patients souffrants des syndromes coronariens aigus où ils ont pu montrer chez ces patients, qui présentent un niveau plasmatique du sCD154 plus élevé, un risque plus élevé de décès due à l'infarctus du myocarde aigu.

1.7 Le complexe CD154/CD40 et le traitement thérapeutique

Le complexe CD154/CD40 représente une cible très importante au niveau des maladies auto-immunes et inflammatoires [258, 299]. L'inhibition des réponses induites par ce complexe a été réalisée par des anticorps bloquant l'interaction du CD154 avec le CD40. La production de ces anticorps était basée sur la technique des hybridomes.

En 1992, Lederman et al. ont produit le premier anticorps antagoniste anti-CD154, nommé le hu5c8 [300]. En 1999, Kirk et al. ont réalisé la première étude de traitement chez l'homme qui consiste en l'injection de cet anticorps, qui a été nommé le Ruplizumab [301]. Cet anticorps était capable de bloquer l'association du CD40 avec le CD154 mais aussi de réduire le nombre des cellules T. Après cette étude d'autres anticorps monoclonaux humanisés anti-CD154 ont été développés et testés chez l'homme comme l'IDEC-131 ou le Toralizumab, le ABI793 et le BG9588 [302]. Ces anticorps bloquants ont été aussi capable d'inhiber l'interaction CD154/CD40. En revanche, même si leur effet est avéré, le blocage de la liaison CD154/CD40 ne semble pas expliquer tout l'effet observé. En effet, des études faites *in vitro* ont montrer que le blocage du CD154 avec le hu5c8 n'induit qu'une faible inhibition des signaux activés suite à la liaison lymphocytaire [303]. La déplétion des cellules T est dépendante des fonctions effectrices des anti-CD154 donc du fragment Fc de ces anticorps qui activent les protéines du complément mais aussi les cellules phagocytaires comme les macrophages et les cellules NK suite à sa liaison aux récepteurs Fc exprimés à la surface de ces cellules [304, 305].

Ces anticorps anti-CD154 ont présenté une certaine efficacité sur plusieurs maladies auto-immunes [302]. En phase préclinique, ils étaient capables d'induire une immunosuppression étendue pour prévenir le rejet de l'allogreffe [301]. Ces anticorps ont été utilisés aussi pour le traitement des patients atteints de LED. Ils ont remarqué une réduction des auto-anticorps, ainsi qu'une diminution de l'intensité de la maladie [306].

D'autre part, des essais cliniques ont été arrêtés en phase II, du fait que ces anticorps ont entraîné l'apparition des accidents vasculaires cérébraux ou d'infarctus du myocarde, d'où l'arrêt du développement de ces anticorps [307, 308]. Ces événements thrombo-emboliques ont

été expliqués par l'expression et l'activation du CD154 à la surface des plaquettes activées, conduisant ainsi à l'agrégation de ces dernières en présence d'un anti-CD154 monoclonal [309].

Pour éviter les effets secondaires du CD154, des anticorps dirigés contre le CD40 humain ont été développés. Les différents anti-CD40 générés se distinguent par leur fonction, agoniste ou antagoniste, ainsi que leur sites de liaison au CD40 [302]. Le Chir-12.12, un anti-CD40 antagoniste, est capable d'inhiber la prolifération du myélome induite par le CD40 et d'induire une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, mais cet anticorps n'a pas montré son efficacité dans la prévention des maladies auto-immunes [310]. Par contre d'autres anti-CD40 antagonistes, le HCD122 et le ch5D12, ont montré des résultats encourageants en phase I des essais cliniques. Le HCD122 est capable d'inhiber la survie de la leucémie lymphoïde chronique induite par le CD154, et le ch5D12 est appliqué contre la maladie de Crohn [276]. Le SGN-40 ou le Dacetuzumab, un anti-CD40 partiellement agoniste, s'est révélé efficace contre la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome non hodgkinien [311]. Cet anticorps, qui est dans la phase clinique I, était capable d'induire une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ainsi que l'apoptose. Il était aussi capable d'améliorer l'effet antitumoral du Rituximab (l'anti-CD20) au niveau des cellules de lymphome non hodgkinien [312]. D'autres anti-CD40 antagonistes comme le Tenelixumab et ASKP1240 semblent avoir un effet contre le rejet de greffe [313, 314]. Autre que les antagonistes, un anticorps agoniste a été produit, le CP-870,893. Ce dernier est capable de stimuler l'expression du CMH de classe II, du CD23, du CD54 et du CD86 activant ainsi la présentation antigénique [302]. Cet anticorps, en phase clinique I, a été utilisé pour le traitement anti-tumoral parce qu'il est capable d'induire la mort des cellules tumorales de lymphomes B de la prostate, du côlon et du sein. Mais comme le CP-870,893 est un anti-CD40 agoniste, il peut induire des effets secondaires par exemple l'augmentation du niveau de transaminases dans le sérum du foie [302].

En conclusion, l'effet bénéfique du blocage du système CD154/CD40 sur la réduction des symptômes des maladies auto-immunes ainsi que le potentiel de ce complexe antitumoral font du CD154/CD40 une bonne cible thérapeutique. Des études plus poussées sur les voies de signalisation et les réponses induites suite à l'interaction CD154/CD40 seront nécessaires pour bien cibler et augmenter l'efficacité du traitement.

1.8 L'hypothèse et les objectifs du travail

Le rôle central qu'occupe le couple CD154/CD40 dans la régulation de plusieurs réponses immunitaires en induisant des signaux bidirectionnels, le traitement de plusieurs maladies auto-immunes/inflammatoires ainsi que le grand potentiel qui se manifeste comme outil précieux dans l'immunothérapie font en sorte que ce couple est considéré comme un axe principal pour plusieurs travaux de recherche. Vu le rôle important que joue le couple CD154/CD40 et après la découverte de l'association physique entre le CD40 et le CD20 par notre équipe, vient l'objectif du présent travail qui s'intéresse à l'étude du rôle de l'association CD40-CD20 et l'effet de cette association sur la modulation des réponses immunitaires induites par le couple CD154/CD40. Les études montrent que l'utilisation du Rituximab, qui a prouvé une efficacité prometteuse dans le traitement de lymphomes et de plusieurs maladies auto-immunes, affecte les réponses cellulaires B induites par le couple CD154/CD40. Ceci est due à la diminution du niveau d'expression du CD40 à la surface des cellules B qui réapparaissent 6 à 7 mois après le traitement. De plus, une étude a montré que les cellules B des patients atteints du LLC seront sensibles à la mort cellulaire induite par le Rituximab sauf dans le cas qui suit une stimulation via le CD40. L'effet de l'association du CD40 avec le CD20 sur la mort cellulaire induite par le Rituximab n'est pas encore étudié.

D'autre part, jusqu'à présent, l'ensemble des études sur le couple CD154/CD40 s'est focalisée sur les signaux et les réponses cellulaires induites via le CD40. Très peu d'études se sont intéressées aux réponses induites via le ligand CD154 parmi elles l'étude du clivage du CD154 et la libération d'une forme soluble représente une réponse importante. En effet, une augmentation de la concentration plasmatique du sCD154 a été détectée chez les patients présentant différentes pathologies. Cette augmentation est corrélée à l'incidence de la maladie. De plus, nous avons récemment montré que le CD40 est le seul récepteur impliqué dans le clivage du CD154, exprimé à la surface des cellules T. Le rôle du CD40 et de son association au CD20 dans la régulation de cette réponse cellulaire n'est pas encore étudié.

En se basant sur ces nombreuses observations, nous avons émis comme hypothèse :

L'interaction du CD154 avec le CD40, son principal récepteur associé au CD20, induit des signaux bidirectionnels pouvant moduler les différentes réponses biologiques induites par cette interaction.

Pour répondre à cette hypothèse, nos objectifs sont :

I-Étudier le rôle de l'association du CD40 avec le CD20 dans la mort cellulaire.

- a) Évaluer l'implication du complexe CD40/CD20 dans la mort cellulaire induite via le CD20.
- b) Vérifier l'implication du domaine cytoplasmique du CD40 dans la mort cellulaire induite via le CD20 ainsi que dans l'association CD40/CD20.
- c) Démontrer le rôle du complexe CD40/CD20 dans la mort cellulaire induite via le CD40.
- d) Analyser l'effet de l'induction simultanée du CD40 et du CD20 sur la mort cellulaire.

II-Étudier le rôle de l'association CD40/CD20 dans le clivage du CD154.

- a) Démontrer l'impact des signaux provenant du CD40 dans le clivage du CD154.
- b) Étudier l'effet de l'association du CD40 avec le CD20 sur le clivage du CD154 induit par le CD40.

III-Étudier le rôle biologique de la forme résistante au clivage du CD154 :

- a) Générer une forme CD154 mutée résistante au clivage.
- b) Étudier le rôle biologique du CD154 résistant au clivage suite sa liaison au CD40 dans :
 - La mort cellulaire.
 - La prolifération cellulaire.
 - La production d'immunoglobulines.

**Chapitre 2. L'association physique du CD40 avec le
CD20 à la surface cellulaire amplifie la mort cellulaire
induite par le Rituximab.**

2.1. Mise en contexte

Notre laboratoire a démontré précédemment que le CD40 membranaire se trouve associé au CD20 à la surface cellulaire. Alors que d'autres études ont démontré l'existence d'un *crosstalk* entre ces deux molécules modulant différentes réponses cellulaires. D'ailleurs, une diminution de l'expression du CD20 est observée suite à la stimulation du CD40 par le CD154. Cette diminution est due à une co-internalisation du CD20 avec le CD40 dans des vésicules cytoplasmiques. Cependant, le CD20 ne possède pas un ligand connu, plusieurs anticorps capables de le lier ont été identifiés et ont montré le rôle important du CD20 dans la mort cellulaire même si cette molécule ne possède pas un motif de mort. Le Rituximab est un de ces anticorps qui a montré une efficacité importante dans le traitement de nombreux types de lymphomes et des maladies auto-immunes. Cet anticorps est capable d'induire une profonde déplétion des lymphocytes B qui va également interférer avec la coopération avec les cellules T et la sécrétion de cytokines. Il peut affecter aussi les signaux activés par la voie CD154/CD40 et donc les réponses cellulaires B induites par cette voie. De plus, il a été démontré que les cellules LLC seront sensibles à la mort cellulaire induite par le Rituximab que suite à une pré-stimulation via le CD40.

Étant donné le rôle du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire, il est donc important d'étudier l'impact de son association avec le CD20 dans la mort cellulaire.

2.2 Contribution des co-auteurs

Loubna Al-Zoobi : Planification et exécution des expériences de la mort cellulaire induite via le CD40 et/ou via le CD20 (Figures 1 à 9), de la co-immunoprécipitation pour étudier le rôle du domaine cytoplasmique du CD40 dans l'association CD40-CD20 (Figure 6). Rédaction et correction de l'article.

Suzanne Salti: Génération des cellules HEK-293 exprimant différents niveaux d'expression du CD20.

Anna Colvecchio: Confirmation des résultats de la mort des lignées cellulaires lymphomateuses, Ramos et BJAB, induite via le CD20 (Figure 1).

Malek Jundi: Confirmation des résultats reliées à la co-immunoprécipitation (Figure 6C).

Amal Nadiri: Correction de l'article.

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

Walid Mourad: Direction générale.

2.3 Résumé

Le CD20 est une cible thérapeutique importante étant donné le succès de son anticorps monoclonal, le Rituximab, dans le traitement des tumeurs malignes et des maladies auto-immunes où les cellules B sont impliquées. Le traitement par le Rituximab provoque une déplétion rapide des cellules B et une diminution des symptômes de la maladie. Malgré l'efficacité clinique du Rituximab, son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé. Dans cette étude, nous avons décortiqué la mort cellulaire induite par le Rituximab et les facteurs affectant cette réponse. Nos résultats montrent que la mort cellulaire induite par le Rituximab dépend de la nature des cellules et du niveau d'expression du CD20 à la surface cellulaire. La co-expression du CD20 avec le CD40, un membre de la famille des récepteurs du TNF connu pour son association physique avec le CD20 à la surface cellulaire, amplifie la réponse apoptotique induite par le Rituximab. De plus, l'inhibition de la formation d'homodimère du CD40, un processus nécessaire pour l'induction de certains signaux intracellulaires, augmente encore plus la mort cellulaire induite par le Rituximab. La mort cellulaire induite par un anti-CD40 est également augmentée par la présence du CD20, suggérant ainsi une influence bidirectionnelle de l'association CD20/CD40. De plus, la stimulation simultanée des cellules avec les deux anticorps, anti-CD20 et anti-CD40, amplifie plus la réponse de la mort cellulaire que celle induite avec un seul de ces anticorps. Ces résultats soulignent le rôle de l'association CD20/CD40 dans la déplétion des cellules B et pourraient mener vers une nouvelle stratégie thérapeutique plus efficace dans le traitement des maladies où les cellules B sont impliquées.

Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on cell surface

Loubna Al-Zoobi*, Suzanne Salti*, Anna Colavecchio*, Malek Jundi*, Amal Nadiri*, Ghada S. Hassan*, Hani El-Gabalawy†, Walid Mourad*‡

International Immunology, 2014 May, Vol. 16, No. 8, pp. 451-465, doi: 10.1093/dxu046

* Laboratoire d'immunologie cellulaire et moléculaire, Centre de Recherche-Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), Montréal, Quebec, Canada;† University of Manitoba Arthritis Centre, RR149-800 Sherbrooke Street, Winnipeg, Manitoba R3A 1M4, Canada

‡ **Correspondence:** Walid Mourad, Ph.D.; Mailing Address: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Rm 482, Viger Tower, 900 St-Denis Street, Montreal, QC, Canada, H2X 0A9. Tel.: 514-890-8000 Ext.: 35287; Fax: 514-412-7314; E-mail: mw.mourad@umontreal.ca.

Running title: The association CD20/CD40 and cell death

Keywords: CD20, Rituximab, CD40, association, cell death

Abbreviations

ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; BCR, B cell receptor; CDC, complement-dependent cytotoxicity; FGFR, fibroblast growth factor receptor; HEK, Human embryonic kidney; MHC, major histocompatibility; mAb, monoclonal antibody; NF-κB, nuclear factor kappa B; PMA, phorbol myristate acetate; RA, rheumatoid arthritis.

Abstract

CD20 is an attractive therapeutic target given the success of its monoclonal antibody, Rituximab, in the treatment of B cell malignancies and B cell-mediated autoimmune diseases. Treatment with Rituximab causes a rapid depletion of B cells and decrease in disease symptoms. Despite the clinical efficiency of Rituximab, its mechanism of action is not completely understood. In this study, we aimed at further investigating the Rituximab-induced cell death and the factors affecting such response. Our results indicate that Rituximab-induced cell death depends on the nature of the cells and levels of CD20 expression on the cell surface. Coexpression of CD20 with CD40, a member of the TNF receptor family that is known to be physically associated with CD20 on the cell surface, enhances the apoptotic response induced by Rituximab. Inhibiting the formation of CD40 disulfide-bound-homodimers, a process required for some CD40 signaling, further enhances Rituximab-induced cell death. Cell death induced by anti-CD40 mAb is also upregulated by the presence of CD20, suggesting a bidirectional influence of the CD20/CD40 association. Moreover, treating cells with both anti-CD20 and anti-CD40 antibodies improves the cell death response induced by a single agent treatment. These results highlight the role of the CD20/CD40 association in triggering B cell depletion and may pave the way for an alternative more efficient therapeutic strategy in treating B cell-mediated disorders.

Introduction

CD20 is a non-glycosylated, tetraspanning B cell membrane protein with a molecular weight of 33-37 KDa that is expressed from the pre-B to mature B cell stage but is lost in plasma cells (1,2). Our understanding of CD20 signaling events comes from the use of specific monoclonal antibodies (mAbs). Upon its engagement with a specific mAb, CD20 translocates into the lipid raft fraction where it initiates a number of signaling pathways, including src-tyrosine kinases (Lyn, Fyn, Lck) (3). CD20 was shown to associate with the B cell receptor (BCR) and trigger calcium flux in B cells by activating signaling pathways similarly activated by the latter (4,5). Furthermore, the activation of CD20 leads to phospholipase C- γ phosphorylation and MAPK pathway activation (6). This gives rise to the cleavage of phosphatidyl-inositol triphosphate, which generates inositol-triphosphate and diacylglycerol resulting in the activation of protein kinase C (3,7-10).

The most important observation that has been made with respect to CD20 function when it was reported that treatment with anti-CD20 mAb triggers a rapid B cell depletion (11-13). Since the approval of Rituximab by the FDA to treat refractory or relapsed indolent B cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL), its usage has revolutionized the treatment of B-cell malignancies (14). Recently, Rituximab has been used in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) patients where a significant decrease in arthritic symptoms was observed (15,16). While Rituximab can induce death in pre-B cells to pre-plasma cells, the germinal center is resistant to the cytotoxicity of Rituximab, mainly due to local protective mechanisms (17). The efficiency of Rituximab is in part due to its chimeric structure, where the CD20-binding Fab fragment is murine, and the Fc portion is human (18). Rituximab can deplete B cells in three ways: (1) antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), (2) complement-dependent cytotoxicity (CDC), and (3) induction of cell death (19). Although the first two pathways involved in B cell depletion are now well established, the direct cell death is not yet completely understood.

The Fc portion of Rituximab is responsible for the ADCC and the CDC pathways, stimulating effector cells via their Fc receptor, and activating the classic complement pathway via binding to C1q, respectively (20). The presence of the human Fc portion prolongs the half-life of Rituximab which seems to be important for its therapeutic potency (21). The Fc portion can also bind to C1q, activating the classic complement pathway and releasing anaphylatoxins

(C3a, C4a, and C5a) and opsonins such as C3b (11). As to the role of Rituximab in cell death, some caspase-independent pathways have been postulated, but the apoptotic pathway is thought to involve three main caspase-dependent mechanisms: the activation of src-tyrosine kinases (Lyn, Fyn and Lck) (22), the activation of Fas signaling (23), and the inhibition of major survival pathways such as p38 and ERK1/2 MAPKs, nuclear-factor-kappa B (NFkB), and AKT (24,25).

The ability of Rituximab to activate many signaling pathways leading to cell death and the lack of cell death domain in the cytoplasmic tail of CD20 strongly suggest the contribution of other surface molecules in the Rituximab-induced response. Upon its ligation with specific mAb, CD20 was shown to physically and functionally associate with the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), whereby an inhibition of the tyrosine kinase activity of the FGFR3 downregulated the Rituximab-mediated proliferation inhibition (26). Along the same line of evidence, we previously reported that CD20 is physically and functionally associated with CD40, a member of the tumor-necrosis-factor (TNF) receptor family (27), expressed in a large variety of cells including B cells, and is often used as a marker of all stages of B cell differentiation (28). In addition to its established role in cellular activation (28,29), CD40 was also shown to play a direct role in the induction of specific cell death that is caspase- and protein synthesis-independent (30). Thus, data demonstrating an association of CD40 and CD20 on the surface of B cells, and those identifying a direct function of CD40 in inducing specific cell death, could suggest a possible contribution of CD40 to the apoptotic response mediated by the Rituximab/CD20 complex.

In this study, we further investigate the mechanisms and the influence of CD20/CD40 association on the Rituximab-induced cell death response, as well as on CD40-mediated apoptotic events. While confirming the physical association between CD20 and CD40 on cell surface, our results show that such association enhances the cell death response mediated by either CD20 or CD40. Interestingly, our data demonstrate that inhibiting CD40 disulfide bound (db)-homodimer formation, further upregulates CD20-induced cell death. Moreover, treating cells with both anti-CD40 and anti-CD20 mAbs induced an additive cell death response. Our data delineate an important mechanism of the Rituximab/CD20-mediated cell death response while expanding our knowledge of B-cell depleting therapies and their efficiencies in treatment of B-cell-mediated diseases.

Materials and Methods

Reagents and Antibodies

Hybridomas producing mAbs directed against the intracellular domain of HLA-DR α chain (DA6-147: IgG1), the extracellular domain of HLA-DR (L243: IgG2a), CD20 (1F5: IgG2a), and CD40 (G28-5: IgG1) were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). The 8C12 control mAb (IgG2a) was produced in our laboratory. The mAbs secreted by these hybridomas were purified on Protein G/A Sepharose columns (Sigma–Aldrich, Oakville, ON, Canada). Rituximab, a chimeric anti-human CD20 mAb, was a generous gift of Dr. G. Hoffman. The hIgG used as a negative control, the Affinity-Pure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L), and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). The Alexa-488 goat conjugated anti-mouse IgG was from Invitrogen Life Technology (Burlington, ON, Canada). Propidium iodide (PI; Invitrogen) was used to quantify cell death by flow cytometry.

Cells

The Burkitt's lymphoma BJAB and Ramos cell lines (ATCC, Rockville, MD, USA) were maintained in RPMI supplemented with 5% of heat inactivated fetal bovine serum (FBS). HEK-293 cells (ATCC) transfected with various plasmids were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin/glutamine (PSG, Life Technologies, Gibson/BRL, Burlington, ON, Canada), and 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of neomycin (InvivoGen, Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, Canada) or 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of hygromycin B (Wisent, Montreal, QC, Canada). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient density centrifugation, and B cells were purified by negative selection with antibody-coated magnetic beads in a Robosep instrument (Stem Cell Technology).

Mutagenesis and Cell Transfections

PCR-directed mutagenesis was used to construct wild type (WT) CD40 (hCD40WT), CD20 (hCD20WT), and their mutants. The CD20 and CD40 mutants were PCR-amplified using oligonucleotide primers containing appropriately positioned point mutations as well as BCMGShCD20.Neo and pcDNA3.1hCD40.Hyg, respectively, as templates. The PCR products were inserted into their respective plasmids. DNA sequencing confirmed that all PCR products were free of undesired mutations. Transfections were performed by calcium phosphate precipitation. Prior to transfection, 1×10^6 HEK-293 cells were seeded in 10 cm culture plates and were incubated for 24 h. Stably infected cells were selected in the presence of hygromycin and/or neomycin. HEK-293 cells stably expressing human wild-type CD20 (hCD20WT) as well as cells expressing different levels of human CD20 (hCD20-C1, hCD20-C2, hCD20-C3, hCD20-C4) were generated. In addition, HEK-293 cells were double-transfected with human CD20 WT and CD40 WT (hCD20/CD40WT), with human CD20 WT and CD40 truncated mutant (hCD20/CD40 Δ), with human CD20 WT and CD40C238A mutant (hCD20/CD40C238A) or, used as controls, with human CD20 WT and pcDNA3.1 empty vector (hCD20/pcDNA3.1), or with CD40 WT and BCMGS empty vector (hCD40/BCMGS).

Flow cytometry analysis

HEK-293/hCD20WT cells expressing different levels of human wild-type CD20 (hCD20-C1, hCD20-C2, hCD20-C3, hCD20-C4) were harvested and were incubated with intracellular HLA-DR alpha chain mAb DA6-147 (1 μ g/100 μ l), anti-HLA-DR mAb L243 (1 μ g/100 μ l), or anti-CD20 mAb 1F5 (1 μ g/100 μ l) for 30 min on ice. BJAB and Ramos cells were treated with the same antibodies as well as anti-CD40, G28-5, (1 μ g/100 μ l) for 30 min on ice. Cells expressing human CD20WT/pcDNA3.1, CD40/BCMGS, CD20WT/CD40-WT, CD20WT/CD40 Δ or CD20WT/CD40-C238A were also treated with the same antibodies. The human B cells were incubated with anti-CD20 mAb 1F5 (IgG2a) (1 μ g/100 μ l) or anti-SEB 8C12 (IgG2a) as an isotype control, for 30 min on ice. The cells were washed twice with ice-cold PBS/2% FBS and were incubated with Alexa fluor-488-conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen) on ice for 30 min. They were then washed twice with ice-cold PBS/2% FBS, and viable cells were gated by

FACScan (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) using Cell Quest software for analysis (BD Biosciences).

Cell stimulation

Cells were incubated (5×10^6 cells/ml) with different concentrations of hIgG or Rituximab and plated (1×10^5 cells/100 μ l) in a 96-well bottom plates (Round bottom for B cells and B cell lines; Flat bottom for HEK-293 cells). When it is indicated, cross-linking was performed by adding goat anti-human, and in some experiments, Ramos cells were pretreated for 24h with 1 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA) followed by Rituximab or hIgG for additional 16h at 37°C. Cells were collected after overnight and treated with 1 μ g/ml of PI for 10 min on ice prior to being analyzed by flow cytometry (FACScan; B.D).

Combination of anti-CD20 with anti-CD40

HEK-293 cells expressing both CD20 and CD40 were used to study the effect of the combination anti-CD20, Rituximab with anti-CD40, G28-5. HEK-293/hCD20/CD40WT were plated (1×10^5 cells/100 μ l) in 96-well flat-bottom plates. Various concentrations of G28-5 (100 μ l/well; 0 μ g/ml, 0.125 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml) were used alone or combined with Rituximab (0.2 μ g/ml). DA6-147 (1 μ g/ml) alone or combined with Rituximab (0.2 μ g/ml) was used as a negative control. Inversely, various concentrations of Rituximab (0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml) were used alone or combined with G28-5 (0.25 μ g/ml), hIgG (0.8 μ g/ml) alone or combined with G28-5 (0.25 μ g/ml) was used as a negative control. After incubation for 16h at 37 °C, the cells were extracted and incubated with PI (1 μ g/ml) for 10 min on ice before acquisition by FACScan.

Blocking of Fc receptors and induction of cell death by Rituximab

BJAB and HEK-293/hCD20WT cells were harvested and pre-treated with 0 μ g/ml, 10 μ g/ml, or 25 μ g/ml of hIgG for 30 min at 37°C. The pre-treated cells were plated (1×10^5 cells/100 μ l) in 96-well U-bottom plates (for BJAB) or flat-bottom plates (for HEK-293) containing 100

μl /well of DMEM/ FBS(10%)/ PSG (1%), and the optimal concentration of Rituximab (100 μl /well; 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the HEK-293/hCD20WT cells and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the BJAB cells) was added. No Rituximab was included in the control wells. The plates were incubated for 16 h at 37°C. Cells were collected and were incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PI for 10 min on ice prior to being gated by FACScan.

Immunoprecipitation and Western Blotting

HEK-293 cells expressing hCD20/CD40WT, or hCD20/CD40- Δ (5×10^6 cells/ml) were lysed for 1 h on ice in 400 μl of lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% CHAPS) supplemented with protease inhibitors (Invitrogen). The lysates were sonicated three times for 3 s at 25% amplitude and were then centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4°C. Dynabeads (DynaMag-Spin, Invitrogen, Norway) were prepared according to the manufacturer's instructions. The lysates were centrifuged and 800 μl of the lysate supernatants were added to 200 μl of Dynabeads conjugated with 10 μg of antibody (DA6-147, hIgG, G28-5, or Rituximab). The mixtures were incubated for 16 h with rotation at 4°C. The bead-conjugated antibodies were then placed on a micro-column and a magnet was used to separate the beads from the supernatants. The supernatants were discarded, and the beads were rinsed five times with 200 μl of lysis buffer and were resuspended in 40 μl of lysis buffer. Preheated loading buffer (10 μl ; 50 mM Tris HCl, 50 mM DTT, 5% SDS, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol) was added, and the beads were incubated at 95°C for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels and were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF). The membranes were washed with 5% milk/TBS-T for 30 min at room temperature and were first incubated with GST-77 (rabbit anti-CD20, 1:20.000) overnight at 4°C and then with H120 (rabbit anti-CD40) for 16 h at 4°C. The membranes were incubated in a strong antibody stripping solution in accordance with the manufacturer's instructions between the two incubations (Re-blot Plus, Millipore, Billerica, MA, USA). After washing three times with TBS-0.1% Tween 20 for a total of 15 min, the membranes were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG1 antibody (GAR-HRP, 1:50.000) for 1 h at room temperature. The membranes were washed three times with TBS-0.1% Tween 20 for a total of 15 min and were then incubated with an HRP substrate (Western Lightning Plus ECL,

PerkinElmer, Waltham, MA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions to reveal the protein bands.

Results

Rituximab-induced cell death via CD20 is cell line-dependent

While Rituximab was capable of inducing cell death in some B cell lines such as the Burkitt lymphoma cell lines, Raji and BJAB cells (26,31), in others such as Ramos Burkitt lymphoma cells results were inconsistent. Thus, in the first set of experiments we aimed at evaluating the susceptibility of different B cells lines, and resting B cells, to Rituximab-induced cell death. Cells were incubated with different concentrations of Rituximab overnight and cell death was evaluated. Although Rituximab did not induce any detectable response in Ramos cells (Fig 1A), it was capable of inducing significant cell death in BJAB, resting B cells and other B cell lines (Raji and LG2, data not shown) in a dose-dependent manner. Cell death in BJAB was induced at 1 $\mu\text{g/ml}$ of Rituximab and reached 40% in the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$. In resting human B cells, our results demonstrated that 22 % of cell death was observed after Rituximab treatment. The failure of Rituximab to induce such response in Ramos cells can be either due to the levels of CD20 on cell surface, the maturation status of the cell, or both. To verify the first hypothesis, we analyzed the expression of CD20 by flow cytometry. Ramos cells expressed less CD20 than BJAB on their surface but higher than resting B cells (Fig.1B), suggesting that Ramos exhibit a resistance to Rituximab-induced cell death in spite of its surface levels of CD20. As to the maturation status of cells described above, Ramos B cells are immature cells, while BJAB and human B cells are mature ones. Thus, our data demonstrating a cell-depleting role of Rituximab in the latter two cell types, and its absence in Ramos cells, suggest that the maturation stage of B cells might influence their Rituximab-induced cell death response.

PMA-priming or cross-linking with a secondary antibody sensitizes Ramos cells to Rituximab-induced cell death

Ramos B cells have been previously shown to exhibit a decreased sensitivity to cell death mediated by Rituximab treatment (32,33). Given the inability of Rituximab to induce death in Ramos B cells in our system, we wanted to assess the possibility of boosting such response. In the first set of experiments, we aimed at investigating if the activation state of Ramos B cells could affect the cell death response induced by Rituximab/CD20 complex. For this purpose, Ramos cells were left untreated or treated with phorbol myristate acetate (PMA, 1ng/ml) for 24h, followed by Rituximab for an additional 16h. Our results show that treating Ramos B cells with PMA upregulated the expression of CD20 on the cell surface (Fig. 2A) and sensitize Ramos cells to Rituximab-induced cell death (death rate of 27% in PMA-activated cells) (Fig. 2B). In a second set of experiments, we wanted to assess the possibility of boosting the cell death response in Ramos cells by crosslinking Rituximab with a secondary antibody and clustering the molecule on cell surface. We pretreated Ramos cells with 10 µg/ml of Rituximab for 30 min followed by an overnight incubation with 10 µg/ml of a secondary antibody, a goat anti-human IgG human Ab, that cross-links Rituximab with its F(ab')₂ fraction. Our results show a 37% cell death response in Ramos cells treated with Rituximab in the presence of the secondary antibody (Fig. 2C). Thus, our data suggest that Ramos B cells which exhibit a decreased susceptibility to Rituximab-induced cell death, require a boosting step such as crosslinking with a secondary antibody or priming with PMA, for a proper cell death response.

Rituximab-induced cell death is dependent on the level of CD20 expression

To confirm that levels of CD20 on cell surface is a factor affecting the success rate of Rituximab in cell depletion, as an increased expression of the molecule allows an intense recruitment of the antibody onto the plasma membrane (19), several attempts were made to sort tonsil and peripheral blood resting B cells expressing various levels of CD20 but unfortunately failed. To overcome this problem, we transfected HEK-293 cells with human CD20 WT. In a first set of experiments, HEK-293/hCD20WT cells were incubated overnight with different concentrations of Rituximab (0.2, 0.4, 0.8, or 1.6 µg/ml), or with hIgG used as a negative control. Results

demonstrated a dose-dependent cell death response following stimulation with Rituximab (Fig. 3). The cell death induced in HEK-293/hCD20WT cells began at 0.2 $\mu\text{g/ml}$ of Rituximab and was increased to 46.9% in the presence of 1.6 $\mu\text{g/ml}$ of Rituximab. Next, HEK-293 cells ectopically stably expressing various levels of CD20 were sorted and named clone 1 (C1), C2, C3, and C4 (Fig. 4A). Upon stimulation of these cells with Rituximab, the cell death response was shown to be increased depending on the level of CD20 expression on cell surface (Fig. 4B). HEK-293/hCD20WT C1 failed to exhibit any cell death, while C3 and C4 showed a significant death response following Rituximab treatment (death rate of 47% and 61.2%, respectively). These data confirm that the level of expression of CD20 on cell surface ensures a successful cell death response upon Rituximab treatment.

Rituximab-induced cell death is Fc receptor independent

Thus, in our system, since HEK-293 and BJAB cells express Fc receptors, we wanted to determine whether Rituximab-induced cell death via CD20 was dependent on Fc receptor binding. BJAB and HEK-293/hCD20WT cells were pre-treated with different concentrations of hIgG to block the Fc receptors expressed on cell surface. Cells were then stimulated with optimal Rituximab concentrations (Fig. 5A and B). Blocking the Fc receptors did not alter the cell death response triggered in BJAB and HEK-293/hCD20WT cells. These results indicate that Rituximab-induced cell death via CD20 is independent of Fc receptors and could be mediated by the activation of apoptotic events. Comparable results were obtained when F(ab)₂ fragments of Rituximab were used (data not shown).

Physical association of CD20 with CD40 enhances Rituximab-induced cell death

We have previously reported that CD20 is physically and functionally associated with CD40 on human B cells (27). In addition, several groups including ours, have shown that the engagement of CD40 is capable of inducing apoptosis in B cell lines and malignant cells (30,34,35). Thus, in this study we investigated the influence of such an association on the cell death response induced by Rituximab. For this purpose, HEK-293 cells stably expressing CD20 (clone 3) were cotransfected with empty vector (HEK-293/hCD20/pcDNA3.1), CD40 wild type (HEK-

293/hCD20/CD40WT) or truncated CD40 lacking its cytoplasmic domain (HEK-293/hCD20/CD40Δ). Cells expressing comparable levels of CD20 and CD40 were sorted and used in the subsequent experiments (Fig. 6A). HEK-293/hCD20/pcDNA3.1 HEK-293/hCD20/CD40WT and HEK-293/hCD20/CD40Δ cells were stimulated with different concentrations of Rituximab. HEK-293/hCD20/CD40WT cells exhibited a more pronounced cell death response to 0.8 μg/ml Rituximab, as compared to cells expressing only CD20 (64% and 48.8%, respectively, Fig. 6B). Interestingly, HEK-293/hCD20/CD40Δ cells exhibited a 47.4% death rate in response to the highest concentration of Rituximab used (0.8 μg/ml), similarly to HEK-293/hCD20/pcDNA3.1 cells (48.8%) and 16.6% less than that of HEK-293/hCD20/CD40WT cells (Fig. 6B). These results confirm that CD20 is constitutively associated with CD40 and demonstrate that such association increases the efficiency of Rituximab/CD20-induced cell death. Indeed, the enhancing role of CD40 towards the cell death response induced by the Rituximab/CD20 complex involves the cytoplasmic domain of CD40.

Next, we aimed at confirming the association of CD20 with CD40 in these cotransfected cells and assessing the implication of the cytoplasmic domain of CD40 in the physical association of CD20 with CD40. The above described cells were lysed and immunoprecipitated with anti-CD40 mAb (G28-5), Rituximab, or isotype control Ab. Results show that even when the cytoplasmic domain of CD40 is absent, the anti-CD40 Ab is capable of co-precipitating CD40 with CD20 (Fig. 6C), suggesting that the association of CD20 with CD40 is independent of the cytoplasmic domain of the latter.

Inhibiting CD40 db-homodimer formation enhanced cell death induced by anti-CD20

We have reported that oligomerization of CD40 with trimeric CD40 ligand or crosslinked Abs leads to CD40 db-homodimer formation, an event that is required for some CD40-induced signaling (36). More recently, we have demonstrated that substituting Cysteine 238 of the cytoplasmic tail by alanine (A) abolished CD40 db-homodimer formation (37) and enhanced the apoptotic role of CD40 (30). Here, we wanted to determine the role of CD40 db-homodimers in cell death induced by Rituximab. For this purpose, HEK-293 cells coexpressing hCD20 and hCD40WT (HEK-293/hCD20/CD40WT) or hCD40 containing a mutation converting cysteine

238 to alanine (HEK-293/hCD20/CD40-C238A) were used. Similar level of expression of CD20 was exhibited in HEK-293/hCD20/pcDNA3.1, HEK-293/hCD20/CD40WT and HEK-293/hCD20/CD40-C238A, and similar level of CD40 was expressed by the latter two cell line groups (Fig. 7A). Upon stimulation with different concentrations of Rituximab, HEK-293/hCD20/CD40-C238A cells exhibited an increased cell death response at a rate of 65% as compared with 59% in cells expressing CD20 and CD40WT (Fig. 7B). These data indicate that inhibiting CD40 db-homodimer formation influences the enhancing role of CD40 toward CD20-induced cell death, just like it does for the cell death triggered by CD40 stimulation.

Association of CD20 with CD40 enhances cell death induced by CD40

Given our current data outlining the enhancing role of CD40 towards CD20-induced cell death, our next question was does the CD20/CD40 dyad affect cell death response induced by CD40 itself? For this purpose, we stimulated HEK-293/hCD20/CD40WT cells and cells expressing only CD40 (HEK-293/hCD40/BCMGS) as a control, with different concentrations of G28-5 (Fig. 8). G28-5-mediated cell death was significantly increased in HEK-293 cells expressing both CD20 and CD40 at a rate of 60.8% compared to 30.1% in HEK-293/hCD40 cells. These results suggest that the impact of the CD20/CD40 association might be bidirectional, influencing signaling via both molecules.

Combination of anti-CD40 and Rituximab leads to an additive cell death response

Given our data above indicating that CD20/CD40 association positively influences the cell death signal induced via CD20 or CD40, our next set of experiments aimed at evaluating apoptosis in response to ligating both CD20 and CD40 with their respective Abs. When HEK-293/hCD20/CD40WT or BJAB cells were treated with a combination of G28-5 (increasing concentrations) and Rituximab (0.2 µg/ml for HEK-293/hCD20/CD40WT and 1µg/ml for BJAB), cells exhibited increased cell death compared to cells stimulated with increasing concentrations of G28-5 alone (Fig. 9A). A similar additive effect was obtained when we treated cells above with different concentrations of Rituximab and 0.25 µg/ml of G28-5 (Fig. 9B). Thus, the treatment with a combination of Rituximab and G28-5 improved the cell death response

induced by a single agent treatment in HEK-293 cells expressing both CD20 and CD40 as well as in BJAB cells. These data suggest that the usage of a dual antibody treatment with anti-CD20 and anti-CD40 might increase the efficiency of the Rituximab treatment in depleting B cells.

Discussion

CD20, a B cell-specific marker has gained great interest in the field of therapeutic strategies in B cell malignancies and many B cell-mediated autoimmune diseases, owing to the fact that CD20 is the target of a clinically efficient chimeric mAb, Rituximab. In the present study, we investigated the mechanisms mediating cell death response induced by Rituximab and the role of CD20/CD40 association in such response. Our results show that the susceptibility of B cells to Rituximab-induced cell death is different among B cell lines. The death response mediated by Rituximab is dependent on the level of CD20 expression on the cell surface and independent on the Fc fragment. We also showed that CD20 associates with CD40 on the cell surface, a property that upregulates both CD20 and CD40-mediated cell death response upon stimulation with their respective antibodies. In addition, our data demonstrated an additive effect of both anti-CD20 and anti-CD40 antibodies in inducing cell death.

B cell lines [BJAB and Raji and LG2 (data not shown)], resting B cells and HEK-293 cells (ectopically expressing CD20) exhibited a significant death response upon their stimulation with Rituximab. However, the Ramos B cell line was shown to be insensitive to Rituximab-induced cell death. The resistance of this cell line to cell death was previously described by Vega et al., (33). The authors, using several B cell lines including Ramos, reported that while Rituximab or a Fas ligand agonist antibody failed to induce B cell death when used alone, they were capable of provoking apoptotic signals if used in combination. This finding and ours suggest that the Ramos B cell line might be more resistant to Rituximab-induced apoptosis and require an enhancement such as an extensive cross-link of the Rituximab. Indeed, our Ramos B cells exhibited a Rituximab-induced death response upon crosslinking Rituximab with a secondary antibody. However, we should be noting herein the discrepancy of our result with other studies which previously demonstrated that Rituximab by itself was capable of inducing apoptosis in Ramos B cells in the absence of clustering with a secondary antibody (38). The

disagreement between these previous results and more recent ones, including ours, could relate to different incubation conditions and/or culturing media that plays a key role in Ramos homotypic cell to cell adhesion. Another process increasing the sensitivity of Ramos B cells to Rituximab was the induction of cell activation and the subsequent upregulation of CD20 expression on the cell surface. Indeed, the elevated expression levels of CD20 on B cell surface is one of the reasons making this molecule a good target for cell-depleting antibody-based attack (19,39-41). Our data confirm this finding whereby our HEK-293 cells ectopically expressing an increased level of CD20 exhibited a higher susceptibility to Rituximab-induced cell death, compared to cells with less surface expression of CD20.

Rituximab can induce B cell depletion in three ways: (1) ADCC, (2) CDC and (3) induction of cell death (19). The ADCC and CDC modes of action of Rituximab are Fc-dependent mechanisms. Our results demonstrated the Rituximab-induced cell death was not mediated by the Fc fraction of the antibody, reflecting a direct effect on the cell itself leading to cell death or apoptosis. Indeed, many apoptotic signals have been associated with CD20 stimulation, including phosphorylation of protein tyrosine kinases, Lyn and Lck, upregulation of intracellular Ca^{2+} levels, inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, downregulation of the oncoprotein Bcl-xL, transcription repressor yin-yang-1, and activation of caspases such as caspase-3 (33,38,42,43). Even though beyond the scope of our study, which focuses on another aspect of the role of CD20 in cell death, namely its association with CD40, it would be interesting to identify in future studies, the intracellular modulators involved in the apoptotic effect of CD20/Rituximab toward B cells.

Interestingly, CD20 was shown to associate with some biologically active molecules on the surface of B cells. Upon its engagement with Rituximab (type I anti-CD20 mAbs), CD20 colocalized with the BCR and used similar intracellular mechanisms, in a process termed “hijacking” to induce a Ca^{2+} increase leading possibly to apoptosis (5). More recently, a physical and functional association of CD20 with FGFR3 was demonstrated in the Burkitt lymphoma cell line Raji and BJAB cells upon their treatment with the anti-CD20 antibody, Rituximab. Inhibiting the tyrosine kinase activity of the FGFR3 downregulated the Rituximab-mediated growth arrest (26). Another molecule shown to be associated with CD20, is the TNF receptor family member, CD40. Indeed, CD40 was demonstrated to induce its internalization as

well as that of CD20 into cytoplasmic vesicles in human B cells (44). Interestingly, we previously reported the association of CD20 with MHC class II and CD40 on the surface of human B cells (27). Such association was biologically active in terms of mediating B cell homotypic adhesion. Ligating CD20 with mAb R21 blocked the lymphocyte function antigen (LFA)-1-independent but not the -dependent homotypic adhesion of B cells induced via MHC class II or CD40, suggesting a functional crosstalk between the latter surface molecules and their associated CD20 (27). Other biological responses such as cell death could be mediated by the association of CD20 with CD40. Indeed, CD40 was shown to sensitize cells derived from chronic lymphoblastic leukemia patients to the cytotoxic effects of Rituximab (45). These results are concomitant with the previously reported role of CD40 in inducing apoptosis. Interestingly, CD40 was demonstrated to induce cell death via a lysosomal membrane permeabilization pathway triggering the release of cathepsin B in the cytosol (30). In the aim of investigating the role of the CD20/CD40 association in CD20-induced cell death, our current data first confirm the physical association between both molecules, and then demonstrate that cells transfected with both CD20 and CD40 exhibited an increased cell death in response to Rituximab as compared to cells transfected with only CD20. Thus, the association with CD40 may be an additional mechanism by which Rituximab/CD20 complex is inducing specific death in B cells. Interestingly, we also demonstrated that the presence of CD20 on the surface of cells upregulated the cell death response induced by CD40 itself upon its ligation with a specific Ab. These data further outline the efficiency of the CD20/CD40 association as a biologically active mechanism by itself, capable of influencing cellular responses and affecting biological outcomes.

The enhancing role of CD40 towards the CD20-mediated cell death is shown to be dependent upon the cytoplasmic domain of CD40, while the physical association itself did not involve the same domain. The involvement of the CD40 cytoplasmic domain in the functional crosstalk between CD40 and CD20 is in concordance with its well documented role in CD40-mediated signaling (28, 30). The CD40 db-homodimer formation mediated by the residue C238 is another factor affecting CD40-induced cell death and could be at play in the enhancing role of CD40 towards the apoptotic response induced by the Rituximab/CD20 complex. We have previously demonstrated that the formation of C238-mediated CD40 db-homodimers, a

consequence of its engagement with trimeric CD40 ligand or crosslinked Abs, is crucial for certain CD40-triggered responses such as PI3-K activation and the subsequent increased expression of CD86 on human B cells (36) and IL-8 production (37,46). On the other hand, our findings outlined that cells transfected with a CD40 mutant (cystein 238 converted to alanine) (37) incapable of forming disulfide-linked homodimers exhibited a more pronounced cell death upon stimulation with anti-CD40 mAb, compared with WT cells (30). In accordance with these data, we report herein that the inhibition of CD40 db-homodimer formation regulates the enhancing role of CD40 towards the Rituximab/CD20-induced cell death, and thus further underlining the anti-apoptotic influence of this CD40 db-homodimerization process.

Rituximab has been long proven to efficiently lead to B cell depletion particularly in lymphomas and autoimmune conditions such as RA (14,16,47). However, longer term efficiency was obtained when Rituximab treatment was combined with conventional chemotherapy or a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD) in the case of RA (48,49). As to CD40, its high expression on B cells, monocytes, and macrophages in synovial fluids of RA patients (28), in addition to its implication in apoptotic and anti-apoptotic events in lymphoma B cells (50,51), makes it an interesting target for the treatment of these diseases. Interestingly in our study, treating cells with both anti-CD20 (Rituximab) and anti-CD40 (G28-5) Abs leads to an additive cell death as compared to stimulation with a single Ab. Our results are in accordance with data reported by Lewis et al. in 2011 whereby simultaneously targeting CD40 with the humanized anti-CD40 mAb, Dacetuzumab, and CD20 with Rituximab significantly improves the *in vivo* activity of Rituximab (52). They suggested that these mAbs have distinct but complementary mechanisms of action against tumor cell. Thus, our data combined to the above findings, in addition to confirming the importance of CD20/CD40 association in B cell death, identify potentially new therapeutic strategies for a more efficient and longer lasting use of the Rituximab regime in the treatment of B cell-mediated diseases.

In summary, targeting CD20 in B cell-depleting therapies yielded successful outcomes. However, in spite of the clinical success of anti-CD20 regimens including mAbs such as Rituximab, a clear idea of their mechanisms of action remains to be elucidated. Our data characterized the Rituximab-induced cell death, more specifically in terms of the role of

CD20/CD40 association in such response and opened new doors to the development of an improved B cell-depletion strategy in terms of efficiency and duration.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Arthritis Network (CAN).

Acknowledgments

We would like to thank Dr. G. Hoffman for kindly providing us with the Rituximab.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest

References

- 1 Einfeld, D. A., Brown, J. P., Valentine, M. A., Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. 1988. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *Embo J* 7:711.
- 2 Stamenkovic, I. and Seed, B. 1988. Analysis of two cDNA clones encoding the B lymphocyte antigen CD20 (B1, Bp35), a type III integral membrane protein. *J Exp Med* 167:1975.
- 3 Deans, J. P., Robbins, S. M., Polyak, M. J., and Savage, J. A. 1998. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem* 273:344.
- 4 Petrie, R. J. and Deans, J. P. 2002. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol* 169:2886.
- 5 Walshe, C. A., Beers, S. A., French, R. R., Chan, C. H., Johnson, P. W., Packham, G. K., Glennie, M. J., and Cragg, M. S. 2008. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 283:16971.

- 6 Pedersen, I. M., Buhl, A. M., Klausen, P., Geisler, C. H., and Jurlander, J. 2002. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 99:1314.
- 7 Smith, M. R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22:7359.
- 8 Grafton, G. and Thwaite, L. 2001. Calcium channels in lymphocytes. *Immunology* 104:119.
- 9 Bourget, I., Breittmayer, J. P., Grenier-Brossette, N., and Cousin, J. L. 1993. CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells. *Eur J Immunol* 23:768.
- 10 Clark, E. A. and Shu, G. 1987. Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors. *J Immunol* 138:720.
- 11 Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., and Anderson, D. R. 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83:435.
- 12 Maloney, D. G., Liles, T. M., Czerwinski, D. K., Waldichuk, C., Rosenberg, J., Grillo-Lopez, A., and Levy, R. 1994. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 84:2457.
- 13 Anderson, D. R., Grillo-Lopez, A., Varns, C., Chambers, K. S., and Hanna, N. 1997. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans* 25:705.
- 14 McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., and Dallaire, B. K. 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16:2825.
- 15 Bryant, A. and Moore, J. 2006. Rituximab and its potential for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Clin Risk Manag* 2:207.

- 16 Edwards, J. C. and Cambridge, G. 2006. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 6:394.
- 17 Rezvani, A. R. and Maloney, D. G. 2011. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:203.
- 18 Grillo-Lopez, A. J. 2000. Rituximab: an insider's historical perspective. *Semin Oncol* 27:9.
- 19 Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S., and Taylor, R. P. 2007. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44:3823.
- 20 Alduaij, W. and Illidge, T. M. 2011. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood* 117:2993.
- 21 Inagaki, A., Ishida, T., Yano, H., Ishii, T., Kusumoto, S., Ito, A., Ri, M., Mori, F., Ding, J., Komatsu, H., Iida, S., and Ueda, R. 2009. Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int J Cancer* 125:212.
- 22 Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A., and Okada, M. 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 404:999.
- 23 Vega, M. I., Huerta-Yepez, S., Jazirehi, A. R., Garban, H., and Bonavida, B. 2005. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene* 24:8114.
- 24 Suzuki, E., Umezawa, K., and Bonavida, B. 2007. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 26:6184.
- 25 Bonavida, B. 2007. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene* 26:3629.
- 26 Kotani, N., Ishiura, Y., Yamashita, R., Ohnishi, T., and Honke, K. 2012. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells. *J Biol Chem* 287:37109.

- 27 Leveille, C., AL Daccak, R., and Mourad, W. 1999. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol* 29:65.
- 28 Hassan, G. S., Rana, M., Léveillé, C., Nadiri, A., Jundi, M., Polyak, M., El-Fakhry, Y., and Mourad, W. M. 2009. Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. *Curr Immunol Rev* 5:285.
- 29 Hassan, G. S., Merhi, Y., and Mourad, W. M. 2009. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol* 30:165.
- 30 Jundi, M., Nadiri, A., Al-Zoobi, L., Hassan, G. S., and Mourad, W. 2011. CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment. *Immunobiology* 3:375.
- 31 Kennedy, A. D., Beum, P. V., Solga, M. D., DiLillo, D. J., Lindorfer, M. A., Hess, C. E., Densmore, J. J., Williams, M. E., and Taylor, R. P. 2004. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 172:3280.
- 32 Stel, A. J., Ten Cate, B., Jacobs, S., Kok, J. W., Spierings, D. C., Dondorff, M., Helfrich, W., Kluin-Nelemans, H. C., de Leij, L. F., Withoff, S., and Kroesen, B. J. 2007. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol* 178:2287.
- 33 Vega, M. I., Jazirehi, A. R., Huerta-Yepez, S., and Bonavida, B. 2005. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol* 175:2174.
- 34 Eliopoulos, A. G., Davies, C., Knox, P. G., Gallagher, N. J., Afford, S. C., Adams, D. H., and Young, L. S. 2000. CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Mol Cell Biol* 20:5503.
- 35 Hess, S. and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159.
- 36 Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A., and Mourad, W. 2004. CD40/CD40 Homodimers Are Required for CD40-induced Phosphatidylinositol 3-

- Kinase-dependent Expression of B7.2 by Human B Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 279:7799.
- 37 Reyes-Moreno, C., Sharif-Askari, E., Girouard, J., Leveille, C., Jundi, M., Akoum, A., Lapointe, R., Darveau, A., and Mourad, W. 2007. Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 282:19473.
- 38 Shan, D., Ledbetter, J. A., and Press, O. W. 2000. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother* 48:673.
- 39 Cragg, M. S. and Glennie, M. J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738.
- 40 Tedder, T. F., Baras, A., and Xiu, Y. 2006. Fcγ receptor-dependent effector mechanisms regulate CD19 and CD20 antibody immunotherapies for B lymphocyte malignancies and autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol* 28:351.
- 41 Yazawa, N., Hamaguchi, Y., Poe, J. C., and Tedder, T. F. 2005. Immunotherapy using unconjugated CD19 monoclonal antibodies in animal models for B lymphocyte malignancies and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15178.
- 42 Hofmeister, J. K., Cooney, D., and Coggeshall, K. M. 2000. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 26:133.
- 43 Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L., and Bonavida, B. 2004. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res* 64:7117.
- 44 Anolik, J., Looney, R. J., Bottaro, A., Sanz, I., and Young, F. 2003. Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation. *Eur J Immunol* 33:2398.
- 45 Jak, M., van Bochove, G. G., van Lier, R. A., Eldering, E., and van Oers, M. H. 2011. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death. *Leukemia* 25:968.
- 46 Girouard, J., Reyes-Moreno, C., Darveau, A., Akoum, A., and Mourad, W. 2005. Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression. *Mol Immunol* 42:773.

- 47 Coiffier, B. 2006. Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *C R Biol* 329:241.
- 48 Cheung, M. C., Haynes, A. E., Meyer, R. M., Stevens, A., and Imrie, K. R. 2007. Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario. *Cancer Treat Rev* 33:161.
- 49 Edwards, J. C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D. R., Stevens, R. M., and Shaw, T. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572.
- 50 Blix, E. S., Irish, J. M., Husebekk, A., Delabie, J., Tierens, A. M., Myklebust, J. H., and Kolstad, A. 2012. Altered BCR and CD40 signalling are associated with clinical outcome in small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukaemia and marginal zone lymphoma patients. *Br J Haematol* 159:604.
- 51 Ottaiano, A., Pisano, C., De Chiara, A., Ascierto, P. A., Botti, G., Barletta, E., Apice, G., Gridelli, C., and Iaffaioli, V. R. 2002. CD40 activation as potential tool in malignant neoplasms. *Tumori* 88:361.
- 52 Lewis, T. S., McCormick, R. S., Emmerton, K., Lau, J. T., Yu, S. F., McEarchern, J. A., Grewal, I. S., and Law, C. L. 2011. Distinct apoptotic signaling characteristics of the anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab and rituximab produce enhanced antitumor activity in non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 17:4672.

Figure Legends

Figure 1. Rituximab/CD20 induced cell death in human B cells and in some but not all B cell lines

(A) Ramos, BJAB, and purified B cells (5×10^6 cells/ml) were treated with different concentrations of Rituximab (RTX) (1; 5; 10 $\mu\text{g/ml}$) or hIgG (as negative control). Cell death was quantified by PI uptake and flow cytometry. The results are presented as means \pm SD ($n=3$), *** $P < 0.001$. (B) Cells were first incubated with 1F5 anti-CD20, followed by Alexa-488-conjugated goat anti-mouse IgG. IgG2a antibody was used as an isotype-match control. CD20 expression was assessed by flow cytometry. Data are representative of three independent experiments.

Figure 2. PMA-priming and cross-linking Rituximab with a secondary antibody sensitizes Ramos cells to cell death

(A and B) Activating Ramos B cells with PMA. Ramos cells (0.5×10^6 cells/ml) were incubated with 1 ng/ml of PMA for 24h at 37°C, or left non-treated (NT). (A) CD20 surface expression was assessed by flow cytometry. (B) For cell death assessment, PMA-activated cells were stimulated with Rituximab for 16 h incubation at 37°C, or with hIgG (as negative control) and cell death was quantified by propidium iodide (PI) uptake and flow cytometry. (C) Cross-linking Rituximab with a secondary Ab. Ramos cells (5×10^6 cells/ml) were pre-treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of Rituximab (RTX) or hIgG (as negative control) for 30 min at 37°C. The cells were washed, plated and incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of a goat anti-human IgG (GAH) secondary antibody. Cell death was quantified by PI uptake and flow cytometry. Results are presented as means \pm SD ($n=3$), *** $P < 0.001$.

Figure 3. Rituximab dose-dependent cell death of HEK-293/hCD20 cells

(A) HEK-293 cells were transfected with human WT CD20. CD20 surface expression was assessed by flow cytometry. (B) HEK-293/hCD20WT (5×10^6 cells/ml) were plated and then stimulated with different concentrations of Rituximab (RTX; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 $\mu\text{g/ml}$) and hIgG

(as negative control). Following a 16h incubation at 37°C, cell death was quantified by PI uptake and flow cytometry. The results are presented as means \pm SD (n=3), *** $P < 0.001$.

Figure 4. Rituximab-induced cell death is dependent on the level of CD20 expression

HEK-293 cells were stably transfected with different concentrations of CD20. (A) CD20 expression was assessed by flow cytometry. (B) HEK-293/hCD20WT clones (C1-C2-C3-C4) were incubated for 16 h at 37°C with 0.8 μ g/ml of Rituximab (RTX) or hIgG (as negative control). Cell death was quantified by PI uptake and flow cytometry. Results are presented as means \pm SD (n=3), ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 5. Rituximab-induced cell death via CD20 is independent of Fc receptors

(A) BJAB and (B) HEK-293/hCD20WT cells were pre-treated with different concentrations of hIgG (0; 10; 25 μ g/ml) for 30 min at 37°C. The cells were washed and stimulated with Rituximab (RTX; 0.8 μ g/ml for the HEK-293/hCD20WT cells and 10 μ g/ml for the BJAB cells), or left non-stimulated (NS). Following a 16 h incubation at 37°C, cell death was quantified by PI uptake and flow cytometry. Results are presented as means \pm SD (n=3), *** $P < 0.001$.

Figure 6. The physical association of CD20 with CD40 enhances cell death via CD20

HEK-293 cells were stably transfected with CD20, CD40 or a mutated CD40 lacking the cytoplasmic domain (CD40 Δ). (A) CD20 and CD40 expression was assessed by flow cytometry, using anti-CD20 (1F5), anti-CD40 (G28-5), or isotype control (IC). (B) HEK-293/hCD20/pcDNA3.1, HEK-293/hCD20/CD40WT cells and HEK-293/hCD20/CD40 Δ cells were incubated for 16 h at 37°C with different concentrations of Rituximab (RTX) (0.2; 0.4; 0.8 μ g/ml) or left non-stimulated (NS). Cell death was quantified by PI uptake and flow cytometry. The results are expressed as means \pm SD (n=3), *** $P < 0.001$. (C) HEK-293/hCD20/CD40-WT and HEK-293/hCD20/CD40 Δ cells were lysed using a CHAPS lysis solution. Each cell type (5 x 10⁶ cells) was added to the corresponding magnetic protein G beads coated with 10 μ g/ml of

G28-5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ of RTX, and with DA6-147 or hIgG used as negative controls, respectively. Immunoblotting was performed using anti-CD20, GST-77 and anti-CD40, H120 antibodies.

Figure 7. Inhibiting CD40 homodimer formation upregulates cell death induced by CD20

HEK-293 cells were stably cotransfected with CD20 and the mutated form of CD40 (CD40C238A) unable to form the disulfide-bond homodimer. (A) The expression of CD20, CD40 and CD40C238A was assessed by flow cytometry using anti-CD20 (1F5), anti-CD40 (G28-5), or isotype control (IC). The mean fluorescent intensity is represented in the flow cytometry graph. (B) HEK-293/hCD20/CD40WT and HEK-293hCD20/CD40C238A were incubated for 16 h at 37°C with different concentrations of Rituximab (RTX; 0.2; 0.4; 0.8 $\mu\text{g/ml}$) or left non-stimulated (NS). HEK-293/hCD20/pcDNA3.1 cells were used as control. The cell death was measured by 1 $\mu\text{g/ml}$ of PI and flow cytometry. The results are expressed as means \pm SD (n=3), ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 8. The physical association of CD20 with CD40 enhances cell death via CD40

HEK-293 cells were stably transfected with CD20 or CD40. (A) CD20 and CD40 surface expression was assessed by flow cytometry using anti-CD20 (1F5), anti-CD40 (G28-5), or isotype control (IC). (B) HEK-293/hCD40/BCMGS and HEK-293/hCD20/CD40WT were incubated with different concentrations of G28-5 (0.25; 0.5, 1 $\mu\text{g/ml}$) or with DA6-147 (1 $\mu\text{g/ml}$) as a negative control, for 16 h at 37°C. Cell death was quantified by PI (1 $\mu\text{g/ml}$) and analyzed by flow cytometry. The results are expressed as means \pm SD (n=3), *** $P < 0.001$.

Figure 9. A combination of anti-CD20 and anti-CD40 antibodies enhances the cell death response

HEK-293 cells stably transfected with CD20 and CD40 and BJAB cells were used. (A) Cells were stimulated with different concentrations of G28-5 incubated alone or combined with one concentration of Rituximab (RTX; 0.2 $\mu\text{g/ml}$ for HEK-293/hCD20/CD40WT, and 1 $\mu\text{g/ml}$ for BJAB cells), and DA6-147 was used as a negative control. (B) Cells were stimulated with

different concentrations of RTX incubated alone or combined with one concentration of G28-5 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) and hIgG was used as a negative control. Cell death was quantified by PI (1 $\mu\text{g/ml}$) and analyzed by flow cytometry. The percentage of specific cell death was obtained by subtracting the corresponding isotype control. The results are expressed as means \pm *SD* (n=3), *** $P < 0.001$.

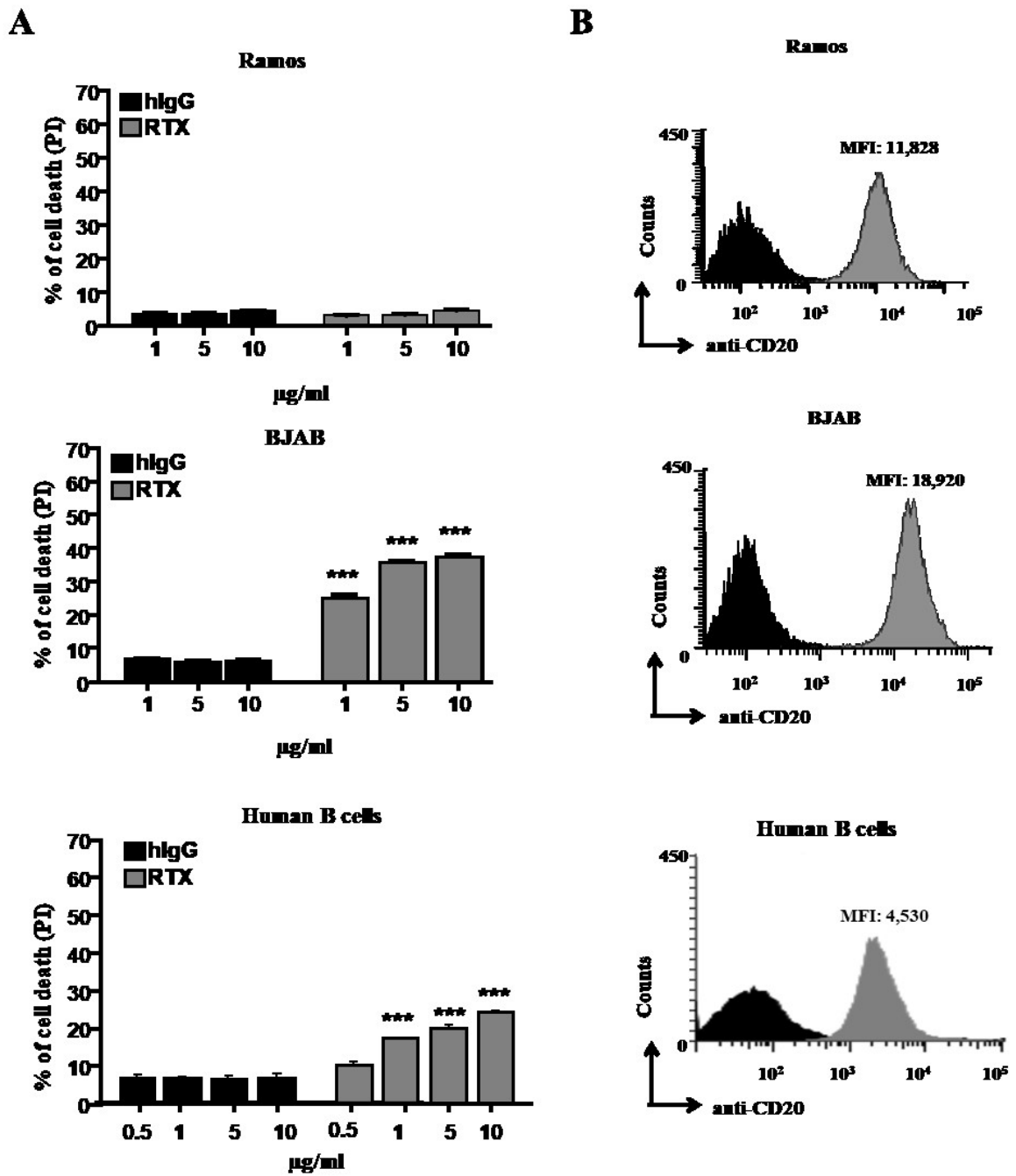


Figure 1.

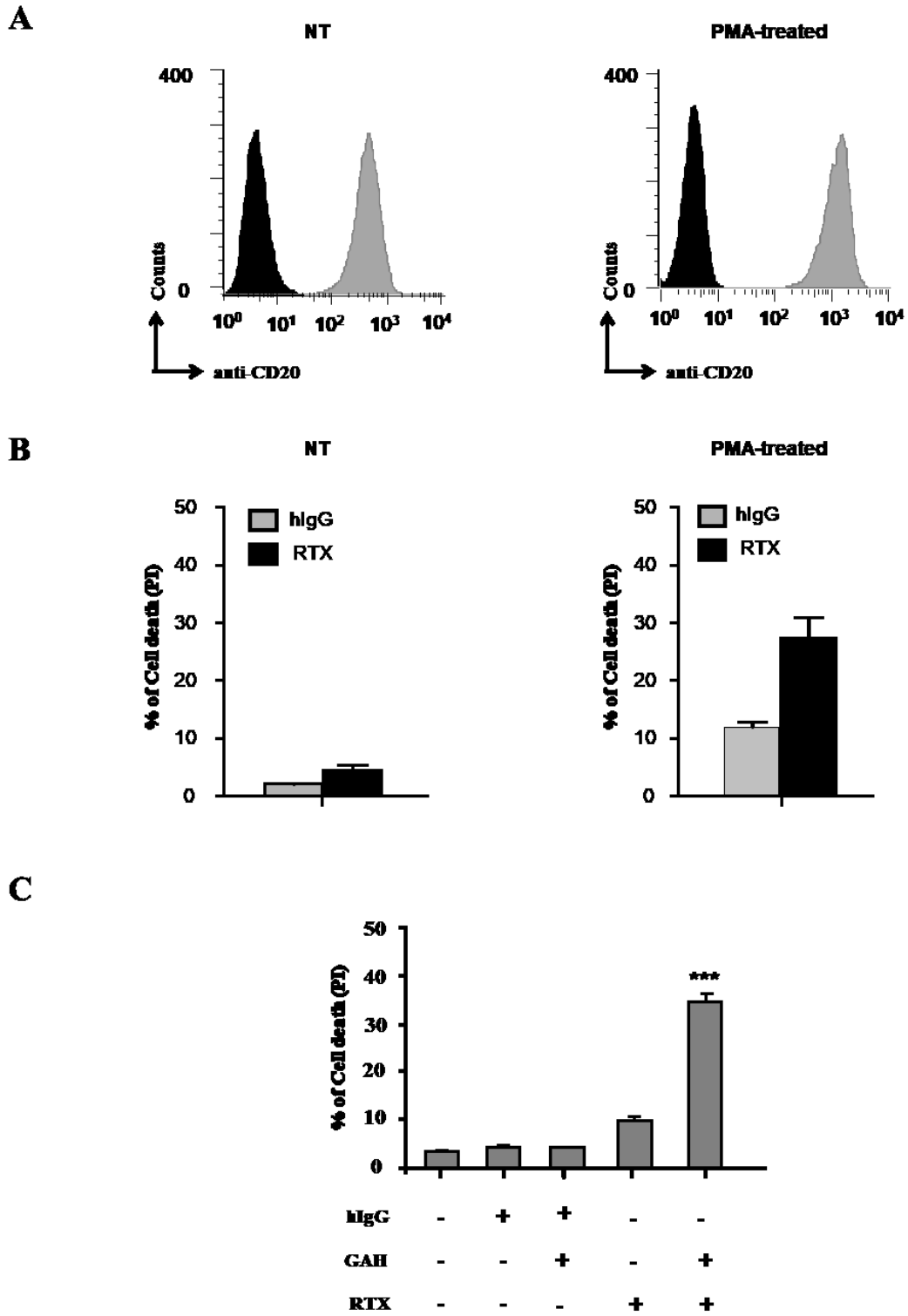
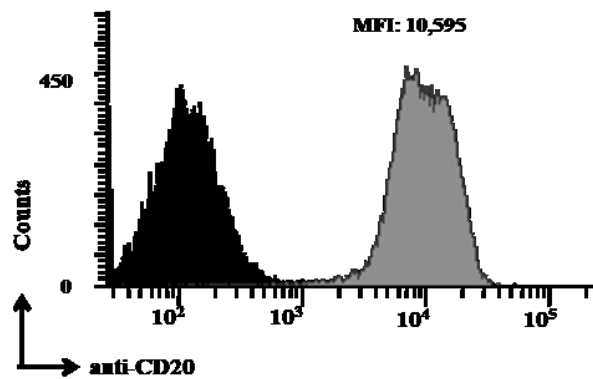


Figure 2.

A



B

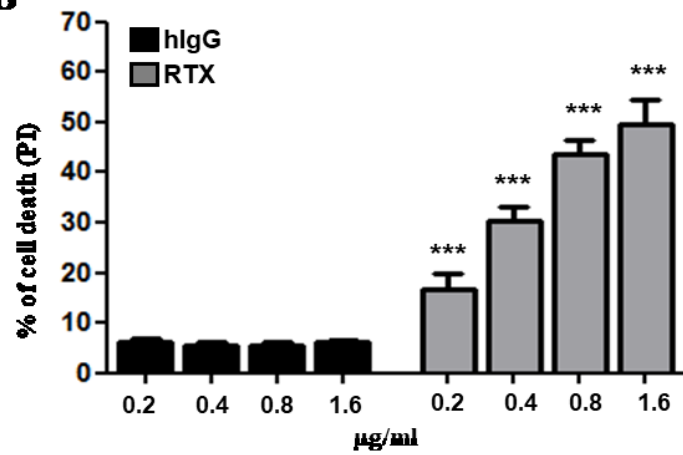


Figure 3.

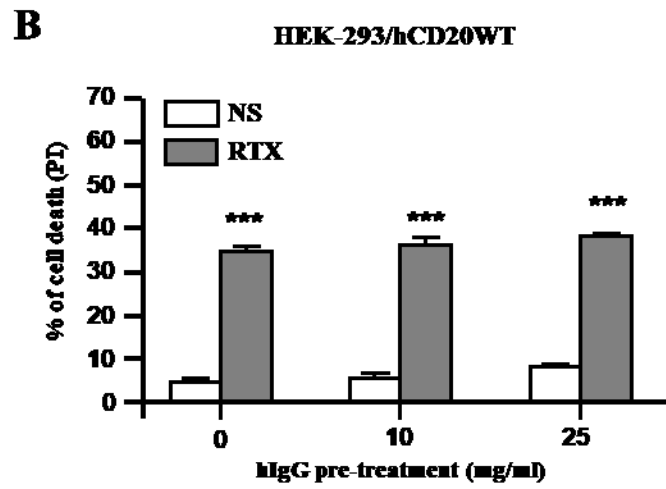
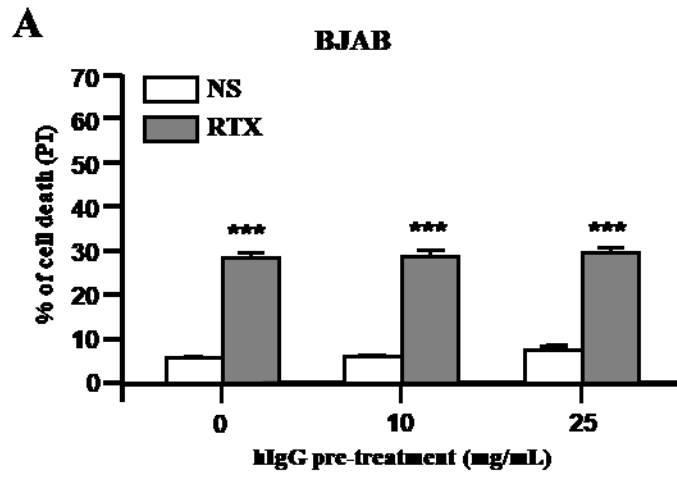


Figure 5.

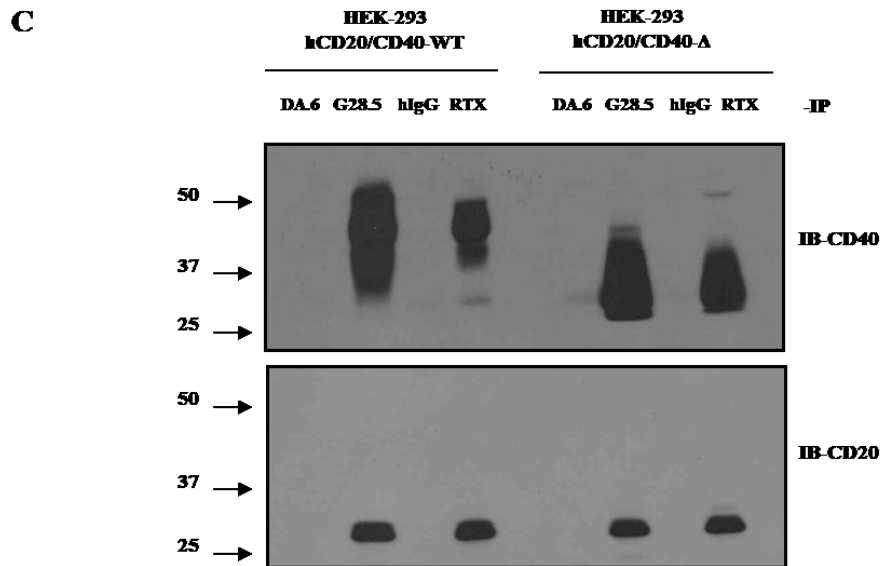
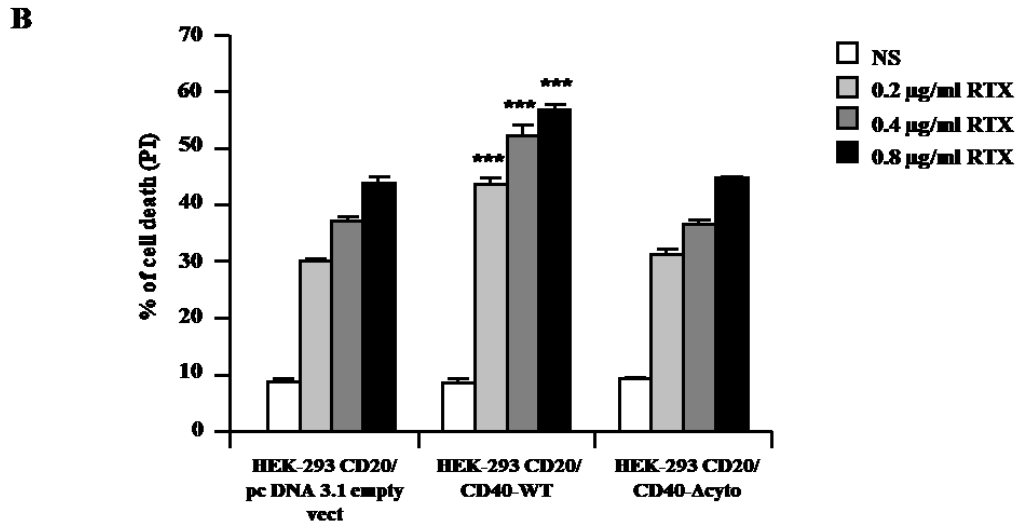
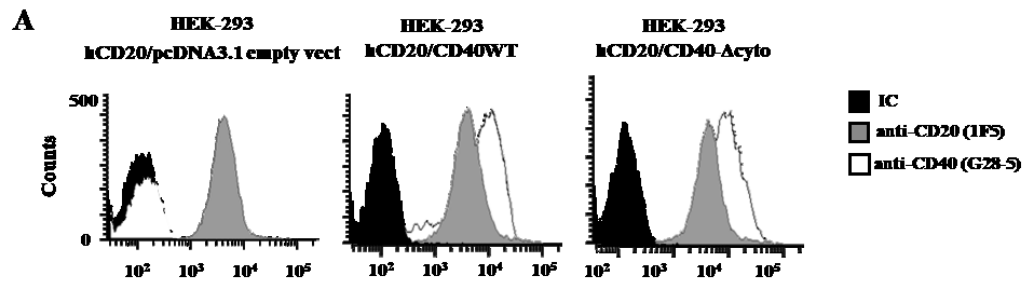


Figure 6.

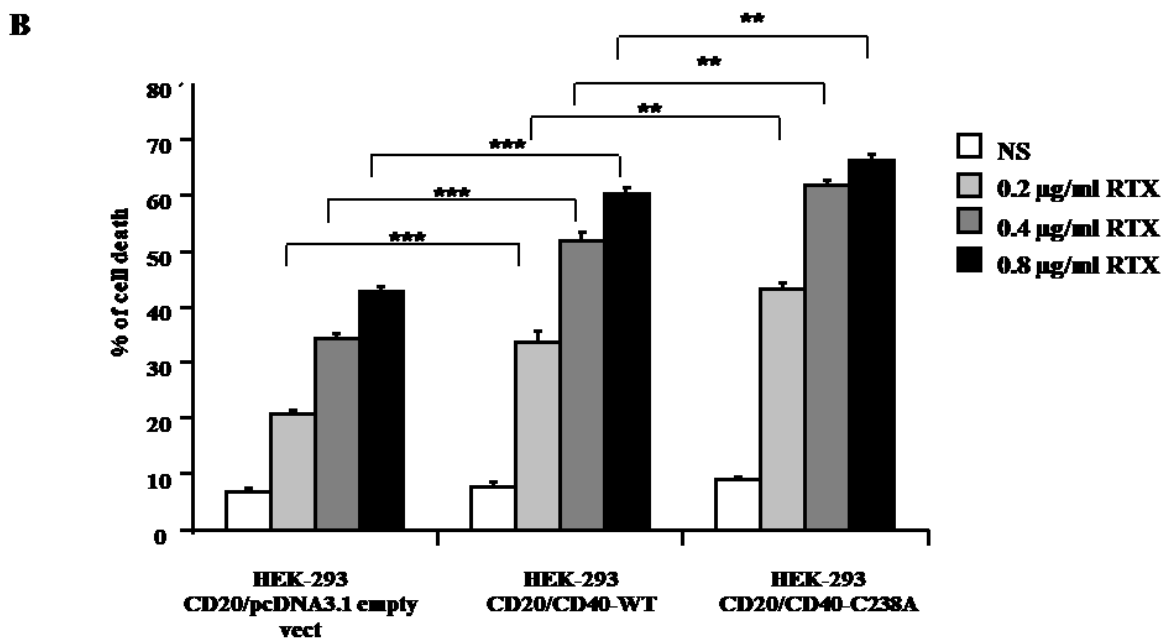
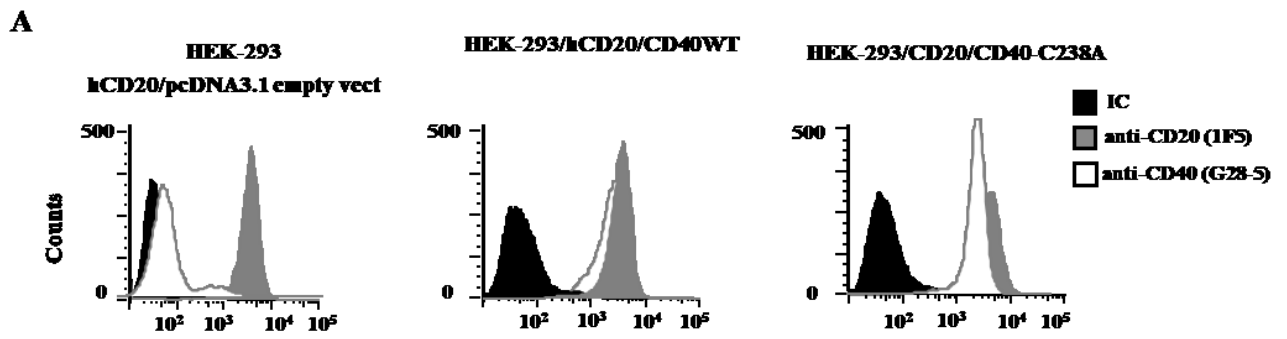


Figure 7.

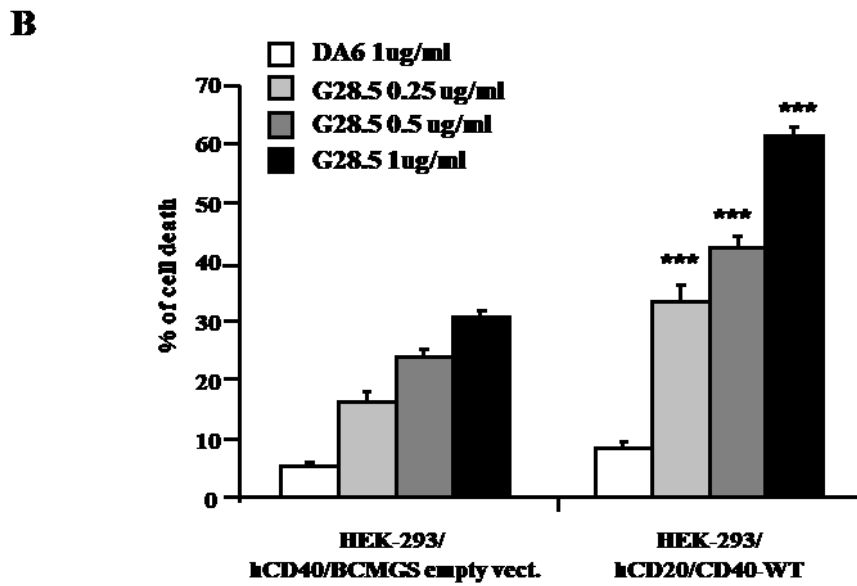
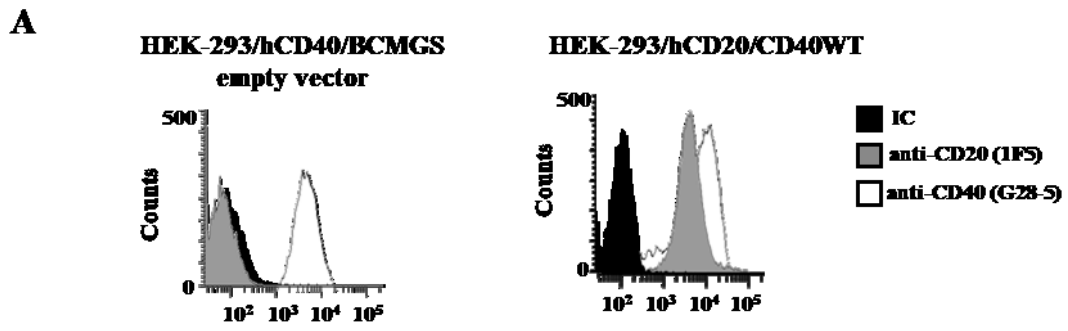


Figure 8.

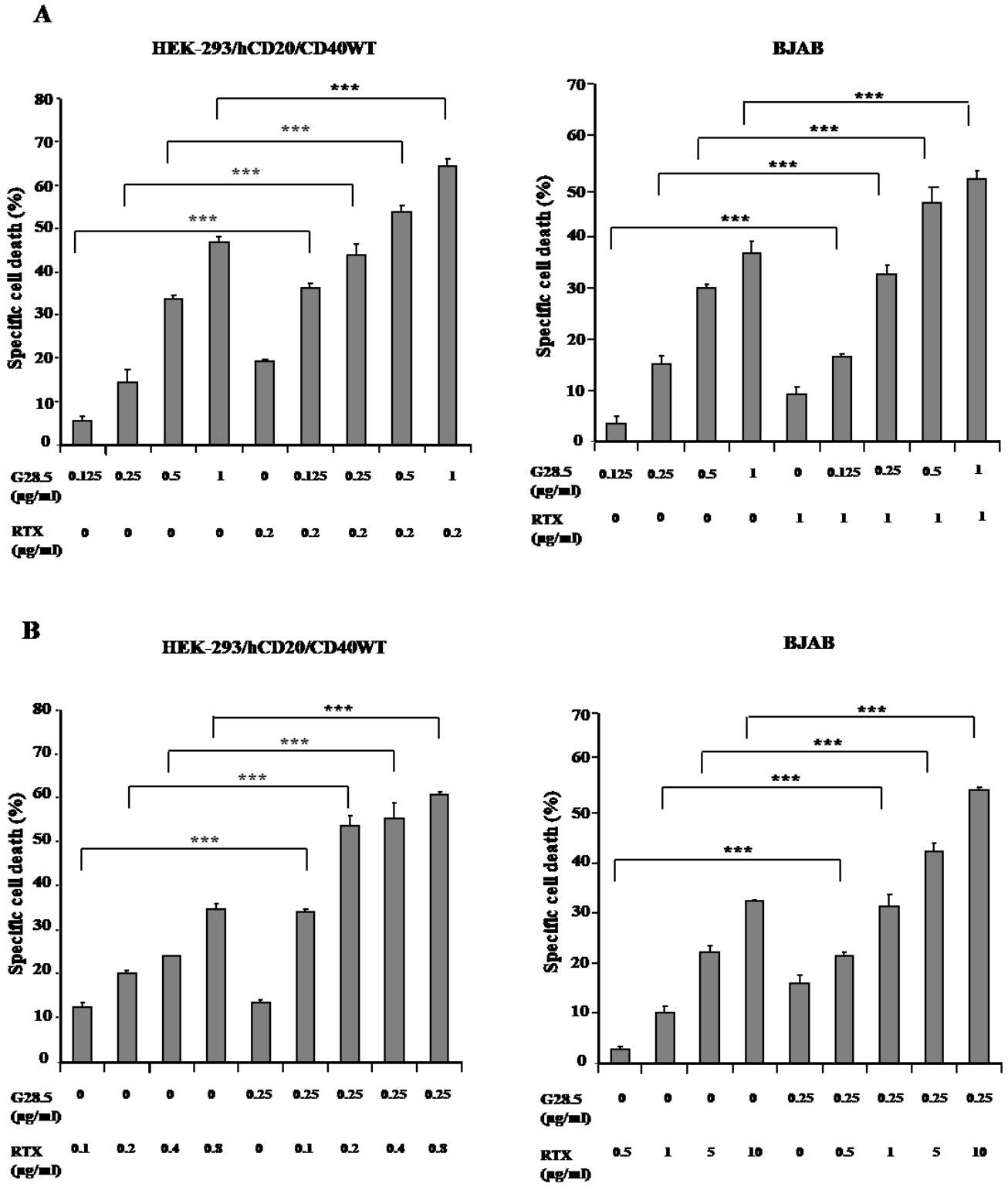


Figure 9.

Chapitre 3. Le rôle des signaux provenant du CD40 et de son association au CD20 dans le clivage du CD154

3.1 Mise en contexte

Le couple CD154/CD40 joue un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires en induisant des signaux bidirectionnels. Or, l'effet de ces signaux sur la modulation des réponses induites par ce couple n'est pas encore étudié. Le clivage du CD154 est une réponse biologique importante surtout que le sCD154 a été relié à plusieurs maladies auto-immunes et cardiovasculaires. En effet, nous avons démontré que le CD40, sous forme soluble et membranaire, est capable de cliver le CD154 de la surface des cellules T alors que les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ n'y sont pas impliquées [22]. Cependant ces quatre récepteurs sont capables d'induire un signal via le CD154 [76]. Comme le CD40 membranaire clive le CD154 de la surface cellulaire, il est important d'étudier l'impact des signaux provenant du CD40 dans ce clivage.

De plus, nous avons démontré dans le chapitre 2 que l'association du CD40 avec le CD20 à la surface cellulaire amplifie la mort cellulaire induite via le CD40 ou le CD20 [315]. Les signaux du CD40 sont impliqués dans l'amplification de la mort cellulaire induite via le CD20. Une synergie de cette réponse cellulaire est observée suite à une induction simultanée via le CD40 et le CD20. Donc, un *cross-talk* existe entre ces deux molécules. Mais est ce que cette association peut moduler aussi le clivage du CD154 induit par le CD40?

3.2 Contribution des auteurs

Loubna Al-Zoobi : Planification et réalisation de toutes les expériences dans l'article : le clivage du CD154 de la surface cellulaire par cytométrie en flux (figure 1 à 4) et la quantification du sCD154 dans le surnageant par le test d'ELISA. Rédaction et correction de l'article.

Suzanne Salti : Participation à la réalisation de l'expérience qui porte sur l'expression du CD154 à la surface des cellules et la quantification du sCD154 dans le surnageant par le test d'ELISA.

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

Walid Mourad : Direction générale.

3.3 Résumé

Le CD154 ou CD40 Ligand, un membre de la famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*), est une protéine immuno-régulatrice importante exprimée à la surface des cellules T activées. Cette protéine peut exister aussi sous une forme soluble biologiquement active résultante d'un clivage enzymatique de la forme membranaire. Nous avons précédemment démontré que le CD154 est clivé de la surface des cellules T suite à son interaction avec son récepteur principal, le CD40, nécessitant un signal provenant du CD154. Comme il a été démontré que l'interaction du CD154 avec le CD40 induit des signaux bidirectionnels, nous avons tenté dans cet article de déterminer si le clivage du CD154 implique des signaux provenant non seulement du CD154, mais aussi provenant du CD40. Nos résultats montrent que, en utilisant un système de co-culture, le CD154 se clive d'une façon plus significative suite à son engagement avec le CD40-WT plutôt qu'avec une forme tronquée de CD40 dépourvue du domaine cytoplasmique (CD40- Δ cyto). De plus, le clivage du CD154 est complètement aboli lorsque le CD154 et le CD40 se trouvent sous leur forme tronquée. Nos résultats montrent que les signaux provenant de ces deux molécules sont impliqués dans le clivage du CD154. D'autre part, nous avons étudié l'influence de l'association du CD40 avec le CD20 sur le clivage du CD154 étant donné que le CD40 se trouve associé au CD20 à la surface cellulaire et qu'une synergie biologique existe entre elles. Nos résultats ont montré que l'association du CD40/CD20 amplifie le clivage du CD154. Tous ces résultats soulignent l'importance des signaux bidirectionnels induits par le couple CD154/CD40 mais aussi confirment l'importance biologique de l'association CD40/CD20. En conclusion, ces résultats nous permettent d'élargir nos connaissances dans ce domaine mais aussi de définir de nouvelles cibles pour un traitement des maladies impliquant le CD154.

Role of CD40 signaling and its association with CD20 in the cleavage of CD154

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

Article en préparation.

¹Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada.

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

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

Abbreviations: TNF, tumor necrosis factor superfamily; sCD154, soluble CD154; PKC, protein kinase C; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein.

Abstract

CD154 or CD40 Ligand, a member of tumor necrosis factor superfamily (TNF), is an important immunoregulatory protein expressed on activated T cells. This protein can also exist as a truncated soluble biologically active form (sCD154), resulting from the shedding of membrane-bound CD154. We have previously demonstrated that CD154 is cleaved from T cell surface following its interaction with its principal receptor CD40, in a process involving signaling via CD154. As the interaction of CD154 with CD40 was shown to induce a bidirectional signaling, we aim at evaluating if CD154 cleavage from cell surface involves signaling not only via CD154 but also via CD40. Our data show, while using co-culture experiments, that CD154 is cleaved more significantly upon its engagement with CD40WT rather than with a truncated form of CD40 lacking the cytoplasmic domain (CD40 Δ cyto). Interestingly, the cleavage of CD154 was completely abolished when both CD40 and CD154 were in their truncated forms. Thus, our results demonstrate that signaling via CD40 as well as CD154 enhances the cleavage of CD154 from cell surface. In the same line of evidence and given the implication of signaling via CD40 in other CD40-mediated responses such as its biological synergy with CD20, we evaluated the influence of the CD40/CD20 association on the CD40-mediated cleavage of CD154. Our results show that the association of CD40 with CD20 upregulates the cleavage of CD154. These data further highlight the importance of the CD154/CD40 bidirectional signaling and outline again the biological significance of the CD40/CD20 association, broadening our understanding of the CD154 system and defining new targets for future therapeutic in CD154-related diseases.

Keywords: CD154, cleavage, CD40, bidirectional signaling, CD20, association.

Highlights

1-CD40 signaling enhances the cleavage of CD154 from cell surface; 2-Signaling through CD154 and CD40 are necessary for CD154 cleavage; 3- The CD40/CD20 association upregulates the production of sCD154

Introduction

CD154, a member of the tumor necrosis factor superfamily (TNF), and its classical receptor, CD40, have attracted much attention due to their important role in the regulation of both humoral and cellular immune responses. CD154 also known as CD40 Ligand (CD40L) is a type II glycoprotein that exists as a 33-39 KDa on the surface of activated T cells and platelets as well as other cell types such as basophiles, mast cells, eosinophils and natural killer cells [1]. In addition to the membrane form, a soluble and reduced form of circulating CD154 (sCD154; 18KDa) have been detected in blood and was shown to be upregulated in many pathological conditions such as autoimmune and inflammatory diseases [2, 3]. This form is generated by an enzymatic cleavage at Methionine 113 of the full length CD154 expressed on platelets and T cell surface and retains its ability to bind CD40 and to deliver biological responses like the activation and the proliferation of B cells and endothelial cells [4, 5]. It has been reported that the shedding of CD154 from activated platelets depends on its interaction with CD40 [6] and can be modulated by matrix metalloproteinase MMP-2 [7] and MMP-9 [8]. We have previously shown that CD154 is cleaved from the surface of T cells upon its engagement with CD40, in a process involving two members of the matrix metalloproteinases family, A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and 17 (ADAM17) [9]. In addition to CD40, CD154 was also shown to bind other receptors, namely α IIb β 3, α 5 β 1 and α M β 2 integrins and to regulate a variety of inflammatory responses [10]. It is worth mentioning at this point that while binding of all receptors to CD154 would induce intracellular signaling via this latter [11], only CD40 is capable of triggering the cleavage of CD154 from T cell surface [9]. Our results also showed that deleting the CD154 cytoplasmic tail, usually involved in intracellular signaling transduction [12], completely abrogated the CD154 cleavage induced by soluble CD40 [9].

The CD154/CD40 dyad has been implicated in many biological responses ranging from Ig switching, to cell activation, differentiation, proliferation or even apoptosis [3, 13, 14]. Interestingly, the interaction of CD154 with CD40 engages a bidirectional signaling involved in the cross-talk between T cells and antigen-presenting cells (APCs). In this matter, we have demonstrated that the binding of CD40 to CD154 can stimulate via this latter several

intracellular signals like the activation of PKC δ and PKC α , p38, ERK1/2 and Akt pathways, and can enhance the production of IL-2 in CD3/CD28 co-stimulated T cells [12]. On the other hand, CD40 lacks intrinsic enzymatic activity but recruit adaptor molecules to its cytoplasmic domain for signal transduction. Indeed, the engagement of CD40 with CD154 leads to a rapid recruitment of TNFR-associated factors (TRAF) molecules or Janus kinase 3 (Jak3) from the cytoplasm [15, 16] subsequently activating several signaling molecules, including NF- κ B, JNK and p38. This cytoplasmic domain of CD40 was also shown to be responsible for the biological synergy between CD40 and CD20 on B cells [17]. Indeed, on B cell surface, CD40 was shown to be physically associated to CD20, a tetraspanning B-cell membrane protein [18]. In spite the fact that CD20 does not have a ligand, the use of specific antibodies allowed us to understand its role in triggering calcium influx in B cells [19] and in inducing their depletion [20, 21]. Interestingly, we have previously demonstrated that the CD40/CD20 association on cell surface boosts cell death responses induced by CD40 or CD20. As mentioned above, the role of CD40 in amplifying CD20-mediated cell death was shown to involve its cytoplasmic domain, since a truncated CD40 lacking a cytoplasmic tail failed to induce similar responses [17]. These data strongly suggest that the CD40/CD20 association could modulate other responses induced by CD40.

Given these findings, we aim herein at elucidating the role of signaling via CD40 in CD154 cleavage and thus at outlining the importance of the bidirectional CD154/CD40 signaling in such process. Furthermore, we will investigate the implication of the association of CD40 to CD20 in mediating CD154 cleavage. Indeed, our results here demonstrated that signaling via CD40 enhances the cleavage of CD154 from cell surface and that the association of CD40 with CD20 upregulates this response.

Materials and Methods

Cell lines and culture conditions

Jurkat E6.1 cells (human T cell lines), HEK 293 cells (Human Embryonic Kidney) and A20 cells (mouse B cells) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, USA). Jurkat E6.1 cells were transfected with human CD154 wild-type

(hCD154WT), as described previously [12], and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS (Fetal Bovine Serum) (Wisent, QC) and with 1% PSG (penicillin (P), L-glutamine (G) and streptomycin (S)) from GIBCO (Burlington, ON) with 100µg/ml zeocin (InvivoGen, ON). HEK 293 cells were transfected with hCD154WT, with hCD154 lacking the cytoplasmic domain (hCD154Δcyto), with human CD40 wild-type (hCD40WT) or with hCD40 lacking cytoplasmic domain (hCD40Δcyto) and maintained in DMEM 5% FBS and 1% PSG with 100 µg/ml of zeocin (in the case of CD154 vectors) or with 400 µg/ml hygromycin-B (Wisent, in the case of CD40 vectors). A20 cells were stably transfected with hCD40WT, with hCD40Δcyto or with an empty vector as described before [14, 22], and cultured in RPMI 1640 5% FBS and 1% PSG and 400 µg/ml hygromycin-B. HEK 293 cells were double transfected with BCMGS plasmid encoding human CD20 (hCD20) and/or pcDNA3.1 plasmid encoding hCD40WT as previously described [17], and cultured in DMEM 5% FBS and 1% PSG supplemented with 800 µg/ml of hygromycin-B and 1600 µg/ml of neomycin (InvivoGen, ON).

Antibodies and reagents

Hybridomas producing mAbs directed against hCD154 (C4.14, mouse IgG2a antibody), hCD40 (G28.5, mouse IgG1) and hCD20 (IF5, mouse IgG2a) were obtained from ATCC. The antibodies produced by these hybridomas were purified in our laboratory from the supernatant on protein G/A sepharose columns (Sigma-Aldrich, ON). Mouse IgG labeled or not with biotin (mIgG or mIgG-B) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA). The secondary goat anti-mouse IgG Alexa Fluor-488 coupled antibody (GAM-Alexa Fluor 488) and streptavidin coupled with phycoerythrin (streptavidin-PE) were purchased from Invitrogen Life Technology. Anti-CD3-FITC and mIgG-FITC were obtained from BD Bioscience.

Stimulation of CD154 cleavage in co-cultures

This was undertaken by co-culturing Jurkat hCD154WT cells ($5 \cdot 10^6/200\text{ul}$), HEK hCD154WT or HEK 293 hCD154Δcyto with A20 cells ($1 \cdot 10^6/200\text{ul}$) expressing hCD40WT or hCD40Δcyto for 1h at 37°C. Another co-culture system was Jurkat hCD154WT cells ($5 \cdot 10^6/200\text{ul}$) co-cultured with HEK 293 double transfected expressing hCD20 and/or hCD40 ($1 \cdot 10^6/200\text{ul}$) for 1h at 37°C. The A20 Vect. and HEK 293 Vect. cells were used as a negative control.

FACS analysis

For CD154 expression, Jurkat hCD154WT, HEK hCD154WT and HEK 293 hCD154Δcyto were stained with the anti-CD154 biotin conjugated mAb (C4.14-B, 0.5μg/100μl) for 30 min at 4°C, washed with cold PBS 2% FBS and incubated with streptavidin-PE (1μg/1000μl) for 30 min at 4°C. The cells were then washed and analyzed by FACS Calibur and the Flowjo program (BD Biosciences, ON).

To measure the residual cell surface expression of CD154 after stimulation, Jurkat hCD154WT cells were double stained with anti-CD3-FITC (2μg/100μl) and C4.14-biotin conjugated antibody (C4 14-B, 0.5μg/100μl) for 30 min at 4°C. The cells were then washed and incubated with streptavidin-PE (1μg/1000μl) for 30 min at 4°C. mIgG-FITC and mIgG-B were used as negative controls for anti-CD3-FITC and C4.14-B respectively. Cells were then washed with PBS 2% FBS and double fluorescence was detected and analysed by FACS using the appropriate compensation parameters.

For CD40 expression, A20 and HEK 293 stably transfected cells with CD40 were incubated with G28.5-biotinylated (G28.5-B, 1μg/100ul) for 30 min at 4°C. Cells were then washed with cold PBS 2% FBS and incubated with streptavidin-PE (1μg/1000ul) for 30min. To quantify CD40 with CD20 expression, HEK 293hCD20, HEK 293 hCD40 and HEK 293 hCD40/CD20 cells were incubated with G28.5 or IF5 (1μg/100μL) for 30 min at 4°C, and they were then washed and incubated for 30 min with the secondary antibody GAM-Alexa Fluor-488 (1μg/1000μl). Mouse IgG was used as an isotype control for G28.5 and IF5. After labeling, the cells were washed and analysed by FACS Calibur.

Quantification of sCD154 in cell supernatants

The concentration of sCD154 in the supernatant was measured by ELISA as described in the datasheet (R&D, Minneapolis, USA).

Results and discussion

Bidirectional signaling is involved in CD154 cleavage

The capacity of signaling via both the receptor and the ligand has been suggested for numerous ligand-receptor dyads, such as members of the EPH family [23], the integrin family [24], and the TNF Receptor family and their ligands [25, 26]. The interaction between CD154 of T cells and CD40 of APCs was shown to induce bidirectional signaling, modulating biological responses in both types of cells [11, 27, 28]. Among the CD154-mediated responses of high importance in physiological and pathological conditions, is the cleavage of CD154 from cell surface into a soluble form. We have previously shown that CD40 is the unique receptor involved in CD154 cleavage from the surface of T cell lines [9]. Based on these data, we aimed to investigate the importance of bidirectional signaling via the CD154/CD40 dyad in CD154 shedding.

i- Role of signaling via CD40 in CD154 cleavage

We generated a truncated form of CD40 lacking its cytoplasmic domain (CD40 Δ cyto). This domain is important in signal transduction and activation of several responses mediated by CD40 [22]. In order to assess the implication of CD40-associated signaling in CD154 cleavage from cell surface, two systems of co-cultures were used. In the first set of experiments, A20 B cell lines stably expressing human CD40 Δ cyto (hCD40 Δ cyto), CD40 wildtype (CD40WT) or an empty vector were co-cultured with Jurkat T cell lines transfected with human CD154WT (Jurkat hCD154WT) for 1h at 37°C. The expression of CD154 on the surface of T cell lines was measured using flow cytometry analysis. Our results show that the level of CD154 expressed on cell surface decreased more significantly in the presence of CD40WT-transfected A20 cells than with CD40 Δ cyto when compared to empty vector-transfected cells (Fig. 1A). It should be noted that the level of expression of CD40WT and CD40 Δ cyto on the surface of transfected A20 cells is comparable (Fig. 1A, upper panels), excluding the possibility that this differential response is due to a variable CD40 expression.

Furthermore, supernatants of A20 Vect., A20 hCD40WT or A20 hCD40 Δ cyto co-cultured with Jurkat hCD154WT for 1h, 2h or 3h at 37°C were collected and assessed for

sCD154 levels using ELISA. Our data show that the concentration of sCD154 in the supernatant of Jurkat cells cocultured with A20 hCD40WT was more important than that of cells co-cultured with A20 hCD40 Δ cyto, as compared to Jurkat/A20-Vect. co-cultures (Fig. 1B). This elevated level of sCD154 in the supernatant of Jurkat hCD154WT was even more pronounced when the co-culturing time with A20 hCD40 cells increased from 1, 2 to 3h. These data further confirm that the engagement of CD40 on CD154-positive cells is responsible for the cleavage of CD154 from T cell surface (Jurkat E6.1), and that the cytoplasmic domain of CD40, and thus signaling via CD40, is involved in this CD154 cleavage.

As CD40 is a pan-antigen expressed on numerous APCs, including epithelial cells, we next aimed at assessing CD154 cleavage induced by CD40 present on the surface of the epithelial cell lines. Thus, in the second set of experiments, we co-cultured HEK 293 cells transfected with vector alone, hCD40WT or hCD40 Δ cyto with Jurkat hCD154WT cells. Similarly to data described above, our results here also show that the level of CD154 expressed on Jurkat cells decreased more significantly in the presence of CD40WT-transfected HEK cells than with CD40 Δ cyto when compared to empty vector-transfected cells (Fig. 2), further confirming that signaling via CD40 is involved in CD154 cleavage.

Given that CD40-mediated CD154 cleavage from the surface of T cells was previously reported to be dependent on the activation of ADAM-10 and ADAM-17 [9], it is therefore important to investigate how signaling via membrane-bound CD40 is linked to the activation of these enzymes, which are probably not only activated on the surface of CD154-expressing T cells but also on the CD40-expressing ones too.

ii- Role of bidirectional signaling via both CD154 and CD40 in CD154 cleavage

We have previously shown that CD154 shedding could be induced by recombinant soluble CD40 indicating that signaling via CD154 is sufficient to trigger this process [9]. However, when CD40 was membrane-bound rather than soluble, the cleavage process depended as well on signaling via CD40 expressed on cell surface. To confirm the important role of signaling via both CD154 and CD40 in this matter, we investigated the CD154 cleavage from HEK 293 cells, stably transfected with CD154WT (HEK 293 hCD154WT) or with CD154 lacking the cytoplasmic domain, upon their co-culture with A20 Vect., A20 hCD40WT or A20

hCD40 Δ cyto. Fig. 3 shows also that the expression of CD154 on cell surface decreased more importantly when HEK 293 CD154 WT cells were co-cultured with A20 cells transfected with CD40WT than with A20 hCD40 Δ cyto cells compared to HEK/A20Vect. co-cultures. On the other hand, the decrease of CD154 expressed on HEK 293 hCD154 cells, compared to the control level on HEK 293Vect. cells, was less important when CD154 lacked its cytoplasmic domain (HEK 293 CD154 Δ cyto), upon coculture with A20 hCD40WT, indicating that the signaling via CD154 itself is implicated in the cleavage of the molecule from cell surface (Fig. 3). These latter data are in accordance with our previous report that deleting the CD154 cytoplasmic tail abrogated the CD154 cleavage induced by the soluble form of CD40 [9]. Taken together, these experiments reveal that the deletion of the cytoplasmic domain of CD154 or of CD40 decreased the shedding of CD154 which outline the contribution of signaling from both molecules in CD154 cleavage. Interestingly, the deletion of cytoplasmic domains of both molecules, reflected in the HEK 293 hCD154 Δ cyto/A20 hCD40 Δ cyto co-culture, completely abolished the cleavage of CD154 (Fig. 3).

Our results thus strongly indicate that the interaction of CD154 with CD40 acts on the T cell and APC in a bidirectional fashion during the T cell/APC cross-talk enhancing and synchronizing responses induced by the two molecules, and in focus here is the CD154 cleavage. It is worth mentioning that CD40 is also implicated in the shedding of CD154 from the surface of activated platelets, which constitute the major source of sCD154 in circulation. In spite few studies showing that the soluble form of CD154 lost its capacity to activate APCs [6], most evidence point to the fact that sCD154 is indeed biologically active [4, 5]. The release of sCD154 and thus an increased level of the molecule in circulation is a characteristic of several autoimmune and inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, atherosclerosis and others [2, 3]. Our results herein, have thus outlined an additional link between the CD154/CD40 dyad and its bidirectional signaling and autoimmune/inflammatory processes and conditions.

The physical association of CD40 with CD20 on the cell surface enhances the cleavage of CD154 induced by CD40

Our lab has previously shown that CD40 is physically associated with CD20 on human B cells [18]. Signals from both molecules were also demonstrated to cooperate together stimulating various responses in B cells [29]. CD40 stimulation was shown to induce internalization of CD20 in normal human B cells and thus increasing their intracellular calcium influx [30]. In transformed B cells, the CD40/CD20 cross-talk triggered differential responses depending on the type of tumor and its level of expression of CD40. Chronic lymphocytic leukemia cells exhibited more CD20-mediated cell death upon their pre-stimulation with CD40 [31]. On the other hand, CD20 was shown to cooperate with CD40 in enhancing the proliferative response of B cell acute lymphoblastic leukemia cells [32]. In the same line of evidence, our group has previously shown that the co-expression of CD40 and CD20 increases cell death induced by anti-CD40 mAb or anti-CD20 mAb and that the enhancing role of CD40 in CD20-mediated cell death is dependent of the cytoplasmic domain of CD40 while the physical association of these two molecules did not involve this domain [17]. All these findings are highlighting the role of the CD40/CD20 association, the cooperation of both molecules for the induction of a synergized response, and the implication of the cytoplasmic domain of CD40 in such synergy.

Hence, we aimed here at assessing the role of CD20 in enhancing the CD40-mediated CD154 cleavage. The A20 cells described above, are B cell lines already expressing CD20 on their surface [33], thus to be able to evaluate the importance of the presence and absence of CD20 on the CD40-mediated responses, we used HEK 293 cells which do not express either the CD40 or CD20. In brief, we co-cultured HEK 293 cells stably transfected with vector alone (HEK 293 Vect., controls), hCD40WT (HEK 293 hCD40), hCD20 (HEK 293 hCD20) or both (HEK 293 hCD40/hCD20) with Jurkat hCD154WT cells. As shown in Fig. 4, in the presence of cells expressing only CD40, 60% of CD154 was cleaved; while in the presence of cells co-expressing CD40 and CD20, CD154 is totally cleaved from the surface of Jurkat hCD154WT cells. It is worth noting here that the presence of CD20 alone does not affect the level of CD154 expressed on Jurkat cell surface and thus cleavage of CD154 (Fig. 4). Our findings confirm the biological significance of the association of CD40 with CD20 in CD40-mediated responses in general, and in CD154 cleavage in particular, outlining its role in the development of many

diseases where sCD154 is highly detected. Indeed, as CD20-positive cells, the B lymphocytes express as well CD40, the importance of functional association of CD40 and CD20 comes in place and the synergy existing between both molecules proves of high importance in many immune/inflammatory conditions.

Conclusion

The production of sCD154 has been investigated and linked to various autoimmune and vascular disorders and even described as a promising clinical biomarker. Our study demonstrated that signaling via CD40 as well as via CD154 are required for cleavage of this latter from the cell surface. These results further confirm the importance of CD154/CD40 bidirectional signaling in T/APC cross-talks. In addition, our data add to the evidence outlining the biological synergy existing between CD40 and CD20 at the membrane surface of B cells by demonstrating the role of the CD40/CD20 association in the cleavage of CD154. The next step of our research is to generate CD154 resistant to cleavage following its interaction with CD40 and to study its biologic role. The blockage of CD154 cleavage may be used as a treatment in different diseases where sCD154 is implicated.

Acknowledgements

This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke foundation of Canada.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] C. van Kooten, J. Banchereau, CD40-CD40 ligand, *J Leukoc Biol*, 67 (2000) 2-17.
- [2] G.S. Hassan, M. Rana, C. Léveillé, A. Nadiri, M. Jundi, M. Polyak, Y. El-Fakhry, W.M. Mourad, Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses, *Curr Immunol Rev*, 5 (2009) 285-299.
- [3] G.S. Hassan, Y. Merhi, W. Mourad, CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases, *Immunobiology*, 5 (2011) 521-32.

- [4] F. Pietravalle, S. Lecoanet Henchoz, H. Blasey, J.P. Aubry, G. Elson, M.D. Edgerton, J.Y. Bonnefoy, J.F. Gauchat, Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes, *J Biol Chem*, 271 (1996) 5965-5967.
- [5] Y. Jin, S. Nonoyama, T. Morio, K. Imai, H.D. Ochs, S. Mizutani, Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets, *J Med Dent Sci*, 48 (2001) 23-27.
- [6] V. Henn, S. Steinbach, K. Buchner, P. Presek, R.A. Kroczek, The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40, *Blood*, 98 (2001) 1047-1054.
- [7] W.S. Choi, O.H. Jeon, D.S. Kim, CD40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin alpha(IIb)beta(3), *J Thromb Haemost*, 8 (2010) 1364-1371.
- [8] L. Menchen, I. Marin-Jimenez, E.G. Arias-Salgado, T. Fontela, P. Hernandez-Sampelayo, M.C. Rodriguez, N.V. Butta, Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn's disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand, *Gut*, 58 (2009) 920-928.
- [9] D. Yacoub, N. Benslimane, L. Al-Zoobi, G. Hassan, A. Nadiri, W. Mourad, CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner, *J Biol Chem*, 288 (2013) 36083-36093.
- [10] G.S. Hassan, Y. Merhi, W.M. Mourad, CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies, *Trends Immunol*, 30 (2009) 165-172.
- [11] H. Alturaihi, S.H. G, L. Al-Zoobi, S. Salti, Y. Darif, D. Yacoub, S.E. Akoum, M. Oudghiri, Y. Merhi, W. Mourad, Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals, *Eur J Immunol*, 45 (2015) 592-602.
- [12] N. Benslimane, G.S. Hassan, D. Yacoub, W. Mourad, Requirement of transmembrane domain for CD154 association to lipid rafts and subsequent biological events, *PLoS One*, 7 (2012) e43070.
- [13] A. Ara, K.A. Ahmed, J. Xiang, Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer, *ImmunoTargets and therapy*, 7 (2018) 55-61.
- [14] M. Jundi, A. Nadiri, L. Al-Zoobi, G.S. Hassan, W. Mourad, CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment, *Immunobiology*, 3 (2011) 375-38.

- [15] A.C. Grammer, P.E. Lipsky, CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms, *Adv Immunol*, 76 (2000) 61-178.
- [16] S. Hanissian, R. Geha, Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells., *Immunity*, 6 (1997) 379-387.
- [17] L. Al-Zoobi, S. Salti, A. Colavecchio, M. Jundi, A. Nadiri, G.S. Hassan, H. El-Gabalawy, M. Walid, Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface, *Int Immunol*, (2014) 451-465.
- [18] C. Leveille, R. AL Daccak, W. Mourad, CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines, *Eur J Immunol*, 29 (1999) 65-74.
- [19] G. Grafton, L. Thwaite, Calcium channels in lymphocytes, *Immunology*, 104 (2001) 119-126.
- [20] D.R. Anderson, A. Grillo-Lopez, C. Varns, K.S. Chambers, N. Hanna, Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma, *Biochem Soc Trans*, 25 (1997) 705-708.
- [21] M.J. Glennie, R.R. French, M.S. Cragg, R.P. Taylor, Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies, *Mol Immunol*, 44 (2007) 3823-3837.
- [22] A. Nadiri, M.J. Polyak, M. Jundi, H. Alturaihi, C. Reyes-Moreno, G.S. Hassan, W. Mourad, CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events, *Eur J Immunol*, 41 (2011) 2358-2367.
- [23] E.B. Pasquale, Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease, *Cell*, 133 (2008) 38-52.
- [24] S. Gehler, S.M. Ponik, K.M. Riching, P.J. Keely, Bi-directional signaling: extracellular matrix and integrin regulation of breast tumor progression, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 23 (2013) 139-157.
- [25] E. Stuber, M. Neurath, D. Calderhead, H. Fell, W. Strober, Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells., *Immunity*, 2 (1995) 507-521.
- [26] J. Langstein, J. Michel, J. Fritsche, M. Kreutz, R. Andreesen, H. Schwarz, CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling, *J Immunol*, 160 (1998) 2488-2494.

- [27] I.S. Grewal, J. Xu, R.A. Flavell, Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand, *Nature*, 378 (1995) 617-620.
- [28] D. van Essen, H. Kikutani, D. Gray, CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function, *Nature*, 378 (1995) 620-623.
- [29] G.A. Bishop, The power of monoclonal antibodies as agents of discovery: CD40 Revealed as a B lymphocyte costimulator, *J Immunol*, 188 (2012) 4127-4129.
- [30] J. Anolik, R.J. Looney, A. Bottaro, I. Sanz, F. Young, Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation, *Eur J Immunol*, 33 (2003) 2398-2409.
- [31] M. Jak, G.G. van Bochove, E.A. Reits, W.W. Kallemeijn, J.M. Tromp, P. Umana, C. Klein, R.A. van Lier, M.H. van Oers, E. Eldering, CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101, *Blood*, 118 (2011) 5178-5188.
- [32] F.J. Smiers, M. van Paassen, K. Hahlen, B. Lowenberg, I.P. Touw, CD20 and CD40 mediated mitogenic responses in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia, *Br J Haematol*, 93 (1996) 125-130.
- [33] J. Uchida, Y. Lee, M. Hasegawa, Y. Liang, A. Bradney, J.A. Oliver, K. Bowen, D.A. Steeber, K.M. Haas, J.C. Poe, T.F. Tedder, Mouse CD20 expression and function, *Int Immunol*, 16 (2004) 119-129.

Figure legends

Figure 1: Signaling via CD40 on B cells is required for CD154 shedding. *A, upper panels*) CD40 expression was evaluated on A20 cells stably transfected with empty vector, hCD40WT or hCD40 Δ cyto. Cells were stained with G28.5-biotinylated or its isotype control (mouse IgG-B), then incubated with streptavidin-PE- and analysed by flow cytometry; ***A, lower panels*)** Jurkat cells stably transfected with hCD154 (Jurkat hCD154WT) were co-cultured with A20Vect., A20 hCD40 WT or with A20 hCD40 Δ cyto for 1h at 37°C. Cells were double labeled with an anti-CD3-FITC and an anti-CD154-biotin-conjugated antibody (C4.14-B) or with their respective isotype controls, then incubated with Streptavidin-PE and analysed by flow cytometry. Histogram plots represent the fluorescence of CD154 within the CD3-positive population. Data shown are representative of three independent experiments (each experiment was performed in duplicate). MFI is the mean fluorescence intensity; ***B)*** Protein levels of sCD154 in supernatants were determined by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments, *** $p < 0.001$.

Figure 2: Signaling via CD40 on epithelial cells enhances CD154 cleavage from cell surface. *Upper panels*) CD40 expression was evaluated on HEK 293 cells stably transfected with empty vector, hCD40WT or hCD40 Δ cyto. Cells were stained with G28.5-biotinylated or its isotype control (mouse IgG-B), then incubated with streptavidin-PE and analysed by flow cytometry; ***Lower panels*)** Jurkat cells stably transfected with hCD154 (Jurkat hCD154WT) were co-cultured with HEK 293 Vect., HEK 293 hCD40WT or with HEK 293 hCD40 Δ cyto for 1h at 37°C. Cells were double labeled with an anti-CD3-FITC and an anti-CD154-biotin-conjugated antibody (C4.14-B) or with their respective isotype controls, then incubated with streptavidin-PE and analysed by flow cytometry.. Data shown are representative of three independent experiments (each experiment was performed in duplicate). MFI represents the mean fluorescence intensity.

Figure 3: The cleavage of CD154 from cell surface is regulated by signaling via both CD154 and CD40. *A)* CD154 expression was evaluated in HEK stably transfected with empty vector, hCD154WT or hCD154 Δ cyto. Cells were stained with C4.14-biotinylated or its isotype control (mouse IgG-B), then incubated with streptavidin-PE and analysed by flow cytometry; *B)* HEK 293 hCD154WT or HEK 293 hCD154 Δ cyto were co-cultured with A20 vector, A20 hCD40WT or with A20 hCD40 Δ cyto for 1h at 37°C. Cells were double labeled with an anti-CD3-FITC and an anti-CD154-biotin-conjugated antibody (C4.14-B) or with their respective isotype controls, then incubated with Streptavidin-PE and analysed by flow cytometry. Data shown are representative of three independent experiments (each experiment was performed in duplicate). MFI represents the mean fluorescence intensity.

Figure 4: The association of CD40 with CD20 enhances its induction of CD154 cleavage from cell surface. *A)* CD40 and CD20 expression was evaluated in HEK stably transfected with empty vector, hCD20, or hCD40 or both. Cells were stained with G28.5 (anti-CD40), IF5 (anti-CD20) or isotype control (mouse IgG), then incubated with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse Ab and analysed by flow cytometry; *B)* These transfected HEK 293 cells were co-cultured with Jurkat hCD154WT for 1h at 37°C. Cells were then double labeled with an anti-CD3-FITC and an anti-CD154-biotin-conjugated antibody (C4.14-B) or with their respective isotype controls, then incubated with streptavidin-PE and analysed by flow cytometry. Data shown are representative of three independent experiments (each experiment was performed in duplicate). MFI represents the mean fluorescence intensity.

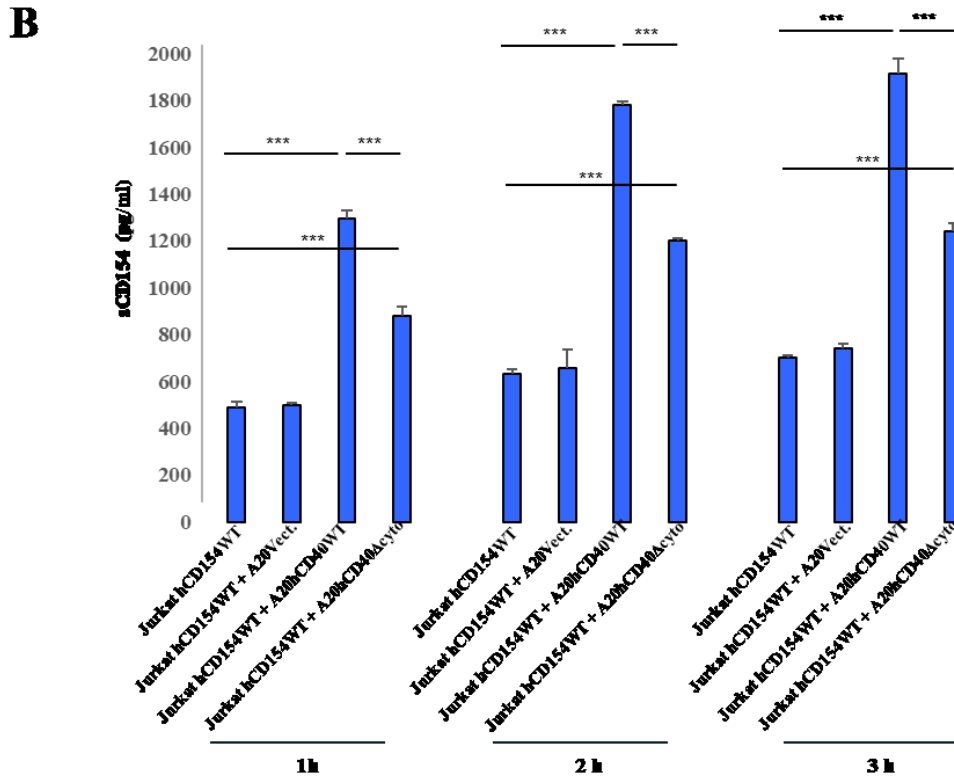
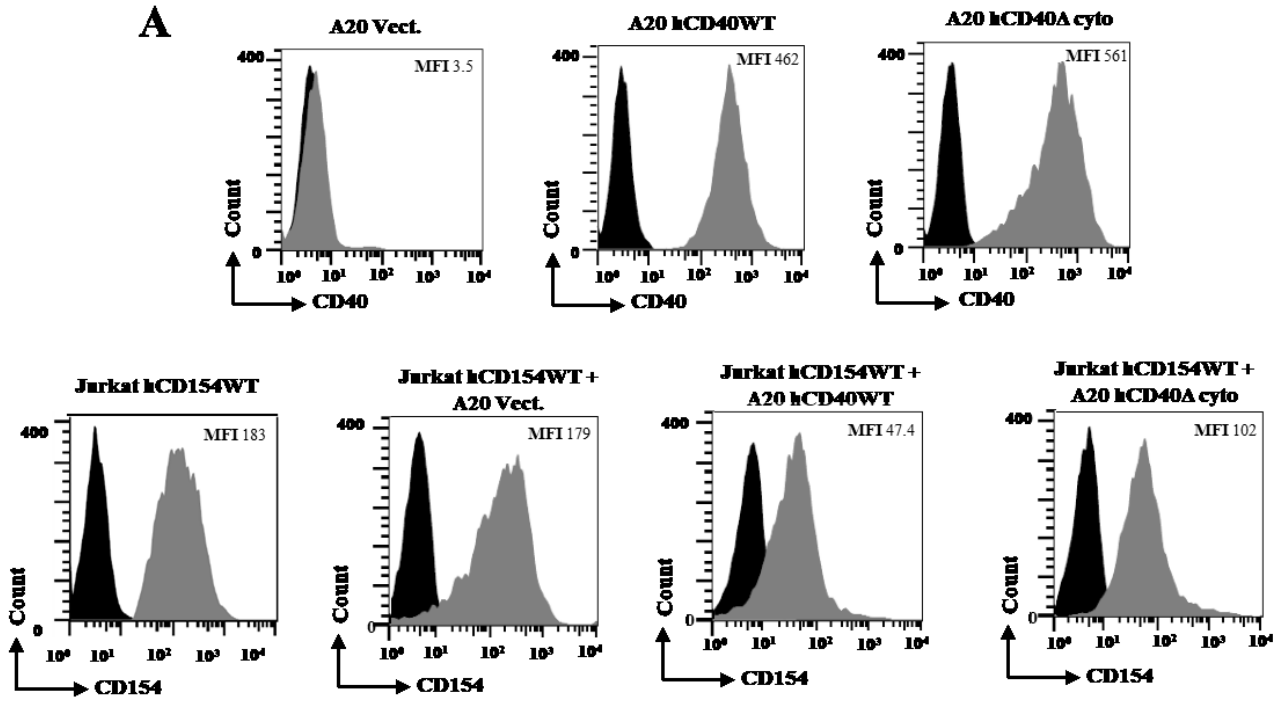


Figure 1.

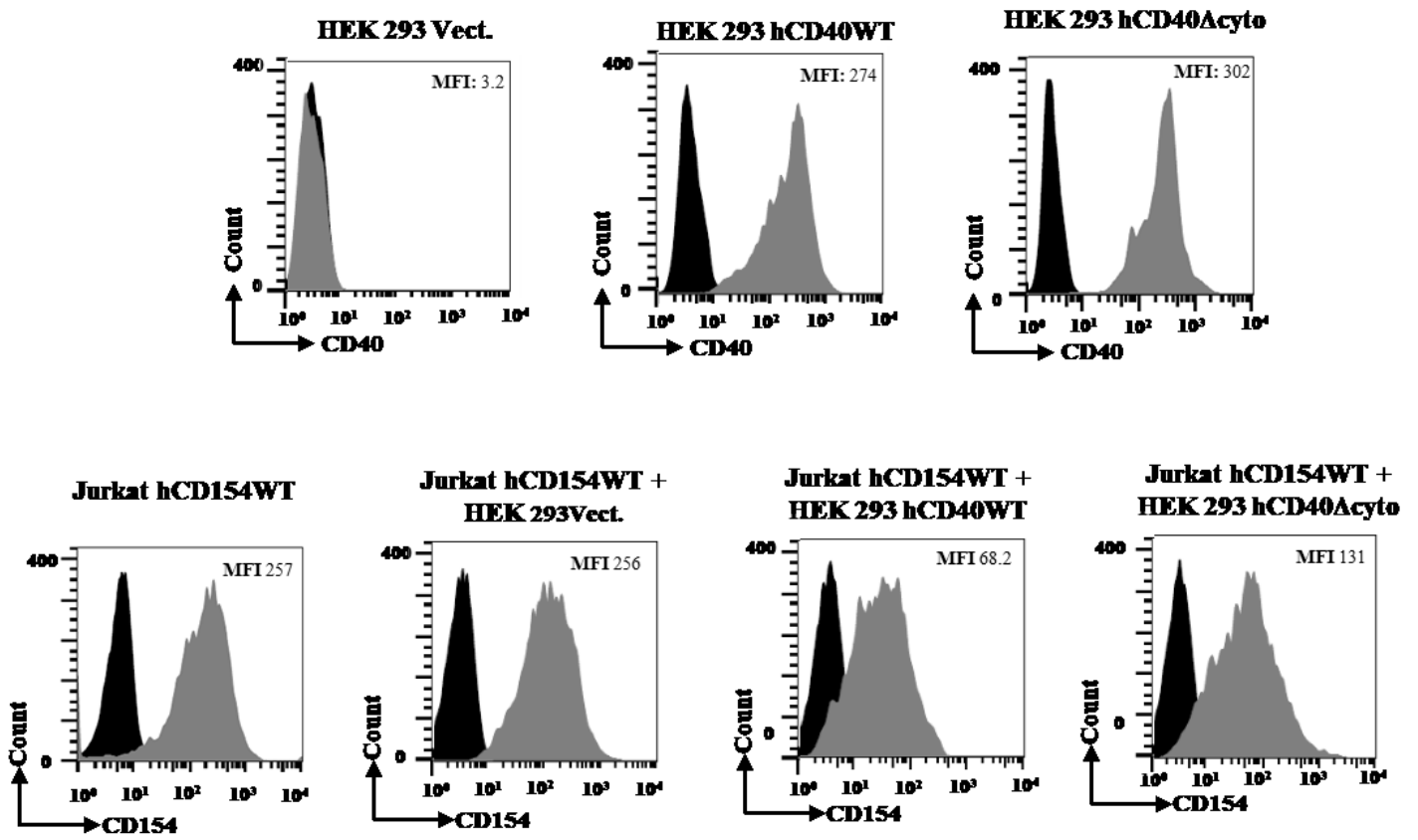


Figure 2.

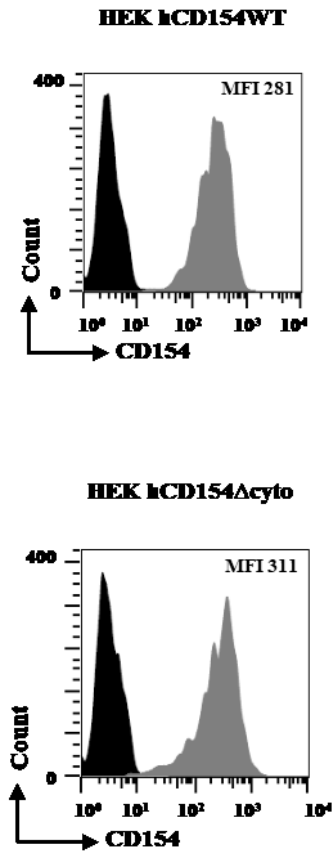
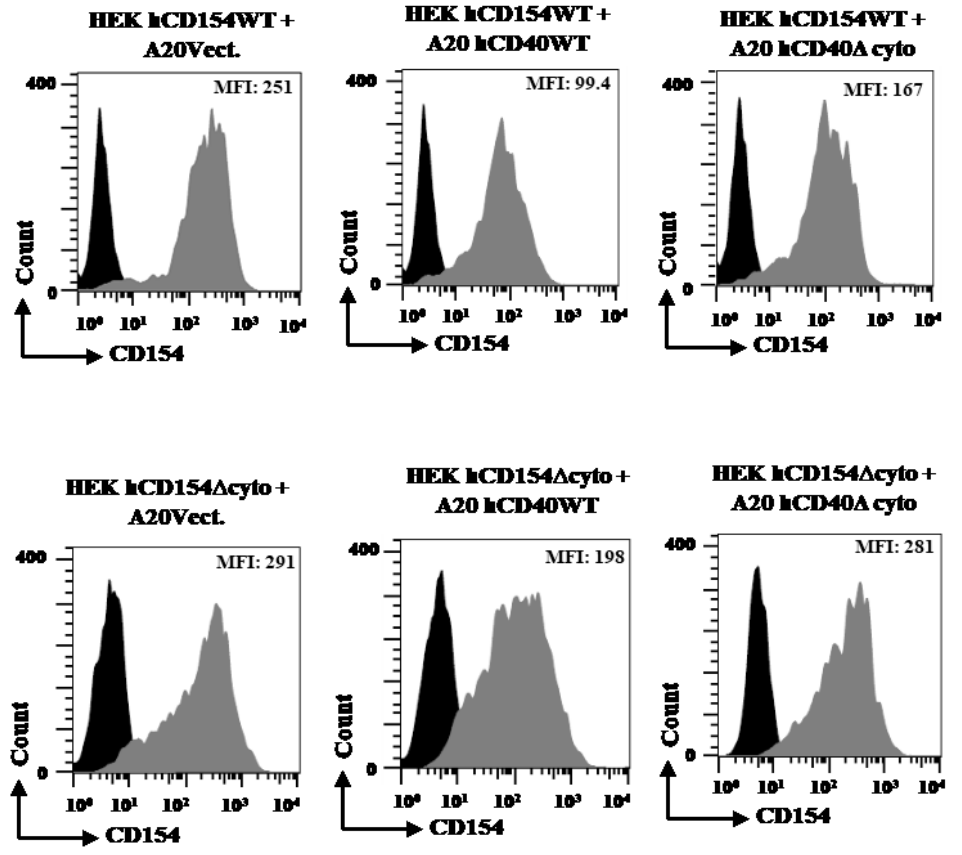
A**B**

Figure 3.

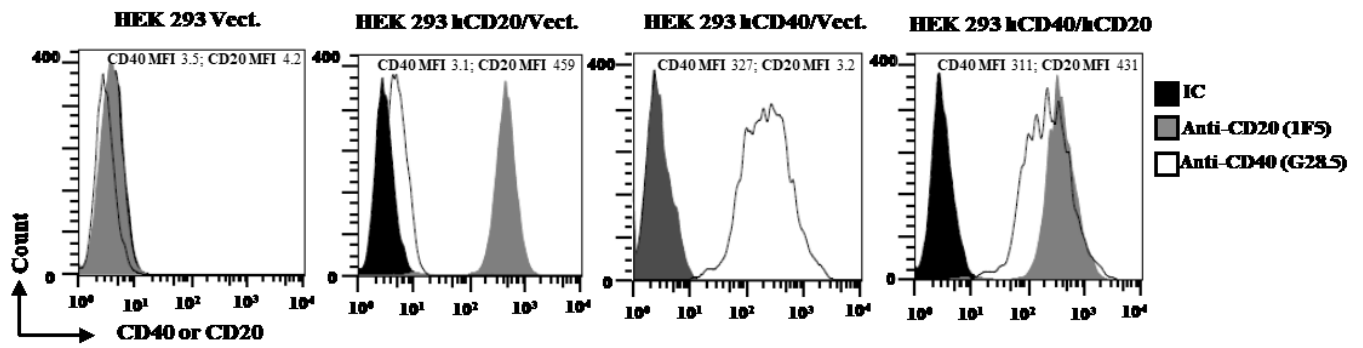
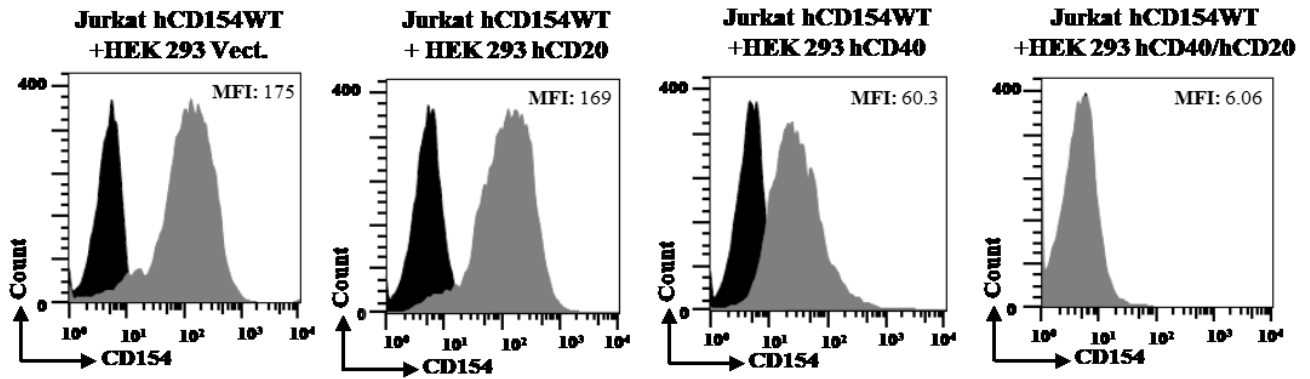
A**B**

Figure 4.

Chapitre 4. Le CD154 résistant au clivage augmente les réponses induites via le CD40 sans affecter la transduction du signal via le CD154

4.1 Mise en contexte

Nous avons démontré dans le chapitre 3 que le signal qui provient du CD40 est impliqué dans l'amplification du clivage du CD154 en sa forme soluble qui est le résultat d'un clivage enzymatique entre les résidus E112 et M113 due à l'activation des ADAM-10 et ADAM-17. Cette forme soluble du CD154 est retrouvée en circulation à une concentration très élevée dans le plasma des patients atteints de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires et elle est considérée aujourd'hui comme un marqueur de la progression de la maladie. Elle joue aussi un rôle dans le cancer, sa liaison au CD40 peut induire la survie des cellules tumorales, contrairement au CD154 membranaire qui induit la mort de ces cellules. Or, il a été démontré que les réponses immunitaires induites par le couple CD154/CD40 sont plus importantes lorsque ces deux molécules se trouvent exprimées à la surface cellulaire.

Pour éliminer le rôle néfaste du sCD154 et maintenir une interaction plus durable entre le CD154 et le CD40, l'objectif de cette étude vise à générer une forme CD154 résistante au clivage et évaluer l'impact physiologique de cette forme sur les réponses biologiques induites par le couple CD154/CD40.

4.2 Contribution des auteurs

Loubna Al-Zoobi : Planification et exécution des expériences qui portent sur l'étude du clivage du CD154 (figure 1) et de la liaison du CD40 au CD154 par cytométrie en flux (figure 3), sur l'étude de l'activation des voies de signalisation induites via le CD154 (figure 4), sur la mort (figure 5) et sur la prolifération cellulaire par cytométrie en flux (figure 6 et 7) et sur la production des immunoglobulines par le test d'ELISA (figure 8). Participation à la rédaction et la correction de l'article.

Suzanne Salti : Génération des différents mutants du CD154 et transfection des cellules HEK-293 avec les plasmides exprimant le CD154 mutés. Réalisation des expériences de la quantification du sCD154 dans le surnageant par le test d'ELISA (figure 1C). Rédaction de l'article.

Youssef Darif : Participation à la génération des différents mutants du CD154.

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

Walid Mourad : Direction générale.

4.3 Résumé

Le CD154 est une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*). L'interaction du CD154 avec son principal récepteur, le CD40, joue un rôle important dans les réponses immunitaires cellulaires et humorales, mais aussi elle est impliquée dans des maladies auto-immunes et inflammatoires. Le CD154 est principalement exprimé à la surface des plaquettes et des lymphocytes T activés. Cette molécule est clivée de la surface cellulaire, libérant une forme soluble (sCD154) biologiquement active. En effet, nous avons montré que le CD154 est clivé de la surface des lymphocytes T lors de son interaction avec le CD40 dans un mécanisme impliquant l'activation de métalloprotéinases ADAM-10 et ADAM-17. Dans le but de définir l'importance du CD154 maintenu à la surface cellulaire, nous avons généré un CD154 muté au niveau du site de clivage, E112 et M113 (CD154-EM). Nos résultats montrent que la liaison du CD40 au CD154-EM n'affecte pas le niveau d'expression de cette molécule ni la production du sCD154. Ces données indiquent que le CD154-EM est effectivement résistant au clivage induit par le CD40, sans perdre sa capacité de liaison au CD40 ni sa capacité d'induire l'activation des signaux intracellulaires via le CD154. En outre, nos données montrent que cette forme résistante induit une réponse apoptotique des cellules B plus importante que celle par le CD154-WT. De même, le CD154-EM induit une adhésion homotypique et une réponse proliférative plus prononcée, et une production accrue des immunoglobulines, IgM, IgG et IgA au niveau des cellules B. Par conséquent, l'inhibition du clivage du CD154 pourrait constituer une cible thérapeutique dans certaines conditions pathologiques où le sCD154 est impliqué.

CD154 resistant to cleavage enhances CD40-induced responses without affecting CD154 signaling

Loubna Al-Zoobi^{1§}, Suzanne Salti^{1§}, Youssef Darif¹, Ghada S. Hassan¹ and Walid Mourad^{1*}

Article en préparation.

¹Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada.

[§]These authors contributed equally to this work.

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

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

Abbreviations: TNF, tumor necrosis factor superfamily; sCD154, soluble CD154; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein.

Abstract

CD154 is a type II transmembrane protein belonging to the tumor necrosis factor family. The interaction of CD154 with its classical receptor CD40 plays an important role in humoral and cell-mediated immunities and was shown to be implicated in many immune and inflammatory disorders. CD154 is mainly expressed on the surface of activated platelets and T cells. It is cleaved from cell surface releasing a soluble form still capable of biological interaction. We have previously shown that CD154 cleavage from T cell surface is mediated by CD40 and involves the action of ADAM10 and ADAM17 enzymes. In the aim of defining the importance of CD154 maintained on cell surface, we generated a CD154 mutated at the sites of CD154 cleavage, E112 and M113, whereby these residues are both substituted by cysteine. Using HEK 293 cells transfected with the CD154-EM mutant or its wild-type counterpart, our data show that, without losing its capacity to interact with CD40 and to transduce itself the activation of MAPKs pathway, our CD154-EM mutant is resistant to CD40-mediated cleavage. Furthermore, we demonstrated that the cleavage-resistant CD154 mutant is capable of inducing a more prominent apoptotic response in susceptible B cell lines than the wild-type form of the molecule. In addition, human B cells treated with the CD154-EM mutant exhibited upregulated homotypic adhesion and proliferative responses compared to cells stimulated with CD154WT. In the same line of action, CD154-EM mutant triggered differentiation of human B cells, reflected by an increased Ig production, more significantly than CD154WT. Thus, our data strongly suggest that cleavage-resistant CD154 is a more prominent stimulant than the cleavable form of the molecule. Therefore, a maintained expression of CD154 on cell membrane and a disturbed cleavage of the molecule from cell surface could be a mechanism by which CD154 is involved in some pathological conditions and should be revisited.

Introduction

CD154, also known as CD40 ligand (CD40L), is a 33-39KDa type II transmembrane protein and member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. It was initially identified after the activation of T cells [1], but it is now evident that CD154 is expressed on various cells of the immune system such as activated platelets, basophils, mast cells and others [2]. CD154 also exists in a soluble 18 KDa form (sCD154) originating in part from an enzymatic cleavage of membrane-bound CD154 from T cell surface and from a direct release of an intracellular processing in a poorly understood mechanism [3]. Both soluble and membrane-bound forms of CD154 occur as non-covalently-linked homotrimers [4], a property conveying to CD154 its biological activity [5].

CD40, the classical receptor of CD154, is a type I glycoprotein belonging to the TNF receptor family [6]. CD40 is expressed by many immune and non-immune cells, including B cells, macrophages, dendritic cells, endothelial cells and fibroblasts. The CD154/CD40 interaction is critical for B cell survival and proliferation, Ig isotype switching, germinal center formation, memory cell generation and the production of numerous cytokines and chemokines [7]. Interestingly, engaging CD40 was reported to induce proliferative as well as apoptotic responses depending on the level of CD40 expression [8, 9]. CD154 was also shown to bind other receptors: α IIB β 3 [10], α 5 β 1 [11] and α M β 2 integrin [12]. The interaction of CD154 with α IIB β 3, an integrin specifically expressed on megakaryocyte and platelets, appears necessary for the stability of the arterial thrombus [13]. The CD154/ α 5 β 1 dyad was shown to promote cytokine release in asthmatic fibroblasts [14] and to enhance T cell survival, a critical aspect of T cell persistence during chronic inflammatory disease [15]. The interaction of CD154 with the α M β 2, an integrin mainly expressed on monocytes, macrophages and neutrophils, was demonstrated to play a role in the adhesion and migration of monocytes at the inflammatory site [12]. Thus, even though the CD154/CD40 dyad was the most studied, the interaction of CD154 with all its receptors was shown to be implicated in immune and inflammatory responses [16].

In this matter, not only CD154 was shown capable of inducing signaling via its various receptors, but also all CD154 receptors mentioned above were capable of triggering a signaling cascade via the CD154 molecule itself expressed on the surface of T cells [17]. While investigating this issue, our group has reported that among all CD154 receptors, only CD40 was

capable of inducing the cleavage of CD154 from T cell surface in a process mediated by the activation of membrane proteinases, namely the A disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 [18]. Previous studies have also shown that the release of CD154 from cell surface of platelets as well as T cells involves an interaction with CD40 inducing cleavage between glutamic acid 112 (E112) and methionine 113 (M113) of CD154 [18, 19]. In fact, many studies have been highlighted the increased level of sCD154 in the plasma of patients with atherosclerosis, acute coronary syndrome and autoimmune diseases, indicating that sCD154 can contribute to a variety of systemic inflammatory responses [20-22].

The membrane-bound form of CD154 was shown capable of inducing apoptosis of malignant cells while sCD154 induced a similar response only in the presence of inhibitors of the MAPKs cascade or of protein synthesis [23]. Thus, a CD154 molecule that is bound to cell surface seems more biologically efficient than a soluble form. In the same line of evidence, Elmetwali et al. have shown that a CD154 maintained on cell surface induces apoptosis of malignant urothelial cells in a TRAF3/JNK- and caspase-dependent mechanism [24] or by upregulating the Ras-associated factor 5 (NORE1A/RASSF5) and subsequently the gene suppressor p21, signals absent upon cell activation with the soluble form of CD154 [25]. Earlier studies by Pietravalle et al., were comparing a CD154 resistant to cleavage to a cleavable form of the molecule. Indeed, authors generated a cleavage-resistant CD154 mutant by deletion of 12 amino acids (aa) around the cleavage site. Their data demonstrated that both the uncleavable mutant and the wild-type (WT) forms of CD154 were capable of inducing similar patterns of B cell proliferation and IgE synthesis [26]. The disagreement between these data and others could be due to an altered conformation of their cleavage-resistant mutant due to its shortage of 12 aa as compared to the WT form and to an altered signaling induced via CD154 itself, affecting as such CD40 responses. Nevertheless, the physiological impact of membrane-bound CD154-induced B cell responses are still unclear.

In the aim of understanding the importance of the process of CD154 cleavage and the implications of its disturbance in some pathological conditions, we have generated a cleavage-resistant CD154 by a substitution/mutation of its residues E112 and M113 and assessed its biological activities in B cells. Here we show that the CD154 resistant to cleavage, who maintain the ability to induce signal via this molecule, induced a more pronounced cell death response in

CD40+ cells, a prominent B cell proliferation and an upregulated Igs production in comparison to a cleavable form of CD154.

Materials and Methods

Cells

HEK-293 cells (ATCC) were maintained in DMEM supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% L-glutamine, penicillin, and streptomycin (PSG, Life Technologies, GIBCO, Burlington, ON, Canada) The B-cell lymphoma cell line A20 and RAMOS from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), were maintained in RPMI 1640 containing 5% FBS (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) and 1% PSG (Life Technologies, GIBCO, Burlington, ON, Canada). A20 hCD40WT and A20 Vector were generated as described before [27].

Plasmids and mutagenesis

Human CD154-WT was generated previously in our laboratory by using the plasmid pCDNA4-TO-myc-HisA Zeocin (Invitrogen). Human CD154-EM and hCD154-R/Y were generated using the primers in table 1 and the QuickChange directed mutagenesis kit. HEK 293 cells, stably transfected with the CD154-WT, an empty vector and mutants, were generated by the method of calcium phosphate. The clones were then selected with a final concentration of 100 µg/mL of Zeocin (InvivoGen).

CD154 112-EM-113/112-CC-113	Forward 5'- GAG ACG AAG AAA GAA AAC AGCTTT TGC TGC CAA AAA GGT GAT CAG AAT CCT CAA -3' Reverse 5'- TTG AGG ATT CTG ATC ACCTTT TTG GCA GCA AAA GCT GTT TTC TTT CTT CGT CTC -3'
CD154 Y-145-A	Forward 5'- GAA AAA GGA GCC TAC ACC ATG -3' Reverse 5'- CAT GGT GTA GGC TCC TTT TTC -3'
CD154 R-203-A	Forward 5'- AGA TTC GAG GCA ATC TTA CTC -3' Reverse 5'- GAG TAA GAT TGC CTC GAA TCT -3'

Antibodies and Reagents

The monoclonal antibody C4.14 against human CD154 was produced in our laboratory as described previously (clone C4.14 does not interfere with the binding of CD154 with its receptors [28]). Anti-CD40 hybridoma G28.5 (IgG1) was obtained from ATCC. The isotype

controls anti-TSST-1 mAb2H8 (IgG1) and anti-SEA mAb-6E3 (IgG2b) were developed in our laboratory. Human soluble CD40+Fc (sCD40+Fc) was generated in our laboratory as described previously in 2010 [29]. Biotin-labelled C4.14 and sCD40+Fc were prepared using the method provided by Pierce (Rockford, IL, USA). Polyclonal antibodies raised against ERK1/2 (phosphorylated and total forms) were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) was purchased from sigma.

Cell stimulation for assessing CD154 cleavage

HEK CD154-transfected (1×10^6 /ml) were either co-cultured with A20 hCD40 WT or A20 Vector cells as a control (1×10^6 /ml) or stimulated with sCD40+Fc or hIgG (10 μ g/ml) for 1h at 37°C. CD154 cleavage was then measured by residual cell surface expression by FACS analysis and supernatants sCD154 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Cell stimulation for assessing intracellular signaling

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

Cell stimulation for assessing Cell death

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

Cytometric analysis

The expression of CD154 on HEK 293 cells transfected with human CD154-WT and mutant was examined with a biotin-conjugated C4.14 mAb for 30 min on ice, followed by Goat-antiMouse-Alexa488 (Invitrogen). To determine the ability of CD154 wild-type and mutants to bind sCD40+Fc, HEK 293 transfected cells were incubated with biotin-conjugated sCD40+Fc at different concentrations for 30 min on ice, followed by Streptavidin-Alexa488 (Invitrogen). The expression of CD40 on Ramos was evaluated with G28.5 mAb for 30 min on ice, followed by Goat-antiMouse-Alexa488. After washing with PBS 2% FBS, immunofluorescence intensity was detected using FACS-Calibur flow cytometry.

Quantification of sCD154 in cell supernatants

The concentration of sCD154 in the supernatant was measured by an ELISA as described in the datasheet (R&D, Minneapolis, USA).

B cell proliferation

CD154-B cell proliferation was assessed on B-cells from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples using a CFSE staining. Briefly, blood was withdrawn in acid/citrate/dextrose-anticoagulated tubes from donors who gave their written consent according to the guidelines established by the CR-CHUM ethical committee. PBMCs were obtained from Ficoll separation gradient (Wisent). B-cells were separated from PBMCs using the EasySep™

Human B Cell Isolation Kit (STEMCELL) by negative selection. The B-cells at a concentration of 1×10^6 cell/ml were then labeled with $1 \mu\text{M}$ of CFSE for 15 min then washed and incubated with HEK 293 hCD154 for 1, 2, 3 and 4 days. Cells were incubated at a ratio of 1:10, 20 000 HEK for 200 000 CFSE labeled B cells. B-cell proliferation was evaluated by FACS and by microscopy.

Testing Immunoglobulin production

For IgG, IgM and IgA production, B cells (2×10^5) isolated from PBMCs, as described before, were co-cultured with HEK 293 (2×10^4) transfected with hCD154 (WT, EM or R/Y) or with an empty vector as a control, in RPMI-1640 containing 10% FBS and 1% PSG. After 10 days, supernatants were harvest and assessed for their Igs content. Levels of Igs were measured as described in the datasheets of the ELISA kits provided from Thermo Fisher (USA).

Results

CD154-EM mutant maintains its ability to bind to CD40

CD154 exists in a membrane-bound and a soluble form, both being biologically active and capable of interacting with their principal receptor CD40 [19]. Soluble CD154 can be released from the intracellular compartment or from a membrane cleavage. This latter is a process mediated by CD40 and involves activation of ADAM10 and ADAM17 metalloproteinases cleaving CD154 between glutamic acid 112 (E112) and Methionine 113 (M113) thus releasing sCD154, an 18 KDa fragment [18]. In the aim of assessing the biological importance of a membrane-bound form of CD154 that is resistant to cleavage, we generated a CD154 mutated at its residues E112 and M113, the cleavage sites. We substituted E112 and M113 with cysteine residues generating a CD154-EM mutant. In the aim of characterizing the cleavage potential as well as the biological activity of this mutant compared to its wild-type counterpart, we transfected HEK 293 cells with CD154-EM, with CD154-WT, with CD154-R/Y (a CD154 mutated at R203 and Y145 and that lost its capacity to interact with CD40 [17]) or with empty vector, the latter two being used as negative controls. These transfected HEK 293 cells were sorted to express similar levels of CD154 on cell surface (Fig. 1A).

Before evaluating the biological activity of our CD154-EM mutant, we have to first confirm that this mutant maintains its ability to bind to CD40. For this reason, we assessed the capacity of a soluble dimer form of CD40, a sCD40+Fc, at different concentrations, to bind the CD154 mutants described above. As shown in Fig. 1B, sCD40+Fc is capable of binding to CD154WT-expressing cells as well as to cells transfected with CD154-EM in a similar fashion, suggesting that the CD154-EM mutant did not lose its capacity to bind CD40 and that the EM/CC mutation did not induce any conformational change in the CD154 molecule that would affect its binding to CD40. Cells transfected with the CD154-R/Y mutant were used as a negative control. Indeed, these cells did not bind to sCD40+Fc since their CD154 has lost its capacity to interact with CD40, as previously described [17]. Our positive control on the other hand was the CD154-WT. As shown in Fig. 1B, the CD154-EM can interact with the sCD40+Fc in a similar way than the CD154-WT compared to an abolished interaction with the CD154-R/Y.

CD154-EM mutant is resistant to cleavage from the cell membrane

In the next set of experiments, we evaluated the capacity of our CD154-EM mutant to be cleaved from the surface of transfected cells upon their stimulation with CD40. HEK 293 cells transfected with CD154-EM, with CD154-WT, with CD154-R/Y or with empty vector were stimulated with the soluble dimer form of CD40 (CD40+Fc) or hIgG as a control for 1h at 37°C. Transfected HEK 293 cells were analyzed for the level of CD154 expression on their surface before and after CD40 stimulation. As shown in Fig. 2, HEK 293 cells transfected with CD154-EM showed no decrease of their CD154 surface expression upon their stimulation with sCD40+Fc as compared to non-stimulated cells. On the other hand, CD154WT-expressing HEK cells showed a downregulation of their surface expression of CD154 when stimulated with sCD40+Fc. It is to note here that HEK 293 cells expressing CD154-R/Y on their surface did not show any alteration in their CD154 levels when cultured in the presence or absence of CD40 as the CD154-R/Y is not capable of interacting with CD40 [17] (Fig. 2).

To further confirm our data, in another set of experiments, transfected HEK 293 were co-cultured with A20 cells transfected with empty vector (A20 Vector) or A20 cells transfected

with CD40 (A20 hCD40 WT) for 1 hour at 37°C. Transfected HEK 293 cells were analyzed for the level of CD154 expression on their surface before and after CD40 stimulation. As shown in Fig. 3A, HEK 293 cells transfected with the CD154-EM did not exhibit any decrease in their surface expression of CD154 when co-cultured with A20 hCD40 WT cells as compared to when co-cultured with A20 Vector cells. On the other hand, CD154WT-transfected HEK cells showed, in the presence of CD40-expressing A20 cells, a lower level of CD154 expressed on cell surface as compared to when in the presence of A20 Vector cells. Also here, HEK 293 cells expressing CD154-R/Y maintained their CD154 levels on cell surface when cultured in the presence or absence of CD40 as the CD154-R/Y is not capable of interacting with CD40 [17] (Fig. 3A).

To confirm that the CD154-EM mutant is indeed resistant to CD40-mediated cleavage as shown in the flow cytometry experiments, supernatants of the above co-cultured cells were analyzed by ELISA (Fig. 3B). Results show that HEK 293 transfected with CD154-EM failed to shed sCD154 in their supernatants when cultured with A20 hCD40 WT cells. On the other hand, CD154WT-expressing HEK 293 cells released sCD154 in their supernatants upon their co-culturing with CD40-transfected A20 cells, 4x more than the CD154-EM cells. These data suggest that the EM/CC mutation abrogated the capacity of CD154 to be cleaved from cell surface upon its ligation to CD40. Again here, the CD154-R/Y-transfected HEK cells, used as a negative control, exhibited no release of sCD154 in their supernatant in the presence of CD40-expressing cells (Fig. 3B).

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

CD154-EM mutant maintains its ability to induce MAPKs activation

Having demonstrated that our CD154-EM mutant is resistant to cleavage while still capable of binding to CD40, we aimed next at evaluating the biological activity of this mutant. In the first set of experiments and given the ability of CD154 to act as a signal transducer molecule [29], we investigated the capacity of the CD154-EM to transduce a signal upon its interaction with

CD40. HEK 293 cells transfected with CD154-WT, with CD154-EM or with CD154-R/Y were stimulated with different concentrations of the sCD40+Fc or hIgG for 2 or 5min. As shown in Fig. 4, CD40 was capable of interacting with CD154WT and CD154-EM, inducing comparable levels of ERK phosphorylation in the respective transfected cells. However, CD154-R/Y-expressing HEK 293 cells failed to exhibit any response when stimulated with sCD40+Fc.

These results indicate that our CD154-EM mutant, shown to be resistant to CD40-mediated cleavage, is still capable of transducing intracellular signaling in CD154-positive cells upon its binding to CD40.

CD154-EM induces apoptosis in CD40 positive lymphoma B cells

In spite the fact that both the membrane-bound and the soluble forms of CD154 are biologically active, evidence exists demonstrating the higher potency of the CD154 expressed on cell surface as a stimulant [23]. Thus, having demonstrated the resistance of our CD154-EM mutant to cleavage and its increased persistence on cell surface, we aim here at assessing the biological importance of this CD154 mutant as a stimulant of CD40. As mentioned above, various studies have shown that CD40 plays a direct role in inducing the death and/or inhibiting the proliferation of tumor cells [30-33]. In this matter we have previously demonstrated that CD154 interacting with its receptor CD40 induces apoptosis in a variety of B cell lines [34], but mainly observed in Ramos B cells transformed with Epstein-Barr virus [35, 36]. Ramos cells, an immature line of B cells, respond to the cell death signal induced by CD154 via its CD40 receptor only when cells are pre-activated with PMA and thus overexpressing CD40 on their cell surface [36]. Thus, in the first set of experiments, we treated Ramos cells with PMA to upregulate their surface expression of CD40. Expression of CD40 on their surfaces was examined by flow cytometry (Fig. 5A). These cells were then co-cultured with HEK 293 hCD154-WT, hCD154-EM, hCD154-R/Y or Vector cells for another 24 hours. Ramos cells were then labeled with propidium iodide (PI) for cell death assessment by flow cytometry. As shown in Fig. 5B, PMA-pretreated Ramos B cells co-cultured with HEK 293 hCD154-EM were more susceptible to cell death compared to cells cultured with CD154WT-transfected HEK 293 cells. It is to note that

Ramos cells did not exhibit any significant cell death response when cultured in the presence of HEK 293 cells transfected with CD154-R/Y or with empty vector (Fig. 5B).

These data indicate that the cleavage-resistant CD154-EM mutant induces a more pronounced death response in CD40-positive cells as compared to the CD154WT cleavable form of the molecule.

CD154-EM induces important B cell homotypic adhesion

Homotypic adhesion of B cells is a process of critical importance in many developmental and functional aspects of these cells [37]. The interaction of CD154 with CD40 on B cell surface has been demonstrated to play a significant role in B cell homotypic adhesion [38, 39]. In our attempt to assess the biological importance of our cleavage-resistant CD154-EM mutant, we investigated its capacity to induce homotypic adhesion of B cells. We used B cells isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples of healthy donors. Human B cells were co-cultured with HEK 293 transfected with CD154WT, CD154-EM, CD154-R/Y or vector alone for different time periods (1, 2, 3 and 4 days) and assessed for homotypic adhesion. As shown by fluorescent microscopy analysis, B cells incubated with the HEK 293 hCD154-EM cells demonstrated a more pronounced homotypic adhesion than cells cultured with CD154WT-expressing HEK (Fig. 6). It is important to note here that B cells co-cultured with HEK 293 cells transfected with CD154-R/Y or vector alone, used as negative controls did not exhibit homotypic adhesion.

These data indicate that the cleavage-resistant CD154 upregulated the adhesion of B cells as compared to its cleavable counterpart.

CD154-EM induces prominent B cell proliferation

In the next set of experiments aiming at evaluating the biological importance of the CD154-EM mutant maintained on cell surface, we evaluated the role of this cleavage-resistant CD154 in B cell proliferation. For this purpose, we irradiated HEK 293 cells transfected with CD154-WT, CD154 mutants or empty vector and allowed them to adhere in a 96 well plate. Human B cells

isolated from PBMCs, were labeled with CFSE and co-cultured with the irradiated HEK 293 for different time periods (1, 2, 3 and 4 days). Cells were then collected and CFSE labeling was analyzed by flow cytometry. As shown in Fig.7, B cells proliferated after 3-4 days co-culture time and were identified by low CFSE staining. B cells incubated with HEK 293 hCD154-EM cells exhibited a more pronounced proliferation than those cultured with the CD154WT-transfected HEK 293 cells (Fig. 7). B cells co-cultured with the HEK 293-Vector or with HEK 293 hCD154-R/Y cells did not proliferate due to the absence of CD154 (HEK 293-Vector) or the abolished interaction with CD40 (HEK 293 hCD154-R/Y).

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

CD154-EM induces enhanced immunoglobulin production

Another biological response to be evaluated for the cleavage-resistant CD154 is its ability to induce cell differentiation and Ig production from CD40-positive B cells. HEK 293 cells transfected with CD154-WT, CD154 mutants or empty vector were irradiated and allowed to adhere in a 96-well flat bottom plate. Cells were co-cultured with primary B cells at a ratio of 1 HEK 293 for 10 B cells. Immunoglobulin production from B cells was measured in supernatants after 10 days of co-culture using ELISA Kits. Our data show that the levels of IgG, IgM and IgA produced were significantly higher in supernatants of B cells cultured with the cleavage-resistant form of CD154 (i.e. in the co-culture with HEK 293 hCD154-EM cells) than those cultured in the presence of CD154-WT (Fig. 8). Concentrations of the various Igs in supernatants of B cells co-cultured with HEK 293-Vector or HEK 293 hCD154-R/Y cells was insignificant as the interaction of CD154 with CD40 was absent in these co-cultures (Fig. 8).

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

Discussion

CD154, a transmembrane protein expressed on the surface of numerous cell types, more abundantly on activated platelets and T cells. As other members of the TNF family, CD154 is cleaved from cell surface into a soluble form (sCD154) by the action of membrane enzymes. In spite the fact that both the membrane-bound and the soluble forms of TNFs are biologically active, studies have shown distinctive mechanisms of action for each form, leading to different potencies or even to different responses as a whole. In order to investigate if CD154 maintained on cell surface would induce an altered response than a CD154 destined to be cleaved into a soluble form, we generated a cleavage-resistant CD154 by mutating its cleavage sites, namely the E112 and M113, and assessed its effect on various aspects of B cells as compared to its wild-type cleavable counterpart. Our study shows that the cleavage-resistant CD154 induces a more important cell death response in death-susceptible B cell lines, the Ramos cells, than does cleavable CD154. In addition, our cleavage-resistant CD154 is revealed a more important stimulant of homotypic adhesion, of proliferation as well as of Ig production in B cells than its wild-type cleavable counterpart. We should mention here that our mutation did not alter the ability of CD154 to interact with sCD40+Fc and to induce the activation of MAPKs pathway in CD154-positive cells.

In addition to its role as a ligand, CD154 also acts as a signal transduction molecule. Ligation of CD154 with specific monoclonal antibodies was shown to induce a variety of signaling pathways including PTK, JNK, p38, Rac-1, and p56lck activation [40-45]. Along the same line of evidence, we previously reported that, upon its binding to CD40, CD154 translocated to lipid raft domains and triggered activation of PKC α , PKC δ , p38 but not ERK1/2 activation [29, 46]. Such ability to transduce an intracellular signal was not influenced by the EM mutation of CD154 as both the wild type and the EM mutant exhibited similar ERK1/2 activation upon their interaction with sCD40+Fc. These data suggest that our cleavage-resistant mutant maintains its ability to act as a transduction molecule and to participate in the bidirectional signaling induced by CD154/CD40, an important process in immune/inflammatory conditions [16, 47].

Binding of CD40 to the membrane-bound CD154 leads to its cleavage at Methionine residue at position 113 [19]. Early studies by Graf et al, in 1995, identified the soluble CD154

as the 18 KDa molecule starting with M113, lacking the transmembrane and part of the extracellular regions, but still capable of interacting with CD40 [19]. Other studies have also demonstrated that CD154 is cleaved from cell surface into the soluble form [3, 48]. In the aim of generating a CD154 resistant to cleavage, we substituted the residues 112 Glutamic acid (E) and 113 Methionine (M), by directed mutagenesis, with two cysteine (Cys) in order to fortify the CD154 at this site with the disulfide bond mediated by the two-thiol group of each Cys. Such substitution is far from the residues implicated in the binding of CD154 with CD40, namely the Y145 and R203, previously described by our group [17]. Nevertheless, a given mutation could affect the tertiary structure of the molecule and thus change its conformation which might compromise its binding to CD40. Our results show that the CD154-EM mutant was still capable of binding to CD40-positive cells similarly to its wild type counter-part.

The release of soluble CD154 is increased in inflammatory and autoimmune conditions, such as systemic lupus erythematosus [22], rheumatoid arthritis, diabetes, hypertension, atherosclerosis and others [20, 49], as revealed by the elevated levels of sCD154 in the circulation of patients with these diseases. Therefore, it was crucial to determine the biological importance of sCD154 compared to that of the membrane-bound form of the molecule. Earlier studies evaluated sCD154 in the supernatant of T cells in culture. Human T cells activated with PMA and ionomycin or even with superantigens in the presence of CD40, released sCD154 of 18 KDa [19, 48]. Authors suggested that such sCD154 was preformed inside the cell by an intracellular cleavage of the full length CD154 and then released to the outside milieu, based on their metabolic labelling data and the fact that inhibiting proteases on cell surface did not alter levels of sCD154 in cell supernatants. It is worth noting here that more recent studies by our group and others, further investigated the process of sCD154 release and highlighted that such process is also due, at least partially, to the cleavage of CD154 from cell surface via the activation of membrane enzymes, namely ADAM10 and ADAM17 metalloproteinases [18, 50]. This form of CD154 was shown to have less binding affinity to CD40 than the membrane-bound CD154 [19, 48] but maintained its biological activity such as downregulating CD40 expression on the surface of dendritic cells and inducing their survival [48]. However, more recent studies reported a differential signaling potential between membrane-bound and sCD154 leading to different responses induced by each form. Indeed, membrane-bound CD154 was shown capable

of inducing apoptosis of CD40-positive malignant urothelial cells [51] by upregulating TRAF-3 and the downstream activation of JNK/AP-1 and the apoptotic cascade including caspases 3 and 9 [52]. The soluble form of CD154, on the other hand, could halt the growth of urothelial cells of normal or malignant phenotype but induce their cell death only in the presence of other TNF members or upon inhibition of their protein synthesis, respectively [51]. Further studies in this area of interest by Georgopoulos et al. outlined more mechanistic steps in the apoptotic role of membrane-bound CD154 as compared to sCD154. Indeed, co-culturing CD154-transfected fibroblasts with CD40-positive malignant urothelial cells stabilized TRAF3 leading to the upregulation of p40phox, a component of NADPH oxidase-2 (Nox-2) and thus ROS generation, a process which via AKT1 and MKK4-dependent pathways will ultimately lead to apoptosis [52, 53]. Taken together, these studies outline the greater potency of membrane-bound CD154 as an inducer of death in cancerous cells as compared to the soluble form of CD154.

Moreover, Elmetwali et al., mainly comparing membrane-bound CD154 to the soluble form of the molecule, confirmed that a CD154 maintained on cell surface induces apoptosis of malignant urothelial cells by upregulating TRAF3 and the downstream activation of JNK signaling leading to the release of mitochondrial cytochrome c and activation of caspases 9, caspase 3/7 as well as caspase 8. Their results also showed that the apoptotic effect of membrane-bound CD154 involved the downregulation of TRAF6 and thus inhibition of the PI3K/Akt survival signals [24]. More recently, these authors outlined that independently of its effect on JNK activation, membrane-bound CD154 could also induce cell death responses in cancerous cells by upregulating the Ras-associated factor 5 (NORE1A/RASSF5) and subsequently the gene suppressor p21, signals absent upon cell activation with the soluble form of CD154 [25].

However, little is known as to the effect of the membrane-bound uncleavable form of CD154 as compared to its cleavable form. This area of interest would highlight the importance of maintaining CD154 on cell surface, a process probably existing in some immunoinflammatory conditions characterized by an increased activity of CD154. On the other hand, keeping CD154 on the membrane could be a target for therapeutic strategies aiming at augmenting the immune-inflammatory responses mediated by CD154, for instance in immunotherapeutic approaches. Our study investigated responses mediated by membrane-

bound CD154 in its uncleavable versus its cleavable form. With respect to CD154-mediated apoptosis, our cleavage-resistant CD154 mutant induced a more important cell death response in susceptible B cell lines as compared to the wild-type cleavable membrane-bound CD154. Our cleavage-resistant form of CD154 could be beneficial in stimulating immune cell responses against tumors and reduce the adverse inflammatory effects caused by sCD154.

With respect to CD154-mediated proliferative responses, our data also show that a cleavage-resistant CD154 is a stronger stimulant of B cells proliferation as compared to the cleavable form of the molecule. In this matter, previous studies have also compared membrane-bound CD154 to the soluble form of CD154. Depending on the level of CD40 expression on cell surface, the stimulation with CD154 could have a distinct path with respect to proliferative responses. Indeed, a low-grade expression of CD40 has been associated with cell proliferation while a high expression level of the receptor has been linked to apoptosis, as might be the case with the apoptosis data from our lab and others described above. Naïve B cells stimulated with cells expressing CD154 on their surface were shown to expand and proliferate, in a src-dependent mechanism activating downstream the Ras/ERK and PI-3K pathways [54, 55]. Soluble CD40 ligands have also been shown to induce B cell proliferation implicating NFκB, p38, MAPK ½ and PI-3K activation [56, 57]. In a study comparing both forms of CD154, and even though focusing on proving the biological activity of sCD154, authors have shown that such form of CD154 exhibit less proliferative capacities toward B cells as compared to CD154 expressed on the surface of COS-7 cells [4]. On the other hand, and in the aim of determining the biological importance of CD154 cleavage and the release of a soluble form of the molecule, Pietravallo et al. created a mutation at the level of the cleavage site of CD154 implicating 12 aa around this point. Authors argued that the cleavage of CD154 from cell surface is not a prerequisite for its proliferative and activating functions toward B cells, and that the uncleavable and cleavable forms CD154 share the same pattern of B cell responses [26]. Their disagreement with our data could be due to the fact that their mutant, missing 12 aa, could have an altered conformation affecting its biological response. In addition, as we discussed above, our CD154-EM resistant to cleavage maintained its ability to transduce an intracellular signal, namely the activation of MAPKs, a property probably missing for Pietravallo's mutant.

The CD154/CD40 dyad induces the expression of activation markers as well as adhesion molecules on the surface of B cells [58]. Indeed, the CD154/CD40 dyad has been shown to be implicated in homotypic adhesion of B cells [38, 39] a process of critical importance in many developmental and functional aspects of these cells [37]. Our data here show that maintaining CD154 on cell surface provided a stronger signal for B cells as compared to a cleavable form of CD154, inducing an upregulated adhesion. In the same line of evidence, Masuta et al., have demonstrated that B cells transfected with a form of CD154 maintained on cell surface exhibited comparable levels of the adhesion marker, CD54 as well as the activation markers, CD80, CD83, than cells expressing a cleavable form of the molecule [59]. More recent studies using the same membrane-stable CD154 mutant showed that its transfection into the CD40-positive lung adenocarcinoma cell line, A549 induced similar levels of apoptosis and growth arrest of these cells as well as of their co-activation of dendritic cells as did the transfection with the WT form of the molecule [60]. An important point to mention here is that this cleavage-resistant CD154 generated by Masuta et al., did not involve a mutation at its E112-M113 residues, known to be implicated in the cleavage of process, probably explaining the disagreement between these data and ours. Another point underlying the discrepancy between the above results and those obtained in our study herein, could be due to differences in the adhesion markers and the apoptotic responses of malignant versus normal naïve B cells or between malignant cells themselves depending on their origin.

The CD154 interaction with the CD40 expressed on B cells induce Igs class switching [61], and disruption of the CD154/CD40, prevents B cells from undergoing isotype switching. Our cleavage-resistant CD154 mutant, CD154-EM induced a more pronounced production of IgG, IgA and IgM in B cells than the wild-type cleavable form of CD154.

In conclusion, the inhibition of CD154 cleavage from cell surface induces an increase in the efficacy and the biological activity of the molecule. Indeed, the cleavage-resistant molecule was able to induce a more important apoptotic response in CD40-positive lymphoma B cells and a more prominent homotypic adhesion and proliferation of human B cells together with an enhancement of their immunoglobulin production than did the native form of CD154. This study will allow the development of novel tools to treat diseases in which CD154 is implicated.

Acknowledgements

This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke foundation of Canada.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. van Kooten, C. and J. Banchereau, CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 2000. 67(1): p. 2-17.
2. Schonbeck, U. and P. Libby, The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, 2001. 58(1): p. 4-43.
3. Pietravalle, F., et al., Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem*, 1996. 271(11): p. 5965-7.
4. Mazzei, G.J., et al., Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem*, 1995. 270(13): p. 7025-8.
5. Anand, S.X., et al., Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost*, 2003. 90(3): p. 377-84.
6. Bishop, G.A., et al., TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol*, 2007. 597: p. 131-51.
7. Foy, T., et al., Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14: p. 591-617.
8. Challa, A., et al., Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells. *Blood*, 2002. 99(9): p. 3411-8.
9. Baxendale, A.J., et al., Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene*, 2005. 24(53): p. 7913-23.
10. Andre, P., et al., CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med*, 2002. 8(3): p. 247-52.
11. Leveille, C., et al., CD40 Ligand Binds to $\alpha 5\beta 1$ Integrin and Triggers Cell Signaling. *J. Biol. Chem.*, 2007. 282(8): p. 5143-5151.

12. Zirlik, A., et al., CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*, 2007. 115(12): p. 1571-80.
13. Prasad, K.S., et al., Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(21): p. 12367-71. Epub 2003 Sep 30.
14. Loubaki, L., et al., Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction. *Mol Immunol*, 2010. 47(11-12): p. 2112-8.
15. Bachsais M, N.N., Yacoub D, Salti S, Alaaeddine N, Aoudjit F, Hassan GS, Mourad W, The Interaction of CD154 with the $\alpha 5\beta 1$ Integrin Inhibits Fas-Induced T Cell Death. *PLoS One*, 2016. 11(7): p.175-183.
16. Hassan, G.S., Y. Merhi, and W. Mourad, CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology*, 2011. 217(5): p. 521-532.
17. 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.
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. 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.
20. Tamura, N., et al., Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. *J Rheumatol*, 2001. 28(12): p. 2583-90.
21. Heeschen, C., et al., Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2003. 348(12): p. 1104-11.
22. Kato, K., et al., The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1999. 104(7): p. 947-55.
23. Elmetwali, T., et al., CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus. *Mol Cancer*, 2010. 9: p. 52.
24. 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.

25. Elmetwali, T., A. Salman, and D.H. Palmer, NORE1A induction by membrane-bound CD40L (mCD40L) contributes to CD40L-induced cell death and G1 growth arrest in p21-mediated mechanism. *Cell Death Dis*, 2016. 7: p. e2146.

26. Pietravalle, F., et al., Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation. *Eur J Immunol*, 1996. 26(3): p. 725-8.

27. Nadiri, A., et al., CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events. *Eur J Immunol*, 2011. 41(8): p. 2358-67.

28. El Fakhry, Y., et al., Functional Interaction of CD154 Protein with alpha5beta1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to alphaIIb beta3 Integrin and CD40 Molecules. *J Biol Chem*, 2012. 287(22): p. 18055-66.

29. El Fakhry, Y., et al., Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling. *Eur J Immunol*, 2010. 40(3): p. 770-9.

30. Funakoshi, S., et al., Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood*, 1994. 83(10): p. 2787-94.

31. Marches, R., et al., Tumour dormancy and cell signalling--III: Role of hypercrosslinking of IgM and CD40 on the induction of cell cycle arrest and apoptosis in B lymphoma cells. *Ther Immunol*, 1995. 2(3): p. 125-36.

32. 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.

33. Hirano, A., Longo, D. L., Taub, D. D., Ferris, D. K., Young, L. S., Eliopoulos, A. G., Agathangelou, A., Cullen, N., Macartney, J., Fanslow, W. C., Murphy, W. J., Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand. *Blood*, 1999. 93: p. 2999-3007.

34. Jundi, M., et al., CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment. *Immunobiology*, 2011.

35. 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.

36. Al-Zoobi, L., et al., Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface. *Int Immunol*, 2014. 16(8): p.451-465.
37. Severinson, E. and L. Westerberg, Regulation of adhesion and motility in B lymphocytes. *Scand J Immunol*, 2003. 58(2): p. 139-44.
38. 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.
39. Pound, J.D., et al., Minimal cross-linking and epitope requirements for CD40-dependent suppression of apoptosis contrast with those for promotion of the cell cycle and homotypic adhesions in human B cells. *Int Immunol*, 1999. 11(1): p. 11-20.
40. Cayabyab, M., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*, 1994. 152(4): p. 1523-31.
41. Blotta, M.H., et al., Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J Immunol*, 1996. 156(9): p. 3133-40.
42. Brenner, B., et al., The CD40 ligand directly activates T-lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 239(1): p. 11-7.
43. Brenner, B., et al., Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a signalling molecule in T-lymphocytes. *FEBS Lett*, 1997. 417: p. 301-6.
44. Koppenhoefer, U., et al., The CD40-ligand stimulates T-lymphocytes via the neutral sphingomyelinase: a novel function of the CD40-ligand as signalling molecule. *FEBS Lett*, 1997. 414(2): p. 444-8.
45. Blair, P.J., et al., CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med*, 2000. 191(4): p. 651-60.
46. 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.
47. 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.

48. Ludewig, B., et al., Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ T cells with dendritic cells. *Eur J Immunol*, 1996. 26(12): p. 3137-43.
49. Vakkalanka, R.K., et al., Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(5): p. 871-81.
50. Matthies, K.M., et al., Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells. *Cell Immunol*, 2006. 241(1): p. 47-58.
51. Bugajska, U., et al., The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(18): p. 1381-95.
52. Georgopoulos, N.T., et al., A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ*, 2006. 13(10): p. 1789-801.
53. Dunnill, C.J., et al., A redox state-dictated signalling pathway deciphers the malignant cell specificity of CD40-mediated apoptosis. *Oncogene*, 2017. 36(18): p. 2515-2528.
54. Fecteau, J.F. and S. Neron, CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*, 2003. 171(9): p. 4621-9.
55. Neron, S., et al., B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase. *Int Immunol*, 2006. 18(2): p. 375-87.
56. Dadgostar, H., et al., Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(3): p. 1497-502.
57. Zarnegar, B., et al., Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF-kappaB activation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(21): p. 8108-13.
58. in *Life and breath: respiratory disease in Canada*. 2007, Ottawa: Ontario.
59. Masuta, Y., et al., Gene transfer of noncleavable cell surface mutants of human CD154 induces the immune response and diminishes systemic inflammatory reactions. *J Immunother*, 2007. 30(7): p. 694-704.
60. Xu, W., et al., Anti-tumor activity of gene transfer of the membrane-stable CD40L mutant into lung cancer cells. *Int J Oncol*, 2010. 37(4): p. 935-41.
61. Banchereau, J., et al., The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 881-922.

Figure Legends

Figure 1: CD154-EM maintains its ability to interact with the CD40. (A) HEK 293 cells were transfected with hCD154-WT, hCD154-EM, CD154-R/Y or with an empty vector and sorted, using an anti-CD154 Ab, C4.14 to express the same level of CD154. (B) Sorted cells were incubated with different concentrations of soluble CD40+Fc (sCD40+Fc) and assessed for their ability to bind with the CD40 by FACS.

Figure 2: CD154-EM is resistant to cleavage from the cell membrane upon its stimulation with soluble CD40. HEK 293 stably transfected with CD154-WT, CD154-EM or CD154-R/Y were stimulated with the soluble dimer form of the CD40 (sCD40+Fc) or hIgG as a negative control for 1h at 37°C. Cells were then washed and incubated with mAbs C4.14 for 30min at 4°C followed by the Goat-anti mouse-Alexa 488 for another 30min. The expression of CD154 on cell surface was analyzed by FACS.

Figure 3: CD154-EM is resistant to cleavage from the cell membrane upon its stimulation with membrane-bound CD40. HEK 293 stably transfected with CD154-WT, CD154-EM or CD154-R/Y were co-cultured with A20 hCD40 WT or A20 Vector as a control for 1 hours at 37°C. (A) Cells were recuperated, washed and incubated with mAbs C4.14 for 30min at 4°C followed by the Goat-anti mouse-Alexa 488. The expression of CD154 on cell surface was analyzed by FACS. (B) Supernatants of co-cultures was assessed by ELISA to quantify the concentration of sCD154.

Figure 4: CD154-EM induces MAPKs activation in a comparable way to CD154-WT. Transfected HEK cells were stimulated with different concentrations of the sCD40+Fc, hIgG for 2 or 5min, and reactions were terminated by addition of 2X Laemmli sample buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Samples were then analyzed by western blot for ERK1/2 activation using phospho-specific Abs. Blots were stripped and reprobed with antibodies against total ERK1/2. Blots shown are representative of 3 independent experiments.

Figure 5: CD154-EM induces apoptosis in CD40-positive lymphoma B Cells. A) Ramos stimulated or not with PMA, were incubated with mAbs G28.5 for 30min at 4°C followed by the Goat-anti mouse-Alexa 488. CD40 expression was analyzed by FACS. B) HEK 293 stably

transfected with CD154-WT, CD154-EM, CD154-R/Y or vector alone (the last two are used as negative controls) were incubated with PMA-pretreated Ramos cells for 24 hours at 37°C. Ramos cell death response was assessed by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining.

Figure 6: CD154-EM induces B cell homotypic adhesion. B cells isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples were co-cultured with HEK 293 transfected with CD154-WT, CD154-EM, CD154-R/Y or vector alone (the last two are used as negative controls) for different periods of time (1, 2, 3 and 4 days) and assessed for homotypic adhesion by fluorescent microscopy images.

Figure 7: CD154-EM induces prominent B cell proliferation as evaluated by CFSE staining. (A) B cells from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples were labeled with CFSE and co-cultured with HEK 293 transfected with CD154-WT, CD154-EM, CD154-R/Y or vector alone (the last two are used as negative controls) for different periods of time (1, 2, 3 and 4 days) and assessed for proliferation by CFSE staining using FACS analysis.

Figure 8: CD154-EM induces prominent Ig production. B cells from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples were purified and co-cultured with HEK 293 transfected with CD154-WT, CD154-EM, CD154-R/Y or vector alone (the last two are used as negative controls) for 10 days and levels of Igs were measured by ELISA.

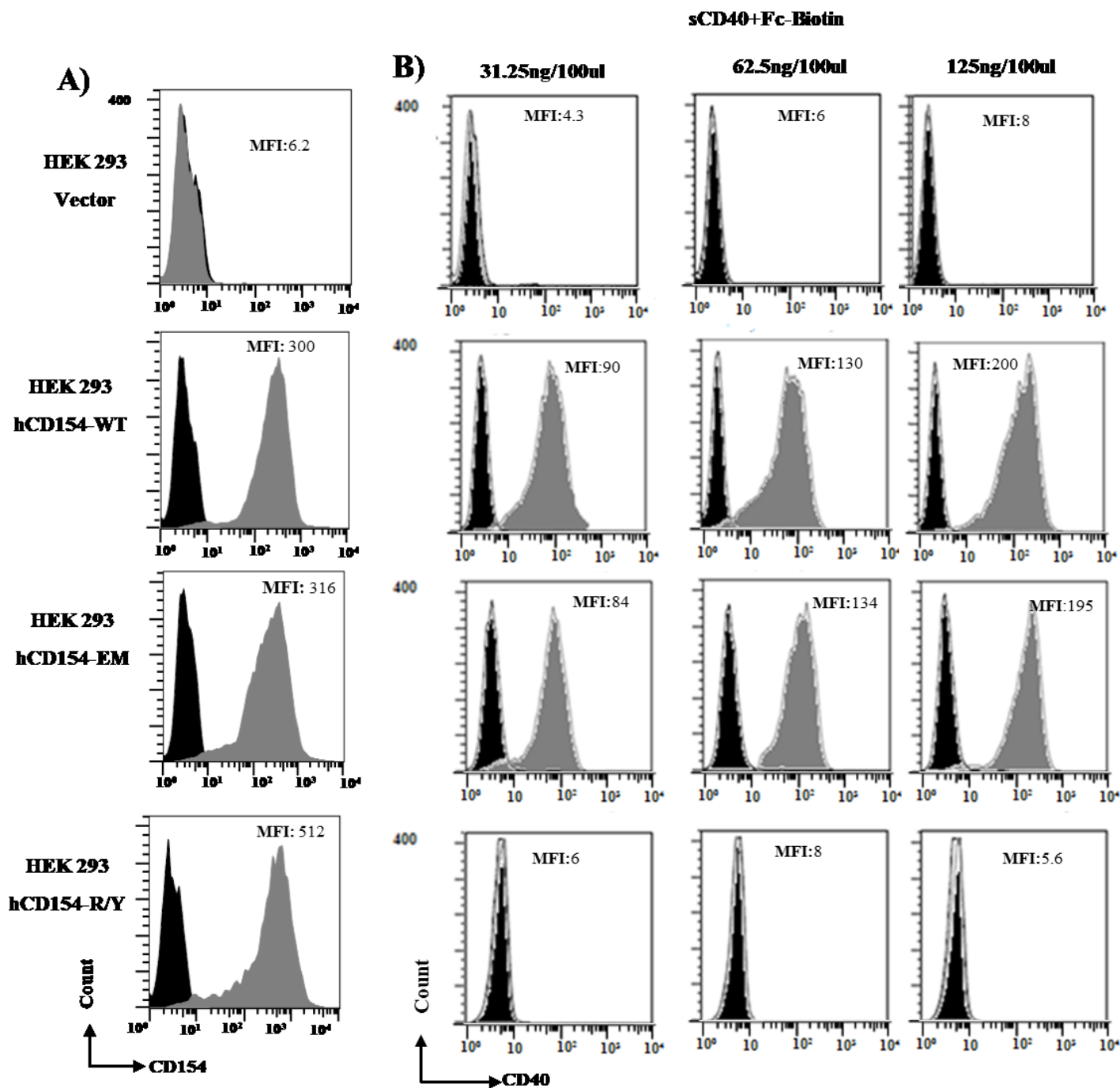


Figure 1.

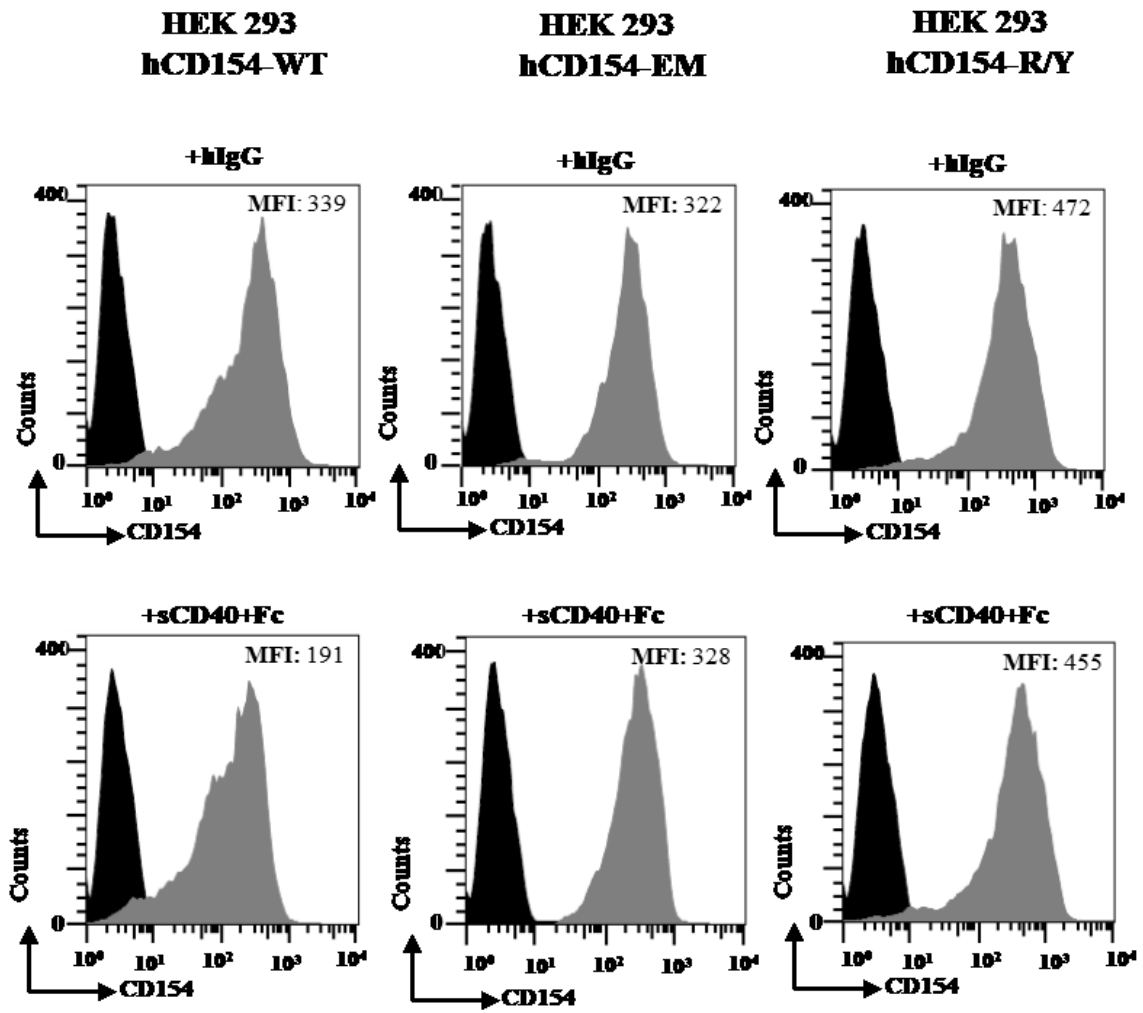


Figure 2.

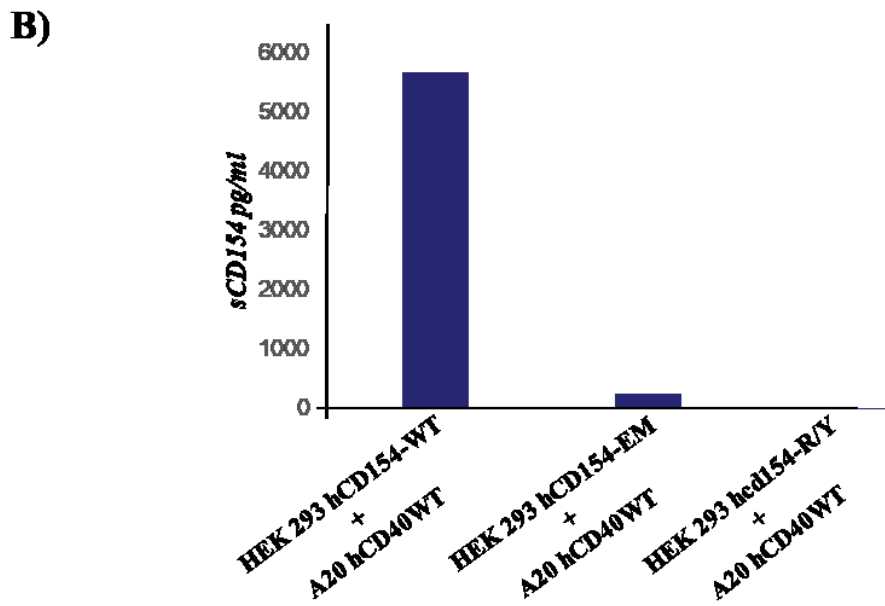
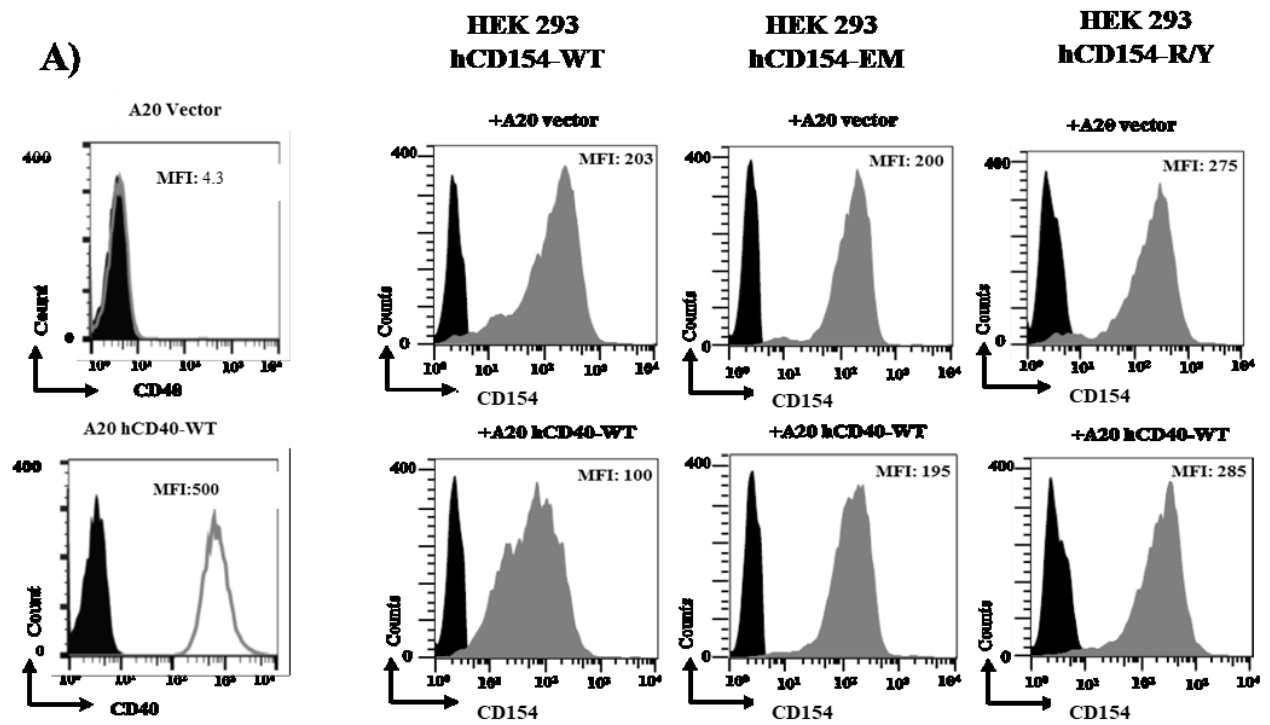
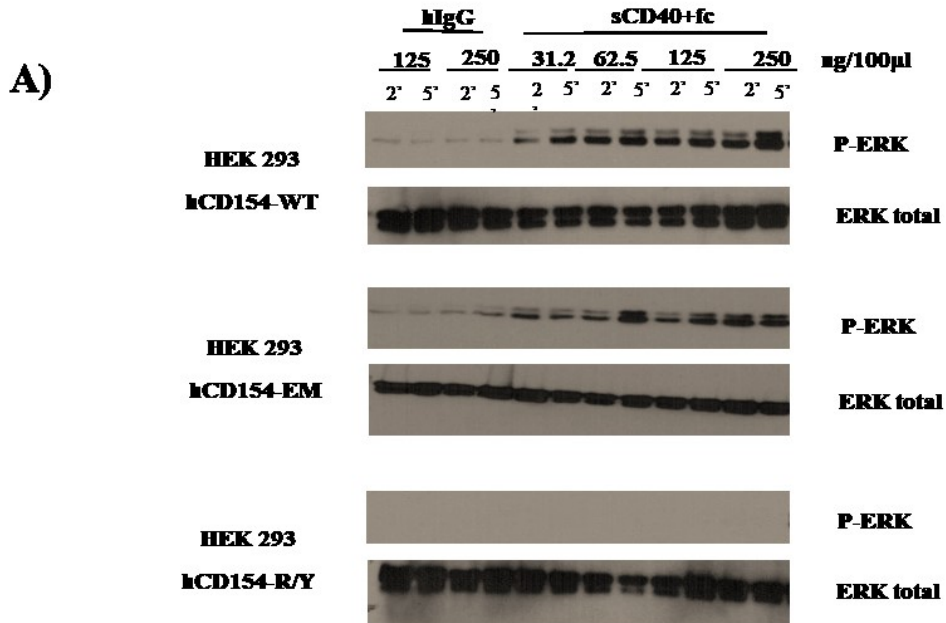


Figure 3.



B)

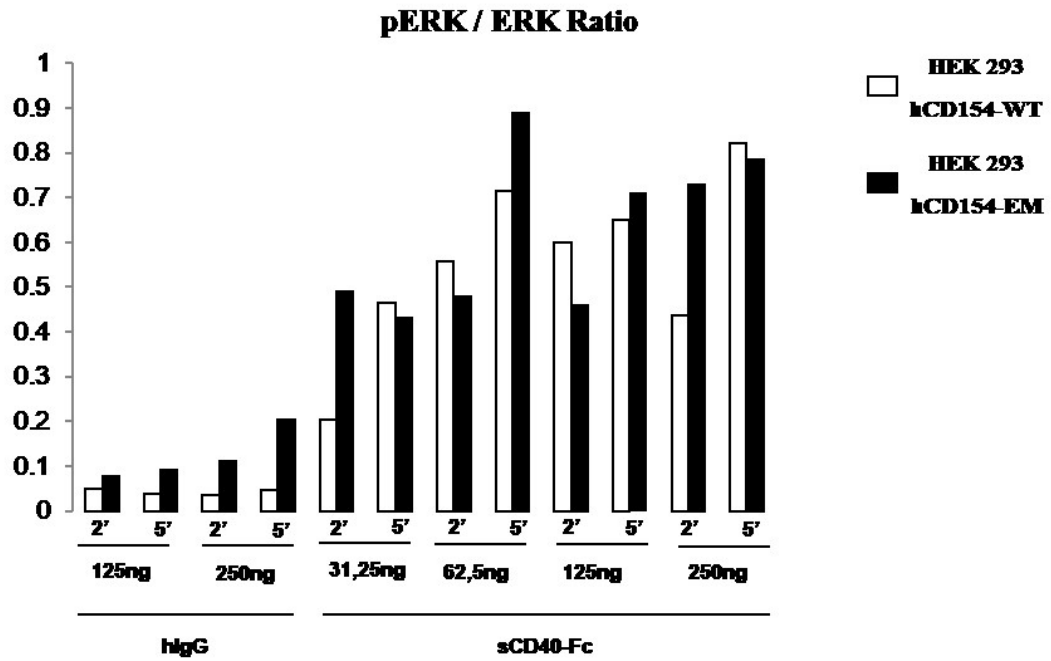
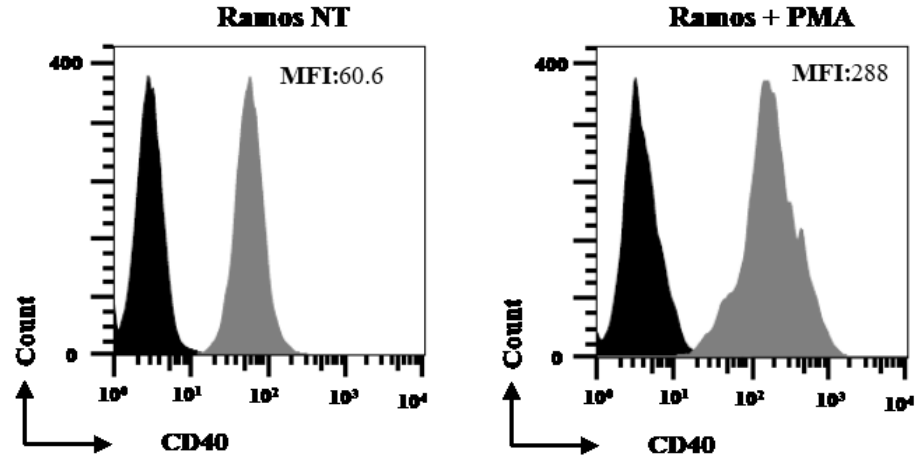


Figure 4.

A)



B)

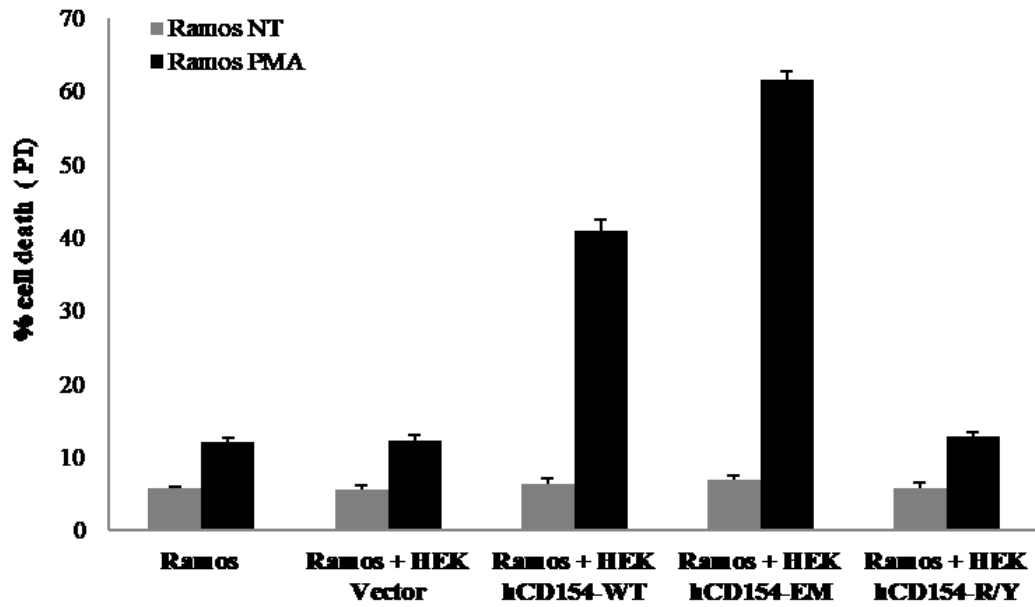


Figure 5.

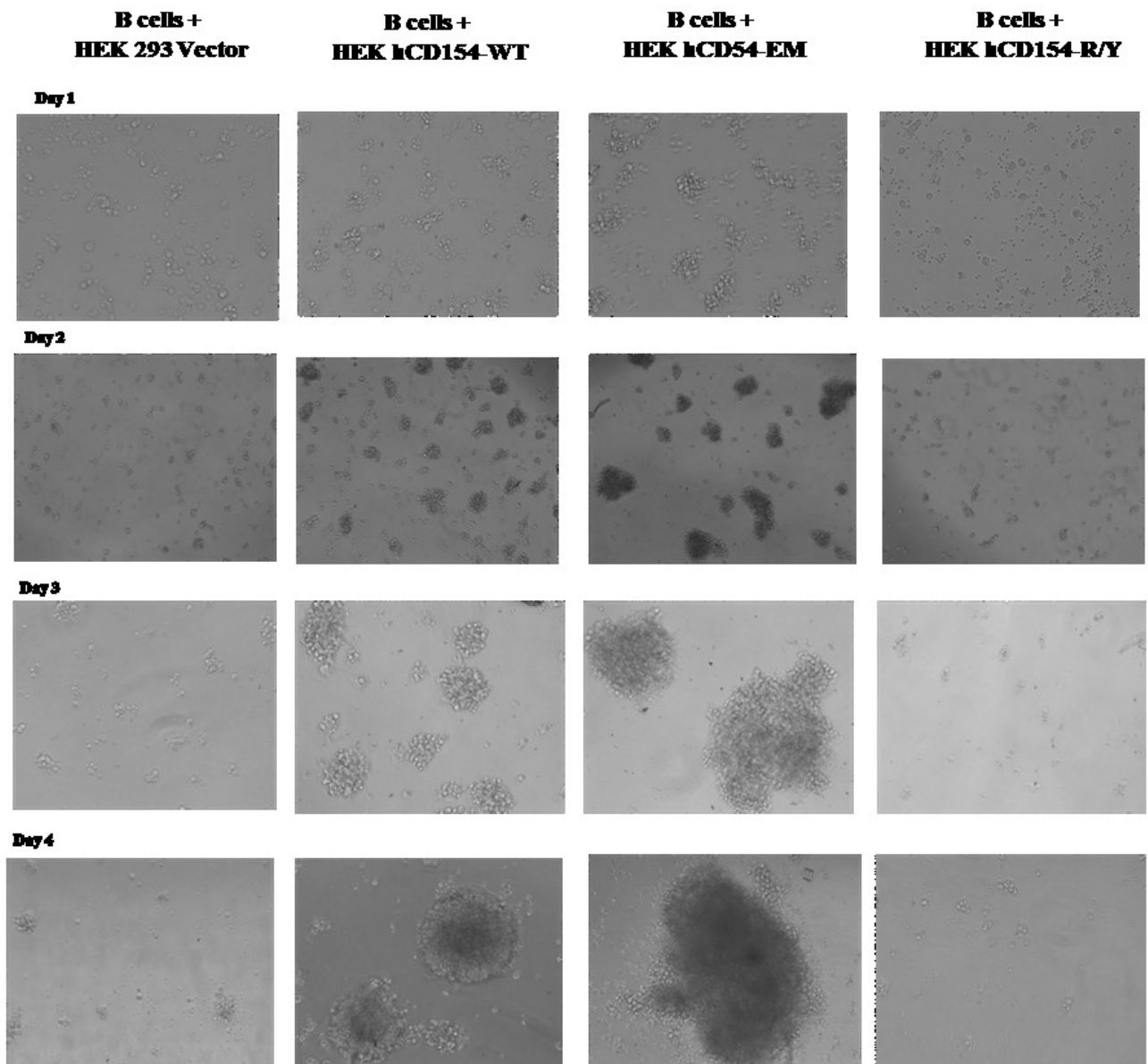


Figure 6.

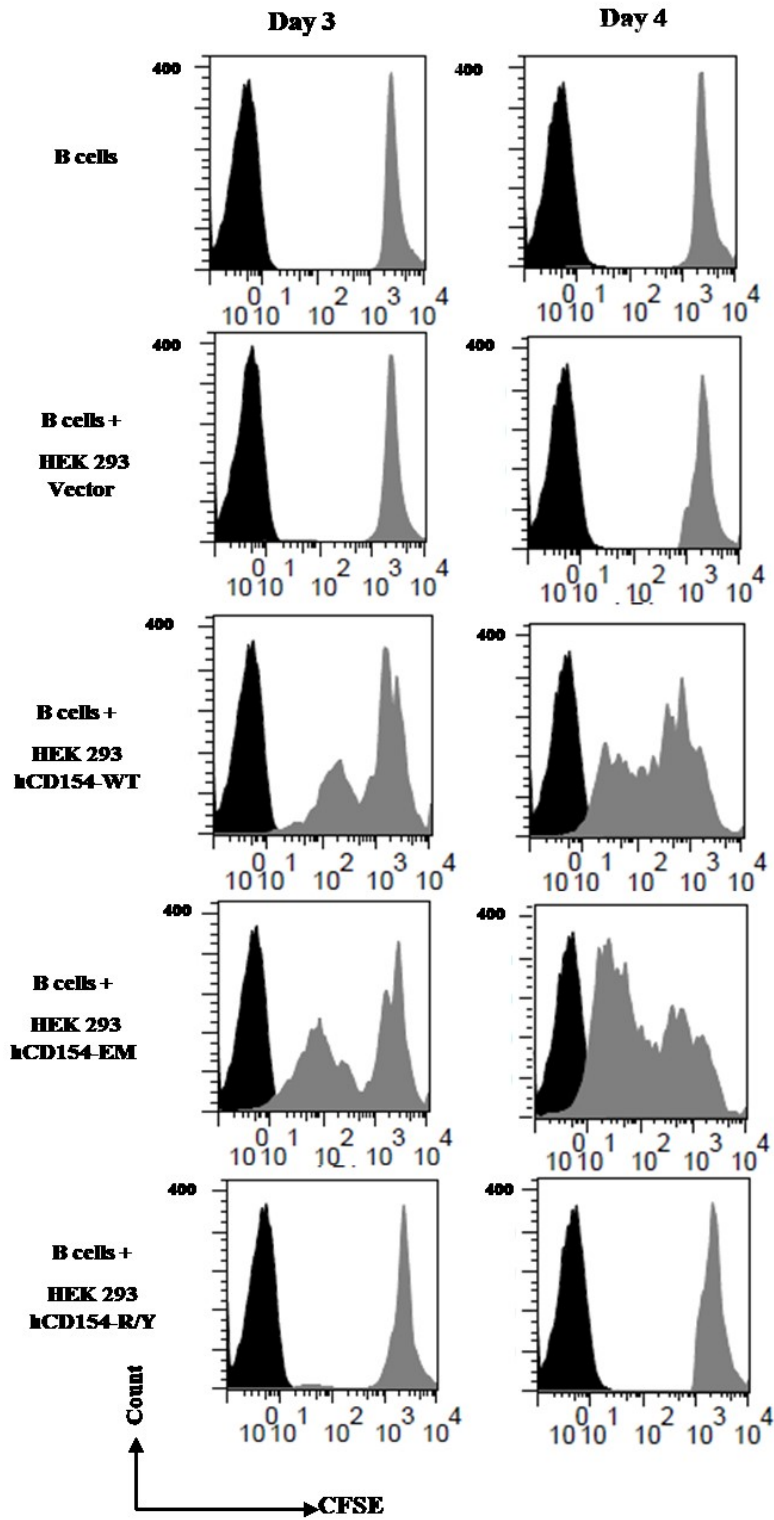


Figure 7.

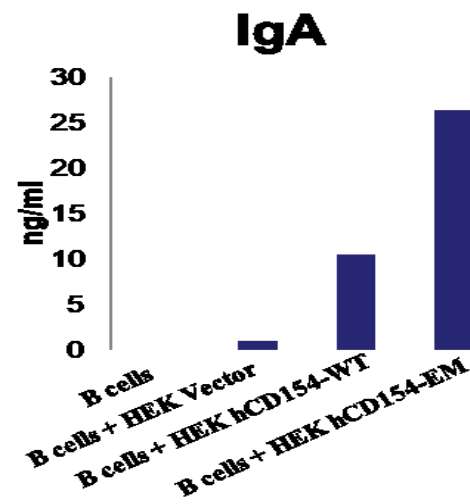
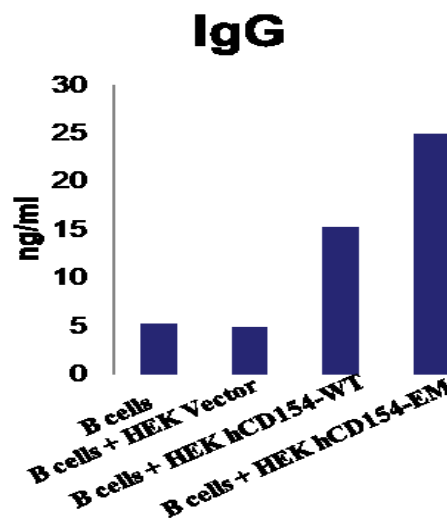
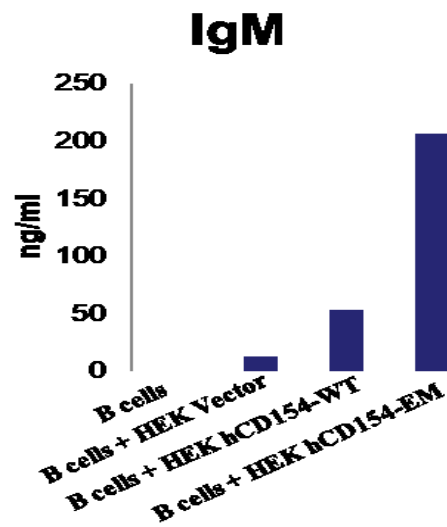


Figure 8.

Discussion

Le couple CD154/CD40 fut, pour longtemps, considéré comme un régulateur crucial de la réponse immunitaire. Aujourd'hui, et suite à la découverte de plusieurs partenaires moléculaires, le CD154 et le CD40 peuvent interagir avec ces derniers afin de moduler différentes réponses cellulaires. En effet, différentes molécules de surface cellulaire peuvent être associées au CD40 et peuvent avoir un rôle modulateur de plusieurs réponses induites par le CD40. Parmi ces molécules associées, il existe le CD20 [150], exprimé spécifiquement à la surface des cellules B. Malgré les 30 années de recherche, la fonction de cette molécule est encore peu connue. Elle a été étudiée en utilisant des anticorps monoclonaux agonistes induisant l'activation et la différenciation des cellules B [180], et antagonistes menant à l'arrêt de la croissance cellulaire [202, 316]. En effet, le Rituximab est le premier anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD20 utilisé pour le traitement de différents types de lymphomes [190] et de nombreuses maladies auto-immunes grâce à son efficacité et sa bonne tolérance [213, 317]. Cet anticorps entraîne la mort des cellules B par différents mécanismes tels que l'apoptose, la CDC ou l'ADCC [318]. Ces trois voies de la mort cellulaire semblent être complémentaires, ciblant les cellules B et conduisant à une éradication maximale de ces cellules. En 1999, notre laboratoire a démontré que le CD40 peut être associé physiquement au CD20 [150]. De plus, Anolik et al ont montré que la stimulation du CD40 induit une co-localisation de ces deux molécules vers les radeaux lipidiques où ils sont internalisés ensemble dans des vésicules cytoplasmiques [222].

Comme le CD40 et le CD20 sont impliqués dans la mort cellulaire, nous avons tenté d'étudier le rôle de l'association physique du CD40 avec le CD20 dans l'induction de la mort cellulaire. Nous avons démontré que la présence du CD40 à la surface cellulaire sensibilise plus les cellules à la mort induite via le CD20, par le Rituximab. De plus, et vu que c'est très bien documenté que le domaine cytoplasmique du CD40 joue un rôle essentiel dans la transduction des signaux [138, 319], nous avons démontré aussi que la déplétion du domaine cytoplasmique du CD40 affecte cette amplification du signal alors que ce domaine n'est pas impliqué dans l'association entre ces deux molécules [315]. De même, nous avons démontré que la présence du CD20 amplifie le signal de la mort cellulaire induite par le CD40 [315]. D'ailleurs, Jak M. et al. ont démontré que la stimulation des cellules de la leucémie lymphoïde chronique via le CD40 et en utilisant le Rituximab, rend ces cellules plus sensibles à la mort cellulaire. Ils ont

montré que cette sensibilité est spécifique par un traitement anti-CD20 dépendante du taux de calcium et de la production du ROS et indépendante des caspases et de la p53 [226]. Toutes ces données permettent de suggérer qu'une réaction croisée existe entre le CD20 et le CD40 au niveau des voies de signalisation menant à des réponses cellulaires plus importantes.

Comme le CD40 peut être exprimé sous forme monomérique et dimérique, nous avons démontré antérieurement que la forme monomérique du CD40 avait un potentiel plus importante pour induire la mort cellulaire que la forme homodimérique [138]. La substitution de l'unique cystéine (C238) présente dans la partie cytoplasmique du CD40 par une alanine (CD40-C238A) empêcherait l'homodimérisation de cette molécule. Le CD40-C238A pourrait en effet augmenter la mort cellulaire induite par un anti-CD40, le G28.5 [138]. Par contre, la dimérisation du CD40, médiée par sa liaison au CD154 trimérique ou par des anti-CD40, est impliqué dans d'autres réponses cellulaires [36, 38]. En effet, il a été démontré que le CD40 homodimère présent au niveau des CPA est essentiel pour la production d'IL-2 par les cellules T [38]. De plus, notre groupe a montré que la dimérisation du CD40 est nécessaire pour l'induction de l'expression du CD86 et de la production d'IL-8. Quant aux voies de signalisation intracellulaires, nous avons montré que la dimérisation du CD40 est nécessaire pour l'activation de la voie PI3-kinase/Akt associée avec l'induction de la survie cellulaire [36, 320]. De plus, une diminution de l'expression du CD23 (FcεRII) a été observée quand le CD40 est incapable de former un dimère, due à l'inhibition de la voie PI3-Kinase/Akt médié par la mutation au niveau du résidu C238 du CD40 [320]. En se basant sur ces résultats, nous avons décidé d'étudier le rôle de la dimérisation du CD40 sur la mort cellulaire induite par le CD20. Nos résultats montrent que le CD40-C238A augmente la mort cellulaire induite par le CD20 [315]. Ceci nous a permis de confirmer le rôle du CD40 monomère dans l'amplification de la mort cellulaire. De plus, ces résultats prouvent l'impact de l'homodimérisation du CD40 sur l'activation et la survie cellulaire B.

D'autre part, le Rituximab a montré son efficacité dans le traitement des patients de faible et de haute malignité, mais une rechute a été observée après 6 mois de traitement [321]. Une efficacité à long terme a été obtenue quand un traitement avec le Rituximab a été combiné avec la chimiothérapie ou même avec d'autres médicaments [322]. En 2011, Lewis et al. ont rapporté que le traitement combiné des patients atteints de lymphomes non hodgkinien avec un

anti-CD40, le Dacetuzumab, et un anti-CD20, le Rituximab, présente une inhibition accrue de la prolifération tumorale comparé à la monothérapie [312]. Ils ont suggéré que ces deux anticorps monoclonaux présentent des mécanismes d'action distincts mais complémentaires contre les cellules tumorales. D'où notre curiosité d'aller voir l'effet du ciblage du CD40 et du CD20 sur la mort cellulaire induite via ces deux molécules, et nos résultats confirment qu'une réponse additive de la mort cellulaire est observée [315]. Nos résultats appuient ceux de Benoit et Wade (1996) qui ont observé une importante inhibition de la prolifération des cellules B de lymphomes non hodgkinien que suite à la stimulation combinée du CD20 et du CD40 [323]. Tous ces résultats suggèrent qu'un traitement combiné peut conduire à une éradication maximale des cellules B, augmentant ainsi l'efficacité du traitement.

En plus de son rôle dans l'induction de la mort cellulaire, le CD40 a montré aussi son rôle dans le clivage du CD154 de la membrane des cellules T en une forme soluble (sCD154) [22]. Cette forme garde toujours la structure trimérique du CD154, nécessaire pour son activité biologique. En outre, le sCD154 a été trouvé dans le plasma des patients atteints de plusieurs maladies auto-immunes, telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, le lupus érythémateux disséminé ainsi que dans les maladies cardiovasculaires et le cancer. En effet, plusieurs études se sont intéressées à produire des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD154 humain afin de traiter des patients atteints des maladies auto-immunes/inflammatoires mais aussi du cancer où le sCD154 se trouve anormalement élevé dans le sérum. Malgré l'efficacité de ce type de traitement, les essais cliniques ont dû être arrêtés devant la survenue des événements thrombotiques et d'autres effets secondaires comme l'hypogammaglobulinémie [309]. Avant de bloquer le CD154, il fallait tout d'abord comprendre les mécanismes impliqués dans le clivage du CD154 afin de bien cibler cette voie mais aussi éliminer les effets secondaires de l'immunothérapie contre le CD154.

Le CD40 était considéré comme étant le seul récepteur du CD154, jusqu'en 2002 où l' α IIB β 3, un membre de la famille des intégrines, a montré sa capacité de lier le CD154 [72]. Par la suite, deux autres membres de la famille des intégrines ont été identifiés comme récepteur du CD154, l' α 5 β 1 et l' α M β 2 [73, 74]. Chaque récepteur est capable de lier le CD154 via des résidus différents. Cependant, le CD40 demeure le principal récepteur de haute affinité. En se basant sur l'étude co-cristallographique et la mutagenèse dirigée, il a été démontré que les

résidus K143, Y145, Y146, R203 et Q220 du CD154 et les résidus Y82, D84, N86, E74 et E117 du CD40 semblent être des sites importants pour l'interaction du CD154 avec le CD40. An et al. ont rapporté que les résidus Y145 et R203 du CD154 sont des résidus cruciaux dans l'interaction CD154-CD40 [70]. Les études élaborées par notre laboratoire, en utilisant des formes solubles du CD154 muté, ont prouvé que ces résidus sont essentiels dans l'interaction du CD154 avec le CD40 mais pas avec l' $\alpha 5\beta 1$ [75]. Le CD154 interagit avec l' $\alpha IIb\beta 3$ via son motif RGD, et il a été démontré que le résidu D117 joue un rôle important dans cette interaction [75]. Nos résultats, publiés en 2015, sont les premiers à décrire les résidus du CD154 impliqués dans l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ et CD154/ $\alpha M\beta 2$. Nous avons généré une panoplie de sCD154 avec simple et double mutation dans le but d'analyser l'interaction structurale et fonctionnelle de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs. Nous avons démontré que les résidus N151 et Q166 du CD154 sont impliqués dans l'interaction du CD154 avec l' $\alpha 5\beta 1$ [76]. De plus, nous avons démontré que le CD40 et l' $\alpha M\beta 2$ sont capable de lier le CD154 via les mêmes résidus qui sont le Y145 et le R203 du CD154. La mutation des résidus du CD154 qui sont impliqués dans son interaction avec ses récepteurs n'affecte pas seulement la liaison mais aussi les signaux intracellulaires induites via le récepteur comme l'activation de la voie ERK1/2 [76]. En outre, nous avons montré aussi que l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs induit un signal bidirectionnel. Cette interaction induit l'activation des voies p38 et ERK1/2 des MAPK via les récepteurs mais aussi via le CD154 [76].

Donc, le CD154 est capable de se lier simultanément au CD40 et à l' $\alpha 5\beta 1$ ou à l' $\alpha M\beta 2$ et l' $\alpha 5\beta 1$. Comme le CD154 se trouve sous forme trimérique, il est capable de lier deux ou trois molécules du CD40. D'après nos résultats, il est capable de lier en même temps deux autres récepteurs comme l' $\alpha 5\beta 1$ et l' $\alpha IIb\beta 3$. Cette liaison peut influencer donc la réponse médiée par le CD154 au niveau des cellules exprimant différents récepteurs. L'identification des résidus du CD154 impliqués dans son interaction avec ses quatre récepteurs permet de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à inhiber l'interaction du CD154 avec un récepteur bien spécifique impliqué dans une réponse cellulaire donnée sans affectant les autres interactions.

D'autre part, depuis 1995, plusieurs études se sont intéressées sur les mécanismes impliqués dans la production du sCD154 en étudiant les cellules T et les plaquettes qui sont des

réservoirs de CD154. Henn V. et al ont démontré que la liaison du CD40 au CD154 conduit à une diminution d'expression du CD154 de la surface des plaquettes activées par des agonistes comme le collagène et la thrombine [324]. Cette diminution est due au clivage du CD154 de la membrane cellulaire et le sCD154 a été détecté dans le surnageant. D'autres groupes ont associé le rôle de l' α Ib β 3 ainsi que du MMP-2 dans le clivage du CD154 des plaquettes activées [325]. De plus, MMP-9 a montré aussi son implication dans le clivage du CD154 des plaquettes provenant des patients atteints de maladie de Crohn; l'inhibition du MMP-9 affecte d'une façon significative le clivage du CD154 [326]. De plus, Graf et al. ont été les premiers à avoir détecté le sCD154 dans le surnageant des cellules T activées [10]. Les auteurs ont démontré que cette forme est le résultat d'un clivage protéolytique au niveau de la méthionine 113 du CD154 résultant un fragment de 18 KDa. Ce fragment représente une partie du domaine extracellulaire du CD154 membranaire. Jusqu'à présent le rôle biologique du sCD154 reste mal connu mais il a montré sa capacité à lier le CD40 et d'induire la prolifération et la différenciation des cellules B [18, 327].

Dans ce contexte, notre groupe s'est intéressé à étudier le rôle des différents récepteurs du CD154 ainsi que les mécanismes impliqués dans le clivage du CD154 [22]. Nous avons démontré que le CD40 est le seul récepteur impliqué dans cette réponse suite à son interaction avec le CD154. De plus, nous avons aussi montré l'implication du PKC en utilisant la chlérythrine, inhibiteur du PKC, qui a inhibé le clivage du CD154 médié par la forme soluble du CD40. Ces protéines kinases peuvent contrôler plusieurs enzymes qui régulent différentes réponses biologiques. Matthies et al ont souligné le rôle des enzymes ADAM-10. L'utilisation des recombinants d'ADAM-10 semble être capable de cliver le CD154 des cellules T CD4+ humaines [21]. Notre groupe a souligné le rôle des ADAM-10 et ADAM-17, deux membres de la famille des MMP. Nous avons inhibé l'expression de ces deux protéines en utilisant des ARN interférents (siRNA) spécifiques ciblant l'expression des ADAM-10 et ADAM-17, pour ensuite étudier l'effet de cette inhibition sur le clivage du CD154. Ces inhibiteurs ont été capables d'affecter négativement le clivage du CD154, alors que l'inhibition simultanée de l'expression de ces deux molécules empêche complètement le clivage du CD154 suite à son interaction avec le CD40 [22].

Bien que le CD40 a montré son implication dans le clivage du CD154, cependant son rôle dans la régulation de cette réponse n'est pas encore élucidé. L'interaction du CD154 avec le CD40 induit des signaux bidirectionnels, il se peut que les signaux provenant de ces deux molécules puissent moduler les réponses cellulaires induites par l'une ou l'autre. En effet, les souris déficientes en CD154 ou en CD40 sont affectées dans la formation du centre germinatif et la commutation de classe isotypique induites par les cellules B résultant d'une absence du signal via le CD40 [99]. De plus, l'injection d'une forme recombinante du CD40 aux souris déficientes en CD40 permet le développement des centres germinatifs rudimentaires confirmant le rôle du CD154 dans la transmission d'un signal important aux cellules T nécessaire pour ce processus [98]. Ces études montrent que les signaux provenant du CD154 et du CD40 peuvent réguler les réponses induites par ces deux molécules. Comme déjà mentionné, le domaine cytoplasmique du CD40 est important dans la transduction du signal et dans l'activation de plusieurs réponses cellulaires induites par le CD40. Il sera donc important d'étudier le rôle de ce domaine dans le clivage du CD154. C'est pour cela que nous avons produit un CD40 tronqué (CD40- Δ cyto) où la totalité de la partie cytoplasmique a été enlevée. Nos résultats montrent que la délétion du domaine cytoplasmique du CD40 affecte le clivage du CD154 comparé au CD40 sauvage ce qui prouve que le signal provenant du CD40 amplifie cette réponse cellulaire. La quantification du sCD154 par ELISA montre une concentration plus importante dans le surnageant des cellules exprimant le CD154 en présence du CD40-WT qu'en présence du CD40- Δ cyto. Le rôle du signal provenant du CD40 dans le clivage du CD154 a été confirmé par la délétion du domaine cytoplasmique du CD40 et du CD154 empêchant ainsi complètement le clivage du CD154. Ces résultats soulignent bien l'importance du signal bidirectionnel du complexe CD154/CD40 dans la régulation de cette réponse cellulaire. En fait, nous avons démontré auparavant que le clivage du CD154 est indépendant de l'homodimérisation du CD40 [22]. Cette homodimérisation semble être requise pour certaines réponses cellulaires induites par le couple CD154/CD40.

Les résultats démontrés dans le deuxième chapitre suggèrent que l'association CD40-CD20 pourra moduler d'autres réponses cellulaires induites par le CD40 [315]. Le signal provenant du CD40 amplifie la mort cellulaire induite via le CD20 ainsi que le clivage du CD154. Il était donc nécessaire d'étudier l'impact du CD20 sur le clivage du CD154 induite par

le CD40. Nos résultats montrent qu'une co-expression du CD40 et du CD20 à la surface cellulaire induit un clivage complet du CD154 des cellules T comparé aux cellules exprimant uniquement le CD40. Ce qui permet de conclure que l'association CD40-CD20 peut aussi amplifier le clivage du CD154 où le CD40 reste le seul récepteur capable de cliver le CD154 de la membrane cellulaire. Ces résultats nous permettent de suggérer que le CD40 et le CD20 forment un complexe moléculaire à la surface des cellules exprimant ces deux molécules et renforcent les réponses cellulaires médiées par ces dernières.

Après avoir compris les mécanismes impliqués dans le clivage du CD154, il sera important d'aller affecter cette réponse cellulaire puisque le sCD154 se trouve anormalement élevé dans le surnageant des patients et cette concentration élevée semble être corrélée avec le développement de plusieurs maladies auto-immunes, cardiovasculaires et dans le cancer. Et si on parle d'une concentration élevée du sCD154, on parle donc d'une diminution de l'expression du CD154 de la surface cellulaire qui est due au clivage du CD154 induit par le CD40. En outre, l'étude de la concentration du sCD154 présent dans le sérum a été utilisée comme indicateur d'une réponse à un traitement anti-cancéreux. En effet, Azzariti A. et al. ont mesuré le niveau plasmatique du sCD154 avant et après traitement des patients souffrant du cancer pancréatique par chimiothérapie [328], ils ont pu observer une diminution de la concentration plasmatique du sCD154, mesurer par le test d'ELISA, après le traitement. Cette diminution peut être le résultat d'une diminution de l'interaction CD154/CD40.

De plus, le couple CD154/CD40 joue un rôle important dans la pathogenèse du cancer. Le niveau d'expression du CD154 et du CD40, détecté à la surface de plusieurs cellules tumorales, a été corrélé avec le stade du développement de la maladie. Et, une concentration élevée du sCD154 a été détectée dans différents types de cancer [287]. Il a été démontré qu'un niveau d'expression faible du CD40 conduit à une prolifération des cellules et une croissance tumorale [278], alors qu'un niveau d'expression élevé induit la mort de ces cellules et ainsi une diminution du volume tumoral [137, 329]. Par ailleurs, la réponse apoptotique du CD40 est due à son interaction avec le CD154 membranaire, induisant d'une façon directe la liaison des ligands cytotoxiques à la surface cellulaire comme le FasL et le TNF α ou indirecte par l'activation des cellules NK et T cytotoxiques [141, 330], alors que la liaison du CD40 au sCD154 peut stimuler la survie des cellules tumorales en activant des voies de signalisation

cellulaires telles la voie de PI3Kinase et la voie d'ERK. Cependant, le sCD154 est capable d'induire la mort des cellules tumorales que suite à un traitement avec des inhibiteurs de ces deux voies intracellulaires ou avec des médicaments cytotoxiques [295, 331]. De plus, Hayward et al. ont démontré que certains patients atteints du syndrome d'hyper-IgM peuvent avoir des tumeurs fatales, ceci étant due à l'absence des réponses immunitaires induites par le CD154 et plus principalement de la production des immunoglobulines. Ces patients présentent une susceptibilité élevée aux infections répétées qui peut être la cause de la tumorigenèse [332]. Donc, l'interaction du CD154 membranaire avec le CD40 peut intervenir dans les effets antitumoraux en stimulant le système immunitaire, mais cette réponse cellulaire nécessite une intensité d'interaction élevée entre ces deux molécules.

Pour éliminer le rôle néfaste du sCD154 dans certaines conditions pathologiques et maintenir une interaction plus durable entre le CD154 et le CD40, qui a un rôle bénéfique dans la réponse immunitaire, nous avons produit une forme du CD154 résistante au clivage. Cette forme porte une mutation au niveau du site de clivage en substituant, par mutagenèse, les résidus E112 et M113 en deux cystéines (112C-C113) permettant de renforcer la liaison entre les résidus à ce niveau par un pont disulfure. De plus, nous avons généré un CD154 portant une mutation au niveau des résidus R203 et Y145, qui sont essentiels à la liaison du CD154 au CD40 (CD154-R/Y), utilisé comme contrôle négatif. Ensuite, nous avons démontré la résistance de la forme CD154-EM/CC au clivage en étudiant le niveau d'expression du CD154 muté qui réside à la surface membranaire des cellules exprimant le CD154 muté ou non suite à sa liaison au CD40 membranaire ou soluble. Le sCD154 produit a été quantifié par le test d'ELISA. Nos résultats suggèrent que la mutation EM en CC empêche la liaison des ADAM-10 et ADAM-17 et donc le clivage du CD154 membranaire. Cette mutation n'a pas affecté la liaison du CD154 au CD40 ni les signaux intracellulaires comme l'activation de la voie ERK ½ des MAPKs.

Pour étudier le rôle biologique du CD154 résistant au clivage, premièrement, nous avons étudié le rôle du CD154-EM/CC dans la mort cellulaire suite à sa liaison au CD40. Nous avons utilisé les lignées lymphocytaires B, cellules Ramos, exprimant à leur surface le CD40. Ces cellules seront plus sensibles à la mort cellulaire suite à une activation avec du PMA qui augmente le niveau d'expression de cette molécule. Nos résultats générés montrent que l'activation des cellules Ramos rend ces cellules plus susceptibles à la mort cellulaire en

présence du CD154 membranaire résistant au clivage. Ceci confirme le rôle apoptotique de la forme membranaire et que la stabilité de la liaison CD154/CD40 augmente cette réponse cellulaire. Cette importante cytotoxicité induite par le CD154-EM/CC est due à la rétention du CD154 à la membrane cellulaire induisant ainsi des signaux apoptotiques plus soutenus que le CD154WT. Conformément à nos résultats, Elmetwali et al. ont pu produire une forme CD154 résistante au clivage par la délétion de 7 acides aminés (110SFEMQKG116), cette forme était capable d'induire la mort des cellules cancéreuses exprimant le CD40 à leurs surface d'une façon plus significative au CD154 clivable [333]. L'inhibition du clivage du CD154 peut donc augmenter l'effet d'un traitement contre le cancer par l'induction d'une cytotoxicité plus importante envers des cellules tumorales et donc inhiber la survie de ces dernières par l'inhibition de la production du sCD154. En fait, plusieurs études ont tenté de décrire les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par le CD40 suite à sa liaison au CD154 membranaire. Elmetwali et al. ont démontré aussi que le CD154 membranaire est capable de stabiliser l'activation de la voie JNK dépendante du TRAF-3 et inhibe les signaux de survie médiée par PI-3K/Akt dépendante du TRAF6 via le CD40, conduisant ainsi à l'apoptose cellulaire [142]. Il faut mentionner que les cellules Ramos expriment aussi à leur surface le CD20. De plus l'existence de l'association du CD40 avec le CD20 a été étudié à la surface de ces cellules [150], d'où le CD20 pourrait aussi jouer un rôle dans la mort de ces cellules induite par le couple CD154/CD40.

Deuxièmement, nous avons étudié le rôle du CD154 membranaire résistant au clivage dans le bon fonctionnement du système immunitaire suite à sa liaison au CD40. L'importance du couple CD154/CD40 a été démontrée chez les patients souffrant d'hyper-IgM où la mutation du CD154 affecte l'interaction CD154/CD40. Dans ce cas, l'activation des cellules B et la production des immunoglobulines IgG, IgA et IgE sont altérées, résultant en une réponse immunitaire non fonctionnelle dépendante des cellules T [334, 335]. Des études utilisant des souris CD154/CD40 *knock-out* ont prouvé l'importance de ce couple dans l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaires. Le blocage de l'interaction du CD154 avec le CD40 montre que cette interaction est essentielle pour la commutation de classe isotypique et l'hypermutation somatique qui sont nécessaire pour augmenter les fonctions effectrices des immunoglobulines, dans la production de ces derniers mais aussi dans la génération des cellules

B mémoires [15, 336]. En effet, Néron S et al. ont montré que le niveau d'expression du CD154 affecte les réponses cellulaires induites suite à sa liaison au CD40 exprimé par les cellules B. Dans cette étude, ils ont étudié l'effet de la variation de l'intensité de l'interaction CD154/CD40 sur la régulation de l'activation des cellules B et de la réponse immunitaire humorale. Leurs résultats montrent qu'une forte expression du CD154 augmente les réponses de prolifération et de production d'immunoglobulines induites par le CD40 [337]. Cette étude vient supporter nos résultats qui montrent que le CD154 membranaire résistant au clivage induit une adhésion homotypique plus prononcée mais aussi une prolifération plus importante des cellules B, purifiées du sang périphérique, que le CD154 qui se clive de la membrane cellulaire après sa liaison au CD40. Cette amplification de la réponse, induite par le CD154 résistant au clivage, a été observée aussi au niveau de la production des immunoglobulines. En effet, les cellules B produisent plus d'IgM, IgG et IgA lorsque le CD154 est résistant au clivage comparé au CD154 clivable. Cependant, les cellules B sont incapables de se proliférer et de produire d'immunoglobulines quand le CD40 n'interagit pas avec le CD154 muté (CD154 R/Y). En outre, il a été démontré que le sCD154 peut partager certaines activités biologiques que le CD154 membranaire comme la prolifération et la production d'immunoglobulines mais pas avec la même intensité de réponses [23, 338]; alors que le CD154 membranaire est capable d'induire la mort cellulaire contrairement au sCD154 qui stimule la survie cellulaire [333, 339]. Par ailleurs, Pietravalle et al. ont généré une forme non clivable du CD154 par la délétion de 12 acides aminés (110FEMQKGDNPQIA125) et ont montré que cette forme induit une prolifération cellulaire B et une production d'IgE comparable au CD154WT [338]. Cette contradiction de résultats peut être due par le fait que la délétion de 12 acides aminés affecte la conformation de la molécule mais aussi les signaux intracellulaires induites via le CD154 qui seront important dans l'amplification des réponses cellulaires induites via le CD40. En effet, ces réponses cellulaires dépendent des signaux préalables induisant l'engagement du CD154 au CD40 mais aussi du niveau d'expression de ces deux molécules à la surface cellulaire. Il faut ajouter que le contact physique entre cellules T et B est important afin de délivrer les signaux via le CD154 membranaire nécessaire pour l'activation, la prolifération ainsi que la différenciation des cellules T en cellules T effectrices, d'où l'importance du signal bidirectionnel induit par le couple CD154/CD40 dans l'amplification de ces réponses cellulaires.

Conclusion et perspectives

Les résultats de ces études révèlent l'importance du signal bidirectionnel induit par le couple CD154/CD40 dans la régulation de plusieurs réponses cellulaires. De plus, ces résultats montrent pour la première fois le rôle fonctionnel de l'association du CD40 avec le CD20 dans l'amplification des réponses induites par ces deux molécules. Cette association a montré son importance dans l'amplification de la mort cellulaire induite via le CD40 ou via le CD20. Le signal qui provient du CD40 est responsable de cette amplification. De plus, l'engagement simultané de ces deux molécules augmente la réponse apoptotique d'une façon additive. La collaboration et la synergie entre le CD40 et le CD20 pour l'induction de la mort cellulaire seront sans doute impliquées dans d'autres réponses cellulaires. En effet, nos résultats publiés en 2013 montrent que le CD40, soluble ou membranaire, est le seul récepteur capable d'induire le clivage du CD154 de la surface des cellules T humaines en sa forme soluble. L'association entre les niveaux du sCD154 plasmatiques et l'incidence de plusieurs maladies auto-immunes, des syndromes cardiovasculaires mais aussi le cancer, pointe vers l'importance de disséquer les mécanismes impliqués dans le clivage du CD154. Ce processus est médié par l'activation de la voie PKC qui à son tour active les métalloprotéinases, ADAM-10 et -17. Nos résultats montrent l'importance du signal qui provient du CD40 dans le clivage du CD154 ainsi que le rôle de l'association CD40-CD20 dans l'amplification de cette réponse cellulaire induite par le couple CD154/CD40. D'ailleurs, la mutation du site de clivage (112E-M113) nous a permis de générer une forme CD154 résistante au clivage. Cette dernière a montré une efficacité plus importante dans l'induction des réponses cellulaires B comme la prolifération cellulaire, la production des immunoglobulines ainsi que dans la mort cellulaire.

Suite à la génération d'un mutant CD154 résistant au clivage, il sera très intéressant de générer des souris *Knock-in* exprimant le CD154 résistant et étudier l'effet de cette mutation sur l'activité tumorale ou d'autres maladies affectant le système immunitaire. En effet, la liaison du CD154 au CD40 est capable d'induire d'une façon directe l'apoptose de certaines cellules tumorales et selon nos résultats la forme résistante au clivage présente un effet cytotoxique plus important que le CD154 clivable. De plus, la maintenance du CD154 à la surface cellulaire permet d'augmenter l'efficacité de l'activation des cellules T.

D'autre part, la présence d'une concentration plasmatique très élevée de la forme soluble du CD154 chez les patients présentant différentes pathologies auto-immunes ou du système

cardiovasculaire et du cancer suggère que ce niveau élevé pourrait jouer un rôle pathologique. D'ailleurs, le sCD154, biologiquement actif, est capable de lier le CD40 et induire une activité inflammatoire. Cette forme soluble peut jouer aussi un rôle positif dans la progression de la tumeur en induisant une immunosuppression favorisant ainsi le recrutement des cellules suppressives (cellules T régulatrices, cellules myéloïdes suppresses) plutôt que les cellules effectrices. Vu le rôle néfaste du sCD154, il sera donc important d'étudier le rôle biologique du sCD154 plasmatique qui reste toujours une question ouverte. Il semble que cette forme du CD154 se comporte comme une « pseudo-cytokine » pouvant à distance activer les cellules exprimant le CD40. Cependant, elle ne présente pas la même activité biologique que le CD154 membranaire. Ceci nous permet aussi de suggérer que le CD154 se clive de la membrane mettant fin aux signaux et réponses induits par sa forme membranaire. D'autres questions restent à poser : que serait le destin du CD40 suite au clivage du CD154? Il est connu que la spécificité des membres de la famille du TNFR est de s'internaliser dans la cellule afin de diminuer la transduction du signal. De plus, une étude a démontré que le CD154 exprimé à la surface des fibroblastes induit l'endocytose du CD40 au niveau des cellules B [222]. D'autres études ont démontré que la liaison du CD154 au CD40 induit la translocation de ce dernier vers les radeaux lipidiques suivi par son internalisation dans des vésicules cytoplasmiques [38, 340, 341]. Il sera donc important de vérifier l'internalisation du CD40 suite au clivage du CD154 afin de diminuer la transduction des signaux bidirectionnels ainsi que les réponses cellulaires induites par ce couple.

Comme nous avons démontré que les signaux provenant du CD40 sont impliqués dans l'amplification de la mort cellulaire induite par le CD20 ainsi que dans le clivage du CD154, il sera nécessaire de décortiquer les mécanismes signalétiques qui sont responsable dans l'amplification de ces réponses cellulaires. En premier lieu, comme les ADAM-10 et les ADAM-17 sont impliquées dans le clivage du CD154, il est donc important d'étudier comment les signaux provenant du CD40 sont impliqués dans l'activation de ces enzymes. Il est fort probable que ces enzymes soient activées non seulement au niveau des cellules exprimant le CD154, mais également au niveau de celles qui expriment le CD40. Il sera aussi important d'étudier le rôle des molécules adaptatrices, les TRAFs et le JAK3 dans cette amplification de réponse par l'utilisation du CD40 muté au niveau des résidus impliqués dans son association

avec ces molécules adaptatrices. En deuxième lieu, nous avons démontré précédemment que la mort cellulaire induite par le CD40 résulte du recrutement de la molécule adaptatrice TRAF6 induisant ainsi la perméabilisation du lysosome suivi de la libération des cathépsines [138]. Il sera donc important d'étudier l'implication de cette voie induite par le CD40 dans l'amplification de la mort cellulaire induite via le CD20 par le Rituximab.

Comme pour toute cible pharmacologique, le développement des anticorps antagonistes spécifiques contre le couple CD154/CD40 engendre l'apparition de plusieurs effets secondaires indésirables par exemple un défaut de production d'immunoglobulines (hypogammaglobulinémie), vu le rôle crucial de ce couple dans l'immunité. A cet égard, il sera important de mieux disséquer les mécanismes par lesquels le complexe CD154/CD40 affecte la réponse immunitaire afin de cibler un élément spécifiquement impliqué dans la maladie en question. En effet, les études se sont focalisées sur les signaux et les réponses induites par le récepteur et peu d'études se sont intéressées à ceux induites via le ligand. Il s'avère donc crucial de mieux étudier les mécanismes induits via le CD154 suite à sa liaison au CD40. Premièrement, comme tous les membres de la famille des TNF, le CD154 ne possède pas un motif de signalisation dans sa partie cytoplasmique. Il sera donc important d'identifier les molécules adaptatrices, qui peuvent être associées au CD154 membranaire et impliquées dans la transduction du signal via le CD154. Deuxièmement, il est important d'étudier les voies de signalisation induites via le CD154 comme les voies du PI3Kinases et du NF- κ B, mais aussi d'étudier le profil de cytokines sécrétées (telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10, IFN- γ , TNF- α) par les différents types cellulaires exprimant le CD154 suite à sa liaison au CD40. D'autre part, comme discuté dans le chapitre 1, le CD154 peut être associé au CD28i à la surface des cellules T ce qui amplifie l'activation de la voie NF- κ B. Il sera donc intéressant d'étudier le rôle de cette association dans la modulation des réponses induites par le couple CD154/CD40.

Pour conclure, l'étude du rôle du CD40 ainsi que le rôle de son association avec le CD20 dans la modulation des réponses immunitaires induites par le CD154, nous permettent de mieux comprendre le rôle de ces trois molécules qui jouent comme médiateurs bidirectionnels dans la régulation de ces réponses immunitaires. De plus, le complexe CD154/CD40 représente une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires et même dans le cancer. Plus d'études seront cependant nécessaires afin de

mieux définir le rôle de ce couple ainsi que de ses partenaires moléculaires dans le développement de ces maladies.

Bibliographie

1. Paulie, S., et al., *The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction.* J Immunol, 1989. **142**(2): p. 590-5.
2. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40.* Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
3. Hollenbaugh, D., et al., *The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity.* Embo J, 1992. **11**(12): p. 4313-21.
4. Lederman, S., et al., *Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help).* J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 1091-101.
5. Villa, A., et al., *Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2110-4.
6. Karpusas, M., et al., *A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand.* Structure, 1995. **3**(12): p. 1426.
7. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
8. 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.
9. Hsu, Y., et al., *Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes.* J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 911-5.
10. 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.
11. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease.* Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
12. Casamayor-Palleja, M., M. Khan, and I.C. MacLennan, *A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex.* J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1293-301.
13. Wu, S.F., et al., *Hydroxychloroquine inhibits CD154 expression in CD4(+) T lymphocytes of systemic lupus erythematosus through NFAT, but not STAT5, signaling.* Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 183.
14. Kaminski, D.A., et al., *CD28 and inducible costimulator (ICOS) signalling can sustain CD154 expression on activated T cells.* Immunology, 2009. **127**(3): p. 373-85.
15. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair.* Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
16. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.* Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
17. Lievens, D., et al., *The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis.* Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 206-14.

18. Pietravalle, F., et al., *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 5965-7.
19. Aukrust, P., et al., *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes*. Circulation, 1999. **100**(6): p. 614-20.
20. Danese, S., et al., *Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients*. Gut, 2003. **52**(10): p. 1435-41.
21. Matthies, K.M., et al., *Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells*. Cell Immunol, 2006. **241**(1): p. 47-58.
22. 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.
23. Mazzei, G.J., et al., *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7025-8.
24. Paulie, S., et al., *Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis*. Cancer Immunol Immunother, 1984. **17**(3): p. 173-9.
25. 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.
26. Clark, E.A. and G. Shu, *Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors*. J Immunol, 1987. **138**(3): p. 720-5.
27. Ledbetter, J.A., et al., *Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40)*. J Immunol, 1987. **138**(3): p. 788-94.
28. Brodeur, S.R., et al., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 837-48.
29. Wang, Y., et al., *CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 971-83.
30. Noelle, R.J., J.A. Ledbetter, and A. Aruffo, *CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation*. Immunol Today, 1992. **13**(11): p. 431-3.
31. Grimaldi, J.C., et al., *Genomic structure and chromosomal mapping of the murine CD40 gene*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 3921-6.
32. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 74-9.
33. 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.
34. Tone, M., et al., *Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1751-6.
35. Moses, A.V., et al., *HIV-1 induction of CD40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas [In Process Citation]*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1242-9.

36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Danen, E.H. and A. Sonnenberg, *Integrins in regulation of tissue development and function*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 471-80.
40. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
41. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
42. Kuphal, S., R. Bauer, and A.K. Bosserhoff, *Integrin signaling in malignant melanoma*. Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(2): p. 195-222.
43. Arnaout, M.A., *Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 125-40.
44. Humphries, M.J., et al., *Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 313-20.
45. Vigneault, F., et al., *Control of integrin genes expression in the eye*. Prog Retin Eye Res, 2007. **26**(2): p. 99-161.
46. Gahmberg CG1, F.S., Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M., *Regulation of integrin activity and signalling*. Biochim Biophys Acta., 2009. **1790**(6): p. 431-44.
47. Shimaoka, M., J. Takagi, and T.A. Springer, *Conformational regulation of integrin structure and function*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2002. **31**: p. 485-516.
48. Giancotti, F.G., *A structural view of integrin activation and signaling*. Dev Cell, 2003. **4**(2): p. 149-51.
49. Christie J. Avraamides, B.G.-S., and Judith A. Varner *Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 604–617.
50. Kato, A., *The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's thrombasthenia: implications of integrin alpha IIb beta 3 for its pathogenesis*. Crit Rev Oncol Hematol, 1997. **26**(1): p. 1-23.
51. Trial, J., et al., *Fibronectin fragments modulate monocyte VLA-5 expression and monocyte migration*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 419-30.
52. Sincock, P.M., G. Mayrhofer, and L.K. Ashman, *Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin*. J Histochem Cytochem, 1997. **45**(4): p. 515-25.
53. Akiyama, S.K. and K.M. Yamada, *Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cell-binding domain of fibronectin*. J Biol Chem, 1985. **260**(19): p. 10402-5.
54. Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti, *Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(19): p. 5985-8.

55. Boles, B.K., et al., *Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(4): p. L703-12.
56. Nesti, L.J., et al., *TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts*. J Orthop Res, 2002. **20**(5): p. 1042-9.
57. Altieri DC, A.F., Plescia J, Ginsberg MH, Edgington TS, Plow EF, *A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/Cd18)*. J Biol Chem, 1990. **265**: p. 12119–12122.
58. Kanse, S.M., et al., *Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the beta2 integrin Mac-1 (alphaMbeta2, CD11b/CD18)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2251-6.
59. Ross G, L.J., *Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes*. J. Exp Med, 1982. **155**: p. 96 –110.
60. Wolf, D., et al., *Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice*. Circ Res, 2011. **109**(11): p. 1269-79.
61. Schneider, L.C., *X-linked hyper IgM syndrome*. Clin Rev Allergy Immunol, 2000. **19**(2): p. 205-15.
62. Mayer, L., et al., *Evidence for a defect in "switch" T cells in patients with immunodeficiency and hyperimmunoglobulinemia M*. N Engl J Med, 1986. **314**(7): p. 409-13.
63. Thusberg, J. and M. Vihinen, *The structural basis of hyper IgM deficiency - CD40L mutations*. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**(3): p. 133-41.
64. Hirbod-Mobarakeh, A., A. Aghamohammadi, and N. Rezaei, *Immunoglobulin class switch recombination deficiency type 1 or CD40 ligand deficiency: from bedside to bench and back again*. Expert Rev Clin Immunol, 2014. **10**(1): p. 91-105.
65. Bajorath, J., *Detailed comparison of two molecular models of the human CD40 ligand with an x-ray structure and critical assessment of model-based mutagenesis and residue mapping studies*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24603-9.
66. Bajorath, J., et al., *Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 1995. **34**(31): p. 9884-92.
67. Bajorath, J., et al., *Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction*. Biochemistry, 1995. **34**(6): p. 1833-44.
68. Anand, S.X., et al., *Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease*. Thromb Haemost, 2003. **90**(3): p. 377-84.
69. Nadiri, A., et al., *CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events*. Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2358-67.
70. An, H.J., et al., *Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11226-35.
71. 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.
72. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
73. Leveille, C., et al., *CD40 Ligand Binds to {alpha}5beta1 Integrin and Triggers Cell Signaling*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(8): p. 5143-5151.

74. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. *Circulation*, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
75. El Fakhry, Y., et al., *Functional Interaction of CD154 Protein with alpha5beta1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to alphaIIbbeta3 Integrin and CD40 Molecules*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(22): p. 18055-66.
76. 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.
77. 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.
78. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **597**: p. 131-51.
79. Saemann, M.D., et al., *Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3*. *Am J Transplant*, 2003. **3**(11): p. 1341-9.
80. Saemann, M.D., et al., *CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited*. *Transplant Proc*, 2002. **34**(5): p. 1407-8.
81. 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.
82. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(10): p. 775-86.
83. Bradley JR, P.J., *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)*. *Oncogene*, 2001 Oct 1. **20**(44): p. 6482-91.
84. Zapata JM, R.J., *TRAF1: lord without a RING*. *Sci STKE*, 2002 May 21. **2002**(133): p. pe27.
85. Zotti T, V.P., Stilo R., *The seventh ring: exploring TRAF7 functions*. *J Cell Physiol*, 2012 Mar. **227**(3): p. 1280-4.
86. 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.
87. 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.
88. Xie, P., *TRAF molecules in cell signaling and in human diseases*. *J Mol Signal*, 2013. **8**(1): p. 7.
89. Pullen, S.S., et al., *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization*. *Biochemistry*, 1999. **38**(31): p. 10168-77.
90. Munroe ME, B.G., *A costimulatory function for T cell CD40*. *J Immunol*, 2007 Jan 15. **178**(2): p. 671-82.
91. Propst, S.M., K. Estell, and L.M. Schwiebert, *CD40-mediated activation of NF-kappa B in airway epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37054-63.
92. Urbich, C., et al., *Upregulation of TRAF-3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(10): p. 1451-8.
93. Rowland, S.L., et al., *A novel mechanism for TNFR-associated factor 6-dependent CD40 signaling*. *J Immunol*, 2007. **179**(7): p. 4645-53.

94. Moore, C.R. and G.A. Bishop, *Differential regulation of CD40-mediated TNF receptor-associated factor degradation in B lymphocytes*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3780-9.
95. Pine, R., A. Canova, and C. Schindler, *Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene*. EMBO J, 1994. **13**(1): p. 158-67.
96. 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.
97. Grammer, A.C. and P.E. Lipsky, *CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms*. Adv Immunol, 2000. **76**: p. 61-178.
98. Poudrier, J., et al., *CD40 ligand signals optimize T helper cell cytokine production: role in Th2 development and induction of germinal centers*. Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3371-83.
99. van Essen, D., H. Kikutani, and D. Gray, *CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 620-3.
100. 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.
101. Peng, X., et al., *Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1621-7.
102. Blotta, M.H., et al., *Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3133-40.
103. Mackey, M.F., R.J. Barth, Jr., and R.J. Noelle, *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 418-28.
104. El Fakhry, Y., et al., *Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 770-9.
105. 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.
106. Aruffo, A., et al., *The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome*. Cell, 1993. **72**(2): p. 291-300.
107. Allen, R.C., et al., *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. Science, 1993. **259**(5097): p. 990-3.
108. Durandy, A., et al., *Induction by anti-CD40 antibody or soluble CD40 ligand and cytokines of IgG, IgA and IgE production by B cells from patients with X-linked hyper IgM syndrome*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2294-9.
109. Korthauer, U., et al., *Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. Nature, 1993. **361**(6412): p. 539-41.
110. Castigli, E., et al., *CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12135-9.
111. Xu, J., et al., *Mice deficient for the CD40 ligand*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 423-31.
112. Kawabe, T., et al., *The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation*. Immunity, 1994. **1**(3): p. 167-78.

113. Renshaw, B.R., et al., *Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1889-900.
114. Foy, T.M., et al., *gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 157-63.
115. Van den Eertwegh, A.J., et al., *In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1555-65.
116. Foy, T.M., et al., *In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1567-75.
117. Ma, D.Y. and E.A. Clark, *The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 265-72.
118. 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.
119. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
120. DeKruyff, R.H., L.V. Rizzo, and D.T. Umetsu, *Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones*. Semin Immunol, 1993. **5**(6): p. 421-30.
121. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
122. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
123. IS, G. and F. RA, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. . Annu Rev Immunol, 1998. **16**.
124. Rousset, F., E. Garcia, and J. Banchereau, *Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 705-10.
125. Klaus, S.J., et al., *CD40 and its ligand in the regulation of humoral immunity*. Semin Immunol, 1994. **6**(5): p. 279-86.
126. Meng, X., B. Yang, and W.C. Suen, *Prospects for modulating the CD40/CD40L pathway in the therapy of the hyper-IgM syndrome*. Innate Immun, 2018. **24**(1): p. 4-10.
127. Armitage, R.J., et al., *Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines*. J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3671-80.
128. Spriggs, M.K., et al., *Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1543-50.
129. Schonbeck, U. and P. Libby, *CD40 signaling and plaque instability*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1092-103.
130. Quezada, S.A., et al., *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 307-28.
131. Chatzigeorgiou, A., et al., *CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease*. Biofactors, 2009. **35**(6): p. 474-83.
132. Stout, R.D., et al., *Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 8-11.

133. Thienel, U., J. Loike, and M.J. Yellin, *CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets*. Cell Immunol, 1999. **198**(2): p. 87-95.
134. Wagner, M., et al., *IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 954-63.
135. Banchereau, J., et al., *Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40*. Science, 1991. **251**(4989): p. 70-2.
136. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3261-70.
137. 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.
138. Jundi, M., et al., *CD40-mediated cell death requires TRAF6 recruitment*. Immunobiology, 2011. **217**(3): p.375-383.
139. Tong, A.W., et al., *Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 691-703.
140. Szocinski, J.L., et al., *Activation-induced cell death of aggressive histology lymphomas by CD40 stimulation: induction of bax*. Blood, 2002. **100**(1): p. 217-23.
141. Georgopoulos, N.T., et al., *A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation*. Cell Death Differ, 2006. **13**(10): p. 1789-801.
142. 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.
143. Prasad, K.S., et al., *Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12367-71. Epub 2003 Sep 30.
144. Simic, D., et al., *Blocking alpha5beta1 Integrin Attenuates sCD40L-Mediated Platelet Activation*. Clin Appl Thromb Hemost, 2017. **23**(6): p. 607-614.
145. Loubaki, L., et al., *Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction*. Mol Immunol, 2010. **47**(11-12): p. 2112-8.
146. Okwor, I., P. Jia, and J.E. Uzonna, *Interaction of Macrophage Antigen 1 and CD40 Ligand Leads to IL-12 Production and Resistance in CD40-Deficient Mice Infected with Leishmania major*. J Immunol, 2015. **195**(7): p. 3218-26.
147. Bour-Jordan, H. and J.A. Blueston, *CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals*. J Clin Immunol, 2002. **22**(1): p. 1-7.
148. Mikolajczak, S.A., et al., *The modulation of CD40 ligand signaling by transmembrane CD28 splice variant in human T cells*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 1025-31.
149. Kansas, G.S. and T.F. Tedder, *Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway*. J Immunol, 1991. **147**(12): p. 4094-102.

150. Leveille, C., R. AL Daccak, and W. Mourad, *CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 65-74.
151. Leveille, C., et al., *CD40 associates with the MHC class II molecules on human B cells*. Eur J Immunol, 2000. **29**: p. 3516 - 3526.
152. Stashenko, P., et al., *Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen*. J Immunol, 1980. **125**(4): p. 1678-85.
153. Tedder, T.F., et al., *Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(1): p. 208-12.
154. Rosenthal, P., et al., *Ontogeny of human hematopoietic cells: analysis utilizing monoclonal antibodies*. J Immunol, 1983. **131**(1): p. 232-7.
155. Thevenin, C., et al., *Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5949-56.
156. Liang, Y., et al., *Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12*. Immunogenetics, 2001. **53**(5): p. 357-68.
157. Hromas, R., et al., *Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1*. Blood, 1993. **82**(10): p. 2998-3004.
158. Einfeld, D.A., et al., *Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains*. Embo J, 1988. **7**(3): p. 711-7.
159. Polyak, M.J. and J.P. Deans, *Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3256-62.
160. Tedder, T.F., et al., *Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19*. J Immunol, 1988. **141**(12): p. 4388-94.
161. Cartron, G., et al., *From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2635-42.
162. Tedder, T.F. and P. Engel, *CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes*. Immunol Today, 1994. **15**(9): p. 450-4.
163. Manches, O., et al., *In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas*. Blood, 2003. **101**(3): p. 949-54.
164. Huhn, D., et al., *Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1326-31.
165. Fang, D., et al., *A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9328-37.
166. Venugopal, P., et al., *Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Res, 2000. **24**(5): p. 411-5.
167. Sivaraman, S., et al., *Effect of interferon-alpha on CD20 antigen expression of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Cytokines Cell Mol Ther, 2000. **6**(2): p. 81-7.
168. Dancescu, M., et al., *IL-4 induces conformational change of CD20 antigen via a protein kinase C-independent pathway. Antagonistic effect of anti-CD40 monoclonal antibody*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2411-6.

169. Golay, J., et al., *CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3383-9.
170. van Meerten, T., et al., *Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(13): p. 4027-35.
171. Uchida, J., et al., *Mouse CD20 expression and function*. *Int Immunol*, 2004. **16**(1): p. 119-29.
172. Li, H., et al., *Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(43): p. 42427-34.
173. Riley, J.K. and M.X. Sliwkowski, *CD20: a gene in search of a function*. *Semin Oncol*, 2000. **27**(6 Suppl 12): p. 17-24.
174. Bubien, J.K., et al., *Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes*. *J Cell Biol*, 1993. **121**(5): p. 1121-32.
175. Deans, J., et al., *Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(38): p. 22632-8.
176. Deans, J.P., et al., *Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2*. *J Immunol*, 1993. **151**(9): p. 4494-504.
177. Cragg, M.S., et al., *Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts*. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 1045-52.
178. Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2738-43.
179. Mathas, S., et al., *Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 7170-6.
180. Walshe, C.A., et al., *Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(25): p. 16971-84.
181. Ivanov, A., et al., *Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(8): p. 2143-59.
182. Beum, P.V., et al., *The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes*. *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2600-9.
183. Bourget, I., et al., *CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(3): p. 768-71.
184. Bourget, I., et al., *CD20 monoclonal antibodies stimulate extracellular cleavage of the low affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) in Epstein-Barr-transformed B cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6927-30.
185. Bourget, I., et al., *CD20 monoclonal antibodies decrease interleukin-4-stimulated expression of the low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) in human B cells by increasing the extent of its cleavage*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(7): p. 1872-6.
186. Cragg, M.S., et al., *The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy*. *Curr Dir Autoimmun*, 2005. **8**: p. 140-74.

187. Anderson, K.C., et al., *Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation*. *Blood*, 1984. **63**(6): p. 1424-33.
188. Gonzalez-Stawinski, G.V., et al., *Hapten-induced primary and memory humoral responses are inhibited by the infusion of anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, Rituximab)*. *Clin Immunol*, 2001. **98**(2): p. 175-9.
189. Hudson, P.J., *Design, production and evaluation of novel diagnostic and therapeutic reagents. 6-9 December 1999, La Jolla, CA, USA*. *IDrugs*, 2000. **3**(3): p. 262-4.
190. McLaughlin, P., et al., *Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(8): p. 2825-33.
191. Bornstein, G.G., et al., *Development of a new fully human anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies*. *Invest New Drugs*, 2010. **28**(5): p. 561-74.
192. Mohrbacher, A., *B cell non-Hodgkin's lymphoma: rituximab safety experience*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7 Suppl 3**: p. S19-25.
193. Song, H., et al., *Therapeutic potential of 90Y- and 131I-labeled anti-CD20 monoclonal antibody in treating non-Hodgkin's lymphoma with pulmonary involvement: a Monte Carlo-based dosimetric analysis*. *J Nucl Med*, 2007. **48**(1): p. 150-7.
194. Pescovitz, M.D., *Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(5 Pt 1): p. 859-66.
195. Mossner, E., et al., *Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity*. *Blood*, 2010. **115**(22): p. 4393-402.
196. Peffault de Latour, R., M. Robin, and J.O. Bay, *[Monoclonal antibodies for lymphomas and leukemias in 2005]*. *Bull Cancer*, 2006. **93**(1): p. 107-18.
197. Williams, M.E., et al., *Thrice-weekly low-dose rituximab decreases CD20 loss via shaving and promotes enhanced targeting in chronic lymphocytic leukemia*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7435-43.
198. Bohlen, S.P., et al., *Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1926-30.
199. Stel, A.J., et al., *Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2287-95.
200. Hofmeister, J.K., D. Cooney, and K.M. Coggeshall, *Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis*. *Blood Cells Mol Dis*, 2000. **26**(2): p. 133-43.
201. Chan, H.T., et al., *CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5480-9.
202. Reff, M.E., et al., *Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20*. *Blood*, 1994. **83**(2): p. 435-45.
203. Dall'Ozzo, S., et al., *Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship*. *Cancer Res*, 2004. **64**(13): p. 4664-9.

204. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 443-6.
205. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene*. Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.
206. Watier, H., *Variability factors in the clinical response to recombinant antibodies and IgG Fc-containing fusion proteins*. Expert Opin Biol Ther, 2005. **5 Suppl 1**: p. S29-36.
207. Boye, J., T. Elter, and A. Engert, *An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab*. Ann Oncol, 2003. **14**(4): p. 520-35.
208. Fleischmann, R.M., *Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases: focus on rituximab*. Semin Arthritis Rheum, 2009. **38**(4): p. 265-80.
209. Grillo-Lopez, A.J., *Rituximab: an insider's historical perspective*. Semin Oncol, 2000. **27**(6 Suppl 12): p. 9-16.
210. Roll, P., T. Dorner, and H.P. Tony, *Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(6): p. 1566-75.
211. Gurcan, H.M., et al., *A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(1): p. 10-25.
212. Dobson, R., U.C. Meier, and G. Giovannoni, *More to come: humoral immune responses in MS*. J Neuroimmunol, 2011. **240-241**: p. 13-21.
213. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 394-403.
214. Hauser, S.L., et al., *B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2008. **358**(7): p. 676-88.
215. Naismith, R.T., et al., *Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial*. Neurology, 2010. **74**(23): p. 1860-7.
216. Berinstein, N.L., et al., *Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma*. Ann Oncol, 1998. **9**(9): p. 995-1001.
217. Breedveld, F., et al., *Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response*. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(9): p. 1119-28.
218. Byrd, J.C., et al., *Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance*. J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 791-5.
219. Lim, S.H., et al., *Rituximab administration following autologous stem cell transplantation for multiple myeloma is associated with severe IgM deficiency*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1971-2.
220. Vallerskog, T., et al., *Differential effects on BAFF and APRIL levels in rituximab-treated patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R167.
221. Quartuccio, L., et al., *Resistance to rituximab therapy and local BAFF overexpression in Sjogren's syndrome-related myoepithelial sialadenitis and low-grade parotid B-cell lymphoma*. Open Rheumatol J, 2008. **2**: p. 38-43.

222. Anolik, J., et al., *Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation*. Eur J Immunol, 2003. **33**(9): p. 2398-409.
223. Smiers, F.J., et al., *CD20 and CD40 mediated mitogenic responses in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 1996. **93**(1): p. 125-30.
224. Tokunaga, M., et al., *Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(2): p. 176-82.
225. Nishio, M., et al., *Delayed redistribution of CD27, CD40 and CD80 positive B cells and the impaired in vitro immunoglobulin production in patients with non-Hodgkin lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2007. **137**(4): p. 349-54.
226. Jak, M., et al., *CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death*. Leukemia, 2011. **25**(6): p. 968-78.
227. 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.
228. 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.
229. Hassan GS, M.Y., Mourad WM., *CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies*. Trends Immunol., 2009. 30(4): p.165-172.
230. Mach, F., et al., *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling*. Nature, 1998. **394**(6689): p. 200-3.
231. Lutgens, E., et al., *Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1313-6.
232. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
233. Lutgens, E., et al., *CD40 and its ligand in atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(4): p. 118-23.
234. Omari, K.M., R. Chui, and K. Dorovini-Zis, *Induction of beta-chemokine secretion by human brain microvessel endothelial cells via CD40/CD40L interactions*. J Neuroimmunol, 2004. **146**(1-2): p. 203-8.
235. Lutgens, E. and M.J. Daemen, *CD40-CD40L interactions in atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(1): p. 27-32.
236. 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.
237. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
238. 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.
239. 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.

240. Akiyama, T., et al., *The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance*. *Immunity*, 2008. **29**(3): p. 423-37.
241. 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.
242. Noss, E.H. and M.B. Brenner, *The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis*. *Immunol Rev*, 2008. **223**: p. 252-70.
243. Harigai, M., et al., *Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes*. *J Rheumatol*, 1999. **26**(5): p. 1035-43.
244. 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.
245. Kitagawa, M., et al., *Differential regulation of rheumatoid synovial cell interleukin-12 production by tumor necrosis factor alpha and CD40 signals*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(9): p. 1917-26.
246. Cho, M.L., et al., *Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(3): p. 776-84.
247. Min, D.J., et al., *Augmented production of chemokines by the interaction of type II collagen-reactive T cells with rheumatoid synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(4): p. 1146-55.
248. Durie, F.H., et al., *Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40*. *Science*, 1993. **261**(5126): p. 1328-30.
249. Kyburz, D., D.A. Carson, and M. Corr, *The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN mouse model of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(11): p. 2571-7.
250. Wakeland, E.K., et al., *Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 397-408.
251. 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.
252. Grammer, A.C., et al., *Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(10): p. 1506-20.
253. 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.
254. Higuchi, T., et al., *Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease*. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 9-12.
255. Kato, K., et al., *The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(7): p. 947-55.
256. Vakkalanka, R.K., et al., *Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 871-81.
257. Early, G., W. Zhao, and C. Burns, *Anti-CD40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of New Zealand black x New Zealand*

- white mice. Response correlates with the absence of an anti-antibody response. J Immunol, 1996. 157(7): p. 3159-64.*
258. Kalled, S.L., et al., *Anti-CD40 ligand antibody treatment of SNF1 mice with established nephritis: preservation of kidney function. J Immunol, 1998. 160(5): p. 2158-65.*
 259. Mohan, C., et al., *Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. J Immunol, 1995. 154(3): p. 1470-80.*
 260. Wang X, H.W., Schiffer LE, Mihara M, Akkerman A, Hiromatsu K, Davidson A., *Effects of anti-CD154 treatment on B cells in murine systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., 2003. 48(2): p. 495-506.*
 261. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 683-747.*
 262. Issazadeh, S., et al., *Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. J Immunol, 1998. 161(3): p. 1104-12.*
 263. Grewal, I.S., et al., *Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. Science, 1996. 273(5283): p. 1864-7.*
 264. 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.*
 265. Howard, L.M., et al., *Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. J Clin Invest, 1999. 103(2): p. 281-90.*
 266. Howard, L.M. and S.D. Miller, *Autoimmune intervention by CD154 blockade prevents T cell retention and effector function in the target organ. J Immunol, 2001. 166(3): p. 1547-53.*
 267. Samoilova, E.B., et al., *CD40L blockade prevents autoimmune encephalomyelitis and hampers TH1 but not TH2 pathway of T cell differentiation. J Mol Med (Berl), 1997. 75(8): p. 603-8.*
 268. Becher, B., M. Blain, and J.P. Antel, *CD40 engagement stimulates IL-12 p70 production by human microglial cells: basis for Th1 polarization in the CNS. J Neuroimmunol, 2000. 102(1): p. 44-50.*
 269. Ponomarev, E.D., L.P. Shriver, and B.N. Dittel, *CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. J Immunol, 2006. 176(3): p. 1402-10.*
 270. Tan, J., et al., *Activation of microglial cells by the CD40 pathway: relevance to multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 1999. 97(1-2): p. 77-85.*
 271. Becher, B., et al., *The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. J Exp Med, 2001. 193(8): p. 967-74.*
 272. Cho, J.H., *Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. World J Gastroenterol, 2008. 14(3): p. 338-47.*
 273. Danese, S., et al., *TNF-alpha blockade down-regulates the CD40/CD40L pathway in the mucosal microcirculation: a novel anti-inflammatory mechanism of infliximab in Crohn's disease. J Immunol, 2006. 176(4): p. 2617-24.*

274. Liu, Z., et al., *Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions.* J Immunol, 2000. **164**(11): p. 6005-14.
275. Stuber, E., W. Strober, and M. Neurath, *Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion.* J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 693-8.
276. Kasran, A., et al., *Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease.* Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(2): p. 111-22.
277. Challa, A., et al., *Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylke Burkitt lymphoma cells.* Blood, 2002. **99**(9): p. 3411-8.
278. 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.
279. van den Oord, J., et al., *CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma.* Am J Pathol, 1996. **149**(6): p. 1953-61.
280. Klein, G., et al., *The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia.* Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(2): p. 87-100.
281. Reinders, M.E., et al., *Proangiogenic function of CD40 ligand-CD40 interactions.* J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1534-41.
282. Cantwell, M., et al., *Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia.* Nat Med, 1997. **3**(9): p. 984-9.
283. Hock, B.D., et al., *Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies.* Cancer, 2006. **106**(10): p. 2148-57.
284. Roselli, M., et al., *Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(2): p. 610-4.
285. Younes, A., et al., *Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 135-41.
286. Mielczarek-Palacz, A., et al., *Imbalance in serum soluble CD30/CD30L and CD40/CD40L systems are associated with ovarian tumors.* Hum Immunol, 2013. **74**(1): p. 70-4.
287. Hassan, G.S., J. Stagg, and W. Mourad, *Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy.* Cancer Treat Rev, 2015. **41**(5): p. 431-40.
288. Baxendale, A.J., et al., *Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth.* Oncogene, 2005. **24**(53): p. 7913-23.
289. Turner, J.G., et al., *Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells.* J Immunol, 2001. **166**(1): p. 89-94.
290. Kennedy, M., et al., *CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages.* Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 370-8.
291. Cromme, F.V., et al., *Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas.* J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 335-40.

292. Khanna, R., et al., *Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 5782-5.
293. Hill, S.C., et al., *Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 41-50.
294. Donepudi, M., D.D. Quach, and M.B. Mokyr, *Signaling through CD40 enhances cytotoxic T lymphocyte generation by CD8+ T cells from mice bearing large tumors*. Cancer Immunol Immunother, 1999. **48**(2-3): p. 153-64.
295. Davies, C.C., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1010-9. Epub 2003 Oct 27.
296. Antoniadis, C., et al., *The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(8): p. 669-77.
297. Varo, N., et al., *Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **108**(9): p. 1049-52.
298. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1104-11.
299. Yellin, M., et al., *Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(1): p. 124-34.
300. Lederman, S., et al., *Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 3817-26.
301. Kirk, A.D., et al., *Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 686-93.
302. Law CL, G.I., *Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges*. Adv Exp Med Biol., 2009. **647**: p. 8-36.
303. Kirk, A.D., et al., *CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8789-94.
304. Monk, N.J., et al., *Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1275-80.
305. Sanchez-Fueyo, A., et al., *The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression*. Transplantation, 2002. **74**(6): p. 898-900.
306. Huang, W., et al., *The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(6): p. 1554-62.
307. Kalunian, K.C., et al., *Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(12): p. 3251-8.
308. Boumpas, D.T., et al., *A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 719-27.

309. Kawai, T., et al., *Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 114.
310. Tai, Y.T., et al., *Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11712-20.
311. Advani, R., et al., *Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4371-7.
312. Lewis, T.S., et al., *Distinct apoptotic signaling characteristics of the anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab and rituximab produce enhanced antitumor activity in non-Hodgkin lymphoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(14): p. 4672-81.
313. Adams, A.B., et al., *Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 542-50.
314. Watanabe, M., et al., *ASKP1240, a fully human anti-CD40 monoclonal antibody, prolongs pancreatic islet allograft survival in nonhuman primates*. Am J Transplant, 2013. **13**(8): p. 1976-88.
315. Al-Zoobi, L., et al., *Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface*. Int Immunol, 2014. **16**(8): p.451-465.
316. Anderson, D.R., et al., *Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(2): p. 705-8.
317. Bryant, A. and J. Moore, *Rituximab and its potential for the treatment of rheumatoid arthritis*. Ther Clin Risk Manag, 2006. **2**(2): p. 207-12.
318. Glennie, M.J., et al., *Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies*. Mol Immunol, 2007. **44**(16): p. 3823-37.
319. Hassan, G.S., et al., *Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses*. Curr Immunol Rev, 2009. **5**: p. 285-299.
320. 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. **27**(11): p.555-565.
321. Davis, T.A., et al., *Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment*. J Clin Oncol, 2000. **18**(17): p. 3135-43.
322. Cheung, M.C., et al., *Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**(2): p. 161-76.
323. Benoit, N. and W. Wade, *Increased inhibition of proliferation of human B cell lymphomas following ligation of CD40, and either CD19, CD20, CD95 or surface immunoglobulin*. J Immunopharmacology. 1996. **35**(2): p. 129-39.
324. Henn, V., et al., *The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1047-54.
325. Choi, W.S., O.H. Jeon, and D.S. Kim, *CD40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin alpha(IIb)beta(3)*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(6): p. 1364-71.

326. Menchen, L., et al., *Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn's disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand*. Gut, 2009. **58**(7): p. 920-8.
327. Ludewig, B., et al., *Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(12): p. 3137-43.
328. Azzariti, A., et al., *Potential predictive role of chemotherapy-induced changes of soluble CD40 ligand in untreated advanced pancreatic ductal adenocarcinoma*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 4681-6.
329. Eliopoulos, A.G., et al., *CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5503-15.
330. Bugajska, U., et al., *The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(18): p. 1381-95.
331. Milner, A.E., et al., *Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs: the role of FADD in activation of caspase-8 and synergy with death receptor ligands in ovarian carcinoma cells*. Cell Death Differ, 2002. **9**(3): p. 287-300.
332. Hayward, A.R., et al., *Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 977-83.
333. Elmetwali, T., et al., *CD40 ligand induced cytotoxicity in carcinoma cells is enhanced by inhibition of metalloproteinase cleavage and delivery via a conditionally-replicating adenovirus*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 52.
334. Foy, T., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 591-617.
335. Fuleihan, R.L., *The X-linked hyperimmunoglobulin M syndrome*. Semin Hematol, 1998. **35**(4): p. 321-31.
336. Fecteau, J.F. and S. Neron, *CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4621-9.
337. Neron, S., et al., *Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction*. Immunology, 2005. **116**(4): p. 454-63.
338. Pietravalle, F., et al., *Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 725-8.
339. Elmetwali, T., A. Salman, and D.H. Palmer, *NORE1A induction by membrane-bound CD40L (mCD40L) contributes to CD40L-induced cell death and G1 growth arrest in p21-mediated mechanism*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2146.
340. Chen, Y., et al., *Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(1): p. 106-17.
341. Wang, H.M., et al., *Scaffold protein JLP is critical for CD40 signaling in B lymphocytes*. J Biol Chem, 2015. **290**(9): p. 5256-66.

