

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Rôle du CD40 dans la mort cellulaire.

par

Malek Jundi

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

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

Avril, 2008

© Malek Jundi, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulée :

Rôle du CD40 dans la mort cellulaire.

présenté par :
Malek Jundi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marika Sarfati, président-rapporteur
Walid Mourad, directeur de recherche
Jacques Thibodeau, membre du jury

Résumé

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, appartenant à la famille du récepteur « Tumor Necrosis Factor », exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires dont les cellules B, les plaquettes, les cellules dendritiques ainsi que d'autres cellules présentatrices d'antigène. Le CD40 joue un rôle fondamental à tous les niveaux de la réponse immunitaire. La capacité de cette molécule de former des homodimères est primordiale pour plusieurs voies de signalisation. Des études antérieures ont démontré que le CD40 avait un impact direct dans l'induction de la mort de cellules malignes ou transformées. Or, outre l'induction de la mort cellulaire via la stimulation des récepteurs de la mort cellulaire tels que CD95/CD95 ligand, il a été démontré que le CD40 pouvait induire directement la mort cellulaire et ce, sans la synthèse de nouvelles protéines.

Le travail illustré dans ce mémoire porte sur l'étude du rôle du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire programmée ainsi que le mécanisme impliqué. Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de CD40 à la surface cellulaire et l'intensité de la mort cellulaire induite. Cependant, l'homodimérisation du CD40 n'est pas nécessaire pour l'induction de l'apoptose. Cette apoptose est significativement réduite en utilisant un antioxydant contre les espèces réactives oxygénées ou un inhibiteur de la cathepsine B.

Nos résultats démontrent ainsi une implication de CD40 dans la mort cellulaire programmée qui varie en fonction du type cellulaire. Par ailleurs, le mécanisme pourrait impliquer la cathepsine B. Cette étude pourrait aider à l'élaboration d'un traitement anti-tumoral.

Mots clés : CD40, mort cellulaire, Lymphocyte B, Cathepsine B.

Abstract

The CD40 is a type I phosphorylated-glycoprotein which belongs to the Tumor Necrosis Factor receptor family. CD40 is expressed on the surface of B cells and others antigen presenting cells. This receptor plays an important role in the immune response; it is a molecule that is capable of forming disulfide-linked homodimers (CD40/CD40) which are crucial for the initiation of many signalization pathways. Previous studies have illustrated that CD40 have a direct impact on the induction of death of malignant or transformed cells. This proves to be an interesting evidence of the efficiency of CD40 as an antitumor agent. The characterization of cell death mediated by CD40 demonstrated that this event was independent from the CD95/CD95 ligand association and the synthesis of *de novo* proteins.

The work illustrated in this thesis will focus on the study of the role of CD40 in the induction of programmed cell death. Our results showed that there is a correlation between the expression level of CD40 on the cell surface and the intensity of the induced cell death. However, CD40-mediated apoptosis was independent of the formation of CD40/CD40 homodimers. This apoptosis is significantly reduced when a general antioxidant, or a specific inhibitor of cathepsin B were used.

Our results suggest an implication of CD40 in the programmed cell death which varies according to different cell types, expressing CD40, which may involve an implication of cathepsin B. This study may go in keeping with the elaboration of antitumor treatment, using CD40.

Key words: CD40, cell death, B cells, Cathepsin B, Lysosome.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
Chapitre I Introduction	1
1.1 Le CD40	2
1.2 La structure du CD40.....	3
1.3 L'expression du CD40 à la surface des cellules	4
1.3.1 L'expression du CD40 sur les cellules B.....	4
1.3.2 L'expression du CD40 sur différents types cellulaires.....	5
1.4 L'appartenance du CD40 à la famille des Tumor necrosis factor receptors... 7	
1.5 Les différents ligands du CD40	8
1.5.1 Le CD40L (CD154).....	8
1.5.2 Le C4b Binding Protein (C4BP).....	9
1.5.3 Le Heat shock protein 70 (HSP70).....	9
1.6 La Signalisation intracellulaire	10
1.6.1 L'activation des PTK.....	10
1.6.2 L'activation des protéines sérine/thréonine kinase.....	11
1.6.3 Les Facteurs de transcription	12
1.6.4 Les protéines adaptatrices associées au CD40.....	13
1.6.4.1 Les TNFR-associated factors (TRAFs).....	13
1.6.4.2 Le rôle des janus tyrosine kinases (JAKs)	15
1.6.5 L'impact de l'oligomérisation du CD40.....	16
1.7 Le rôle du CD40 dans la réponse immunitaire	19
1.7.1 <i>In vitro</i>	19
1.7.2 <i>In vivo</i>	20
1.8 Le rôle du CD40 dans la mort cellulaire.....	22
1.8.1 L'apoptose vs la nécrose.....	22

1.8.2 Les récepteurs de la mort cellulaire	24
1.8.3 Les organelles impliquées dans la mort cellulaire programmée.....	26
1.8.3.1 La Mitochondrie :	26
1.8.3.2 Le lysosome:	28
1.8.3.3 Le réticulum endoplasmique :	29
1.8.4 Les protagonistes de la mort cellulaire programmée.....	31
1.8.4.1 Les caspases :	31
1.8.4.2 La famille des Bcl-2:.....	34
1.8.5 Les régulateurs de l'apoptose.	35
1.8.5.1 Les régulateurs anti-apoptotiques.	35
1.8.5.2 Les régulateurs pro-apoptotiques.	37
1.8.6 Le CD40 et la mort cellulaire:	37
1.9 L'hypothèse et les Objectifs de travail.	40
Chapitre 2 Matériels et Méthodes	42
Chapitre 3 Résultats.....	46
3.1 L'induction de la mort cellulaire par CD40 dans différents types cellulaires.	47
3.2 Le niveau d'expression du CD40 influence la mort cellulaire induite.	48
3.3 La nécessité de la cascade de signalisation du CD40 dans l'induction de la mort.....	49
3.4 L'oligomérisation du CD40 n'est pas requise dans l'induction de la mort cellulaire.	49
3.5 Le rôle des TRAF2/3 et 5 dans l'induction de la mort cellulaire par le CD40.	50
3.6 Le rôle des ROS dans l'induction de la mort.....	51
3.7 Le CD40 induit la mort cellulaire via cathepsine B	51
Chapitre 4 Discussion et Perspectives.....	58
Conclusion	64
Bibliographie.....	66

Liste des tableaux

Tableau I: Le rôle du CD40 dans les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.	5
---	---

Liste des figures

Figure 1-1 L'homologie entre le CD40 humain et le CD40 murin.....	4
Figure 1-2: La signalisation induite par le CD40.....	12
Figure 1-3: L'interaction entre le CD40 et les protéines adaptatrices.	13
Figure 1-4: La structure des membres de la famille des TRAFs.	14
Figure 1-5: La structure des radeaux lipidiques.....	17
Figure 1-6: Le rôle de l'homodimérisation du CD40 dans l'induction de la signalisation.	18
Figure 1-7: L'activation des cellules B par le CD40.	20
Figure 1-8: Le rôle du CD40 dans l'amorçage des cellules T et leur interaction avec les CPA.	21
Figure 1-9: Les différents types de mort cellulaire programmée (MCP).....	23
Figure 1-10: Les récepteurs de la mort cellulaire appartenant à la famille des TNFR.	24
Figure 1-11: L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose.	26
Figure 1-12: L'implication des organelles dans l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque ou intrinsèque.	30
Figure 1-13: La structure des différentes caspases.	31
Figure 1-14: Les sites de clivage des différentes capases.....	32
Figure 1-15: Les membres de la famille de Bcl-2.....	35
Figure 3-1: L'induction de la mort cellulaire par le CD40 dans les lymphomes de Burkitt.	53
Figure 3-2: Corrélation entre le niveau d'expression du CD40 et la sensibilité à la mort cellulaire.	54
Figure 3-3: La mort cellulaire induite via le CD 40 est indépendante de son homodimérisation.	55
Figure 3-4: La non-implication des TRAF2, 3 et 5 dans la mort cellulaire induite via le CD40.	56
Figure 3-5: L'implication du lysosome et du ROS dans la mort cellulaire induite par le CD40.	57

Liste des abréviations

aa	Acide aminée
Ac	Anticorps
AcM	Anticorps monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
CD40L	CD40 ligand
CG	Centre germinatif
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
DD	Death domain
DED	Death effector domain
EBV	Epstein Barr virus
ERK	Extracellular signal-regulated mitogen activated protein kinase
HEK	Human Embryonic Kidney
Ig	Immunoglobuline
JAK	janus tyrosine kinase
JNK	c-jun amino-terminal kinase
LMP	Lysosomal membrane permeabilization

MCP	Mort cellulaire programmée
MMP	Mitochondrial membrane permeabilization
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PI	Propidium iodide
PMA	Phorbol myristate acétate
PTK	protéine tyrosine kinase
RCB	Récepteur des cellules B
RCT	Récepteur des cellules T
ROS	Reactive oxygen species
TM	Transmembrane
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF receptor
TPA	Tétradécanoylphorbol acétate
TRAF	TNFR associated factor

*Je dédie ce mémoire à ceux qui m'ont
dédié toute leur vie : mon père,
Zouheir Jundi, et ma mère, Sana
Hammoud Jundi.*

Remerciements

Ma reconnaissance va à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce projet ainsi qu'à l'écriture du mémoire.

Tout particulièrement, je voudrais remercier et témoigner toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Dr. Walid Mourad, Ph.D., pour m'avoir donné ma chance de percer, d'avoir cru en moi et contribué à mon éveil scientifique. J'aurais toujours le privilège de dire que j'ai été dirigé par le Dr. Mourad et de le considérer comme un mentor.

De plus, je voudrais exprimer toute ma gratitude envers Amal Nadiri, Ph.D., pour sa contribution majeure à la rédaction de ce mémoire. J'espère que je pourrais toujours être à la hauteur de la confiance qu'elle m'a accordé en un si court laps de temps. Je sais qu'un remerciement digne de Molière ne t'impressionnera pas, alors je vais me contenter d'un gros merci et d'une « bonne chance » dans ta nouvelle vie. Je sais que tu seras de taille pour relever ce défi. De plus, je voudrais dire merci, aux membres passés et présents durant ma présence au laboratoire du Dr. Mourad pour avoir créé un esprit de complicité.

Finalement, en plus de remercier ma famille directe, mes parents (Zouheir et Sana), mes frères, ma sœur (Mazen, Maher et Maya) et mes amis, je voudrais également remercier ma deuxième famille du CHUM, campus Hôpital St-Luc, pour leur professionnalisme et pour m'avoir donné un milieu de travail de rêve. Particulièrement, Dr. Nathalie Grandvaux, Ph.D., et Karine Fink pour leurs nombreux conseils et dont la présence et le sourire inspirent la confiance en soi.

Merci à Tous,

Malek Jundi

Chapitre 1 Introduction

Notre organisme s'est doté d'un système de défense efficace contre les microorganismes qui l'entourent. La réponse immunitaire innée est immédiate contre les nouveaux pathogènes, tandis que la réponse immunitaire adaptée est plus lente car, elle nécessite la production de cellules effectrices spécifiques contre les pathogènes. De plus, la réponse adaptée induit la génération de cellules mémoires pour empêcher une deuxième infection par ces mêmes pathogènes. Par conséquent, l'immunité innée représente notre première ligne de défense et repose généralement sur une réaction non-spécifique (phagocytose) des macrophages et des granulocytes contre les divers pathogènes. En revanche, l'immunité adaptée représente une réponse plus spécifique qui peut être directe, immunité cellulaire, ou indirecte, immunité humorale. Ainsi, la réponse immunitaire humorale, à l'aide d'anticorps, passe par l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes B, et les lymphocytes T. Or, le CD40 et son ligand (CD154) joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire nécessitant un contact cellulaire.

1.1 Le CD40

Le CD40, est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille de "tumor necrosis factor receptor" (TNF-R), fut découverte entre 1985 et 1986 [1]. Ainsi, ce récepteur de type I dont sa région carboxyterminale est intracellulaire a été découvert à l'aide de deux anticorps monoclonaux (AcM) différents, le S2C6 (Paulie S et al., 1985 [2]) et le G28.5 (Clark et al., 1986 [3]). De plus, ce récepteur possède un poids moléculaire qui oscille entre 37 et 50 kDa. Dès lors, le CD40 (CDw40, Bp50) fut associé à la surface de cellules provenant du carcinome de la vessie et des lymphocytes B. Or, en 1987, Gordon et al. [4] ont démontré que l'antigène découvert par Paulie et par Clark avait les mêmes fonctions. Puis, en 1989, l'ADNc du CD40 fut isolé par Stamenkovic et al. [5]. En deux décennies, l'intérêt pour le CD40 n'a cessé de s'accroître, en regardant les 7 608 publications sur *PubMed* en 2007.

1.2 La structure du CD40

Le gène codant pour le CD40 humain est situé sur le chromosome 20 (q11-20q13-2) [6], l'ARNm correspondant a une taille de 1.5 kb et est transcrit en une protéine de 277 aa. La protéine du CD40 est composée de trois régions : la région extracellulaire (EC) de 193 aa (incluant 20 aa de séquence « leader »), la région transmembranaire (TM) de 22 aa, et la région intracellulaire (IC) composée de 62 aa (Figure 1-1, p. 4). Le CD40 humain (hCD40) possède une homologie de 62% avec le CD40 murin (mCD40) (Figure 1-1, p. 4). La région intracellulaire du CD40 humain possède une homologie de 78% avec celle du murin tandis que les 32 aa carboxyterminaux sont complètement conservés entre les deux espèces (Figure 1-1, p. 4). Dans la séquence du CD40, on retrouve 20 résidus cystéines localisés dans la région EC, ce qui représente une caractéristique des membres de la famille des TNFRs. On retrouve deux sites de glycosylation dans la région EC du hCD40 dont un site est conservé chez le mCD40 [7]. Par ailleurs, la conservation de ces 20 résidus cystéines chez le hCD40 et mCD40 suggérerait un repliement semblable du CD40 chez les deux espèces [6].

```

hCD40 : MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECL : 60
mCD40 : MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCH : 60

hCD40 : PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCV : 120
mCD40 : PCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCTCKEGQHCTSKDCEACA : 120

hCD40 : LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTN : 180
mCD40 : QHTPCIPGFGVMEMATETTTDTVCHPCPVGFFSNQSSLFEKCPWTSCEDKNLEVLQKGTG : 180

hCD40 : KTDVVCGPQDRLRALVVVPIIFGILFAILLVLFVIKKVAKKPTNKAPHP----KQEPQEI : 236
mCD40 : QTNVICGLKSRMRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKVVKKPKDNEILPPAARRQDPQEM : 240

hCD40 : NFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ----- : 277
mCD40 : ---EDYPGHNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV- : 289

```

Figure 1-1 L'homologie entre le CD40 humain et le CD40 murin.

Les aa sous-lignés dans l'alignement des séquences du CD40 humain (hCD40) et du CD40 murin (mCD40) représentent la séquence « leader » des deux peptides concernés. De plus, les aa surlignés en jaune représentent les résidus conservés entre les deux espèces. Les résidus se trouvant dans la boîte se situent dans la région transmembranaire.

1.3 L'expression du CD40 à la surface des cellules

1.3.1 L'expression du CD40 sur les cellules B

Suite à la découverte du CD40 sur les lymphocytes B, il a été établi que ce dernier est exprimé sur toutes les lymphocytes B indépendamment de leur stade de développement et de leur localisation [8]. De plus, le rôle du CD40 dans les lymphocytes B varie selon leur stade de développement [6]. Par ailleurs, les lymphocytes B de l'amygdale ou les cellules B transformées peuvent sécréter du CD40 soluble (CD40s) [8]. Ainsi, le CD40s pourra s'associer avec son ligand le CD154 à la surface des lymphocytes T [8].

1.3.2 L'expression du CD40 sur différents types cellulaires

Longtemps associé aux lymphocytes B, le CD40 possède une expression plus diversifiée. On le retrouve sur la plupart des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques [6]. Ainsi, le CD40 est exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques et les monocytes [6]. Le CD40 est essentiel à la maturation des cellules dendritiques en cellules présentatrices [6]. On a aussi détecté le CD40 à la surface de différents clones de lymphocyte T : les CD4⁺, les CD8⁺, les CD4⁺/CD8⁺ et les RCT⁺. De plus, l'expression du CD40 à la surface des cellules tel que les basophiles, les éosinophiles, les cellules épithéliales, endothéliales, les fibroblastes a été extensivement documenté dans la littérature [6, 8, 9]. Par ailleurs, le CD40 est aussi exprimé dans différents carcinomes [6, 8]. Cependant, son rôle, ainsi que ses voies de signalisation, varient d'une cellule à l'autre (Tableau I, p. 5) [6, 8, 9].

Tableau I: Le rôle du CD40 dans les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.

Différents types de cellules	L'effet de la stimulation via le CD40
Les Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sécrétion de cytokines ✓ Production de NO ✓ Production de métalloprotéinase ✓ Stimulation de l'activité pro-coagulante des monocytes
Les cellules dendritiques / Cellules de Langerhans	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Croissance et survie ✓ Expression de molécules co-stimulatrices ✓ Amplification de la production de cytokines
Les cellules endothéliales (ex: HUVEC)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Amplification de CD54, CD62E et CD106 ✓ Stimulation de l'activité pro-coagulante ✓ Costimulation des cellules T ✓ Amplification de la production de IL-6, GM-CSF
Les cellules épithéliales du rein	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sécrétion de cytokines et chimiokines: IL-6, GM-CSF, IL-8, MCP-1, RANTES
Les Fibroblastes des poumons	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Amplification d'IL-6, IL-8 et NFkB
Les Hépatocytes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Induction de l'expression de FASL

Ce tableau est un bref sommaire de l'effet de l'induction du CD40 exprimé à la surface de quelques cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. (inspiré de *van Kooten & Banchereau, 2000*).

1.3.3 La régulation de l'expression du CD40

Habituellement, le CD40 est exprimé constitutivement à la surface des cellules [8]. Cependant, plusieurs stimuli peuvent induire son expression tel que les cytokines : Interferon gamma (IFN γ), les interleukines (IL-1,2 et -4) et le tumor necrosis factor alpha (TNF- α) [8]. Les autres stimuli qui influencent l'activation du CD40 inclus le granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), les esters de phorbol, le tétradécanylphorbol acétate (TPA) ou Phorbol Myristate Acétate (PMA), les anti-corps contre l'immunoglobuline M (IgM) ou le CD20 [8]. De plus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP-1) et le *mycobacterium tuberculosis bacilli* induisent aussi l'expression du CD40 [8]. On a découvert que les cellules pouvaient générer plusieurs isoformes du CD40 lors de l'épissage alternatif du gène du CD40, ce qui a pour effet de créer cinq isoformes du CD40 murin et quatre isoformes connus du CD40 humain [10]. Les isoformes majeures du CD40, l'isoforme I et II sont du à un épissage alternatif entre les exons 5 et 9. L'isoforme II ne contient que 19 cystéines dans la région EC. De plus, à cause de l'épissage, les régions transmembranaire et intracellulaire sont abolies dans l'isoforme II et sont remplacées par 38 aa distincts. Ceci a pour effet d'abolir toute signalisation intracellulaire par cette isoforme [10]. Par ailleurs, l'isoforme II du CD40 murin est conservé chez l'humain [10]. Ainsi, Tone, M. et al. suggèrent, tant chez l'humain que chez la souris, que l'isoforme I est actif tandis que l'isoforme II agit comme un inhibiteur du premier isoforme en accélérant sa dégradation [10]. Le CD40 a été aussi trouvé sous forme soluble dans le surnageant des cellules B activées *in vitro* [11]. Donc, outre la régulation transcriptionnelle, le CD40 est aussi sujet à la régulation post-traductionnelle.

1.4 L'appartenance du CD40 à la famille des Tumor necrosis factor receptors

La grande famille des « Tumor Necrosis Factor Receptor » (TNFR), sont des protéines transmembranaires glycophosphorylées de type I, intervenant dans l'apoptose, la prolifération et/ou la survie cellulaire. De plus, cette famille induit la sécrétion de cytokines, de protéines co-stimulatrices et l'amplification de l'expression des molécules d'adhésion durant la réponse immunitaire [12]. L'homologie entre les différents membres de la famille des TNFRs (entre 25 et 30%) se retrouve dans la partie extracellulaire [12-15]. Cette homologie se résume dans la répétition de domaine riche en cystéine « Cysteine-rich domain CRD », ces cystéines se répartissent dans deux modules distincts, A et B qui peuvent créer un pont disulfure (A1, B1) ou deux ponts disulfures (A2, B2) [15]. Le regroupement et l'association de ces deux modules et sous-modules est responsable de la spécificité de l'interaction entre le récepteur et son ligand respectif [15]. Les TNFRs diffèrent dans la partie cytoplasmique, ce qui leurs confèrent une diversification supplémentaire de leur fonction. Ainsi, les récepteurs tels que FAS, TRAIL et TNFR-1 possèdent un « Death Effector Domain » (DED) pour activer la mort cellulaire. Tandis que, les récepteurs tels que CD40, OX40 et TNFR-2 s'associent plutôt avec des TNFR-associated factors (TRAFs) pour induire des réponses inflammatoire [12, 14]. De plus, l'activation des récepteurs de cette superfamille intervient suite à une association du récepteur à son ligand respectif lui aussi appartenant à la famille des TNFs [16]. Le ligand du TNFR, TNF, sont généralement des protéines transmembranaires de type II ou solubles [16, 17]. Par ailleurs, plusieurs TNFRs, comme TNFR1 et TNFR2, peuvent posséder plus qu'un ligand [16, 17].

1.5 Les différents ligands du CD40

1.5.1 Le CD40L (CD154)

Le principal ligand du CD40, CD154, communément appelé: CD40L, gp39, T-BAM, ou TRAP, a été cloné en 1992. Le CD154 est une glycoprotéine transmembranaire de type II [9]. L'ADNc du CD154 code pour une protéine de 261 aa formée de trois régions : EC (215 aa), TM (22 aa) et IC (22 aa) [6]. Il y a 78% d'homologie de séquence entre le CD154 humain et murin [6]. Sous sa forme membranaire le CD154 possède un poids moléculaire de 33 kDa. De plus, le CD154 peut être exprimé sous forme soluble (31 et/ou 18 kDa) tout en préservant sa capacité de former un trimère, son interaction avec le CD40 et ainsi ses fonctions biologiques [6]. Il a été démontré que le CD154 soluble (CD154s) ne provient pas du clivage du CD154 membranaire (CD154m) exprimé à la surface de la cellule [18-21]. Donc, le CD154s est formé suite un clivage protéolytique dans le cytoplasme des cellules concernées [18-21]. Ainsi, la régulation du CD154s est indépendante de la régulation du CD154m [18-21]. Le CD154 appartient à la famille des TNFs. Sa partie extracellulaire possède une homologie de 20% avec celle des autres membres des TNFs [13]. Cependant, malgré cette faible homologie, la structure tridimensionnelle du CD154 est semblable à celle du TNF-alpha et du LT-alpha [6]. Comme le CD40, le CD154 est exprimé sur la plupart des cellules (basophiles, éosinophiles, cellules tueuses naturelles, macrophages) [6]. On retrouve le CD154 sur les lymphocytes T CD4⁺ activées et une petite population de CD8⁺; cependant, on ne retrouve pas le CD154 sur les cellules T au repos [6]. Selon une étude par mutagenèse, le CD40 et le CD154 se lient à l'aide des résidus acides (D84, E114, E117) pour le CD40 et des résidus basiques (K143, R203, R207) pour le CD154 [6, 8]. Cependant, présentement, il n'y a pas d'études cristallographiques sur l'interaction du CD40 avec le CD154 pour tout confirmer. La formation du trimère du CD154, comme pour les membres du TNF, induit l'oligomérisation du CD40 qui est une étape crucial pour l'initialisation de plusieurs voies de signalisation [8].

1.5.2 Le C4b Binding Protein (C4BP)

Le C4b binding protein est principalement synthétisé dans le foie par des hépatocytes ; il peut être aussi produit par des monocytes activés [22]. Le C4BP peut se retrouver sous forme soluble ou membranaire [22] et son principal rôle est de se lier au récepteur du complément 4b (C4b) et de promouvoir sa dégradation [23]. Ainsi, le C4BP inhibe l'enzyme C3 convertase dans les voies de signalisation requises pour l'activation des compléments [22]. De plus, le C4BP forme un héptamère lié par des ponts bisulfures [24]. Outre le C4b, C4BP s'associe aussi avec les protéines S et les héparines bactériennes [22]. Or, Brodeur et al ont réussi à démontrer que le C4BP a le potentiel d'être un nouveau ligand pour le CD40 [25]. Ainsi, selon leur étude, la chaîne alpha du C4BP semble se lier à CD40 sur un site de liaison différent que celui CD40L. De plus, le C4BP semble se retrouver dans le centre germinatif des amygdales humaines et se lie aux lymphocytes B normaux (via le CD40). L'association du C4BP avec le CD40 induirait une amplification du CD54, CD86 et une commutation de classe des Igs [25]. Cependant, Williams et al suggèrent que le C4BP ne forme pas de lien direct avec le CD40, mais, plutôt, il y aurait une formation d'un complexe avec le CD154s. Ainsi, selon eux, c'est ce nouveau complexe (C4BP-CD154s) qui s'associerait avec le CD40 à la surface des cellules cholangiocytes, cellules épithéliales de la voie biliaire. Par conséquent, l'association du complexe bloquerait toutes les voies de signalisation essentielles via le CD40, ce qui a pour effet de bloquer la prolifération mais pas la survie cellulaire.

1.5.3 Le Heat shock protein 70 (HSP70)

Les HSP70 sont des chaperons moléculaires qui sont les plus conservés [26]. Les chaperons moléculaires jouent un rôle essentiel dans la synthèse, la translocation ainsi que le repliement des protéines sous des formes caractéristiques à leurs

fonctions [26]. Il y a de plus en plus d'études qui font référence au HSP70 microbien comme ligand du CD40. Selon Wang et al c'est uniquement le HSP70 microbien qui se lie au CD40 afin de stimuler la sécrétion des chimiokines CC dans les monocytes et les cellules « Human Embryonic Kidney » (HEK) 293 [26]. De plus, on a récemment rapporté que HSP70 amplifie le niveau d'ARNm du « Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like-3G » (APOBEC3G), un facteur antiviral qui change la cytidine rétrovirale en une uridine, via son engagement avec le CD40 [27]. Par ailleurs, Nolan et al ont utilisé deux modèles de souris knock out (KO), des souris CD40^{-/-} ou des CD154^{-/-} pour démontrer que l'activation du CD40 était indépendante du CD40L lors d'une septicémie polymicrobienne [28]. Selon eux, le HSP70 de l'*E. Coli* est le ligand probable qui active le CD40. Par conséquent, on peut conclure que le CD40 possède d'autres ligands que le CD40L.

1.6 La Signalisation intracellulaire

Le CD40 est impliqué dans l'activation indirecte de différentes voies de signalisation grâce à son association aux *TNFR-associated factors (TRAFs)* puisqu'il ne possède pas de domaine kinase [6, 8, 9]. Ainsi, l'engagement du CD40 mène à l'activation de différentes protéines telles que les protéines tyrosine kinase (PTK), les protéines sérine/thréonine kinase et les STATs (Figure 1-2, p. 12).

1.6.1 L'activation des PTK.

Faris et al ont démontré que des PTK tels que Lyn, Syk et Fyn sont phosphorylées suite à un engagement du récepteur CD40 sur les cellules B, provenant de lymphome de Burkitt ou transformées avec le virus d'Epstein Barr [29]. De plus, la liaison du CD40 induit la phosphorylation de la phospholipase $Cy2$ dans les cellules B [30, 31], ce qui induit la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). Or, la production de IP3 stimule l'augmentation du

niveau du calcium intracellulaire ce qui induit l'activation des isoformes de PKC-calcium dépendantes. Bien que les src kinases (Lyn) se trouvent en amont des phospholipases $Cy2$ et que les deux sont activées par le CD40, l'implication des src kinases dans la cascade des phospholipases n'a pas bien été démontrée. Cependant, une synergie entre les src kinases et les phospholipases est requise pour l'activation du Ras [30]. De plus, l'engagement du CD40 induit l'activation du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [32] qui induit généralement un signal de survie [9].

1.6.2 L'activation des protéines sérine/thréonine kinase

Le CD40 induit l'activation de différentes MAPKs soit le « stress-activated protein kinase/c-jun amino-terminal kinase » (SAPK/JNK), le p38 MAPK et l'« extracellular signal regulated mitogen activated protein kinase » (ERK). Glubins et al ont démontré que le CD40 induit l'activation d'ERK1 et ERK2 dans des cellules B murine tel que les WEHI-231 [30]. Cependant, Grammer et al reportent que le degré d'activation d'ERK2 est constamment plus élevé qu'ERK1 [9]. La phosphorylation du JNK a été rapportée dans les cellules B murine de la rate, tels que les WEHI-231, les M12, les cellules B amygdaliennes activées, et les cellules Daudi [33]. Pour ce qui est de JNK, l'engagement du CD40 permet l'activation du JNK dans les cellules B humaines activées uniquement [33]. Contrairement aux ERKs, c'est l'isoforme JNK1 qui a le niveau d'activation le plus élevé.

1.6.3 Les Facteurs de transcription

L'engagement du CD40 induit plusieurs voies de signalisation qui mènent de manière ultime à l'activation de trois principaux facteurs de transcriptions [NFκB, cAMP response element (CRE) et AP-1] [9] (Figure 1-2, p. 12). L'implication du CD40 dans l'activation des différentes voies de signalisation est vague et mène à la confusion. Ainsi, le résultat de l'engagement du CD40 peut varier selon le stade de développement des lymphocytes B, l'espèce ainsi que le modèle cellulaire étudié [8, 9].

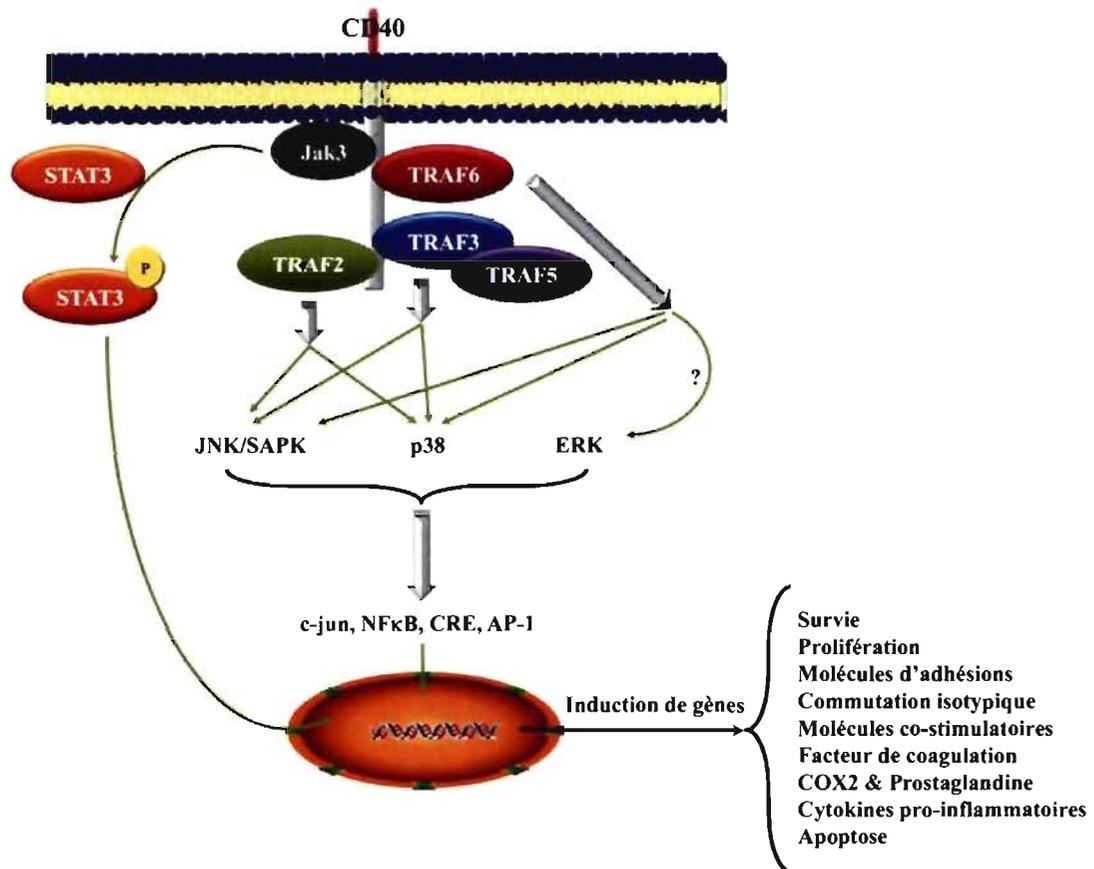


Figure 1-2: La signalisation induite par le CD40.

En se liant avec son ligand, le CD40 induit, suite au recrutement des TRAFs et Jak3, l'activation de plusieurs protéines kinases qui activent divers facteurs de transcriptions afin de mener à terme l'activité cellulaire.

1.6.4 Les protéines adaptatrices associées au CD40

Puisque, le CD40 ne possède pas de domaine kinase, sa queue cytoplasmique contient plusieurs régions spécifiques à son interaction avec des protéines adaptatrices telles que les *TRAFs* et *JAK-3* (Figure 1-3, p. 13).

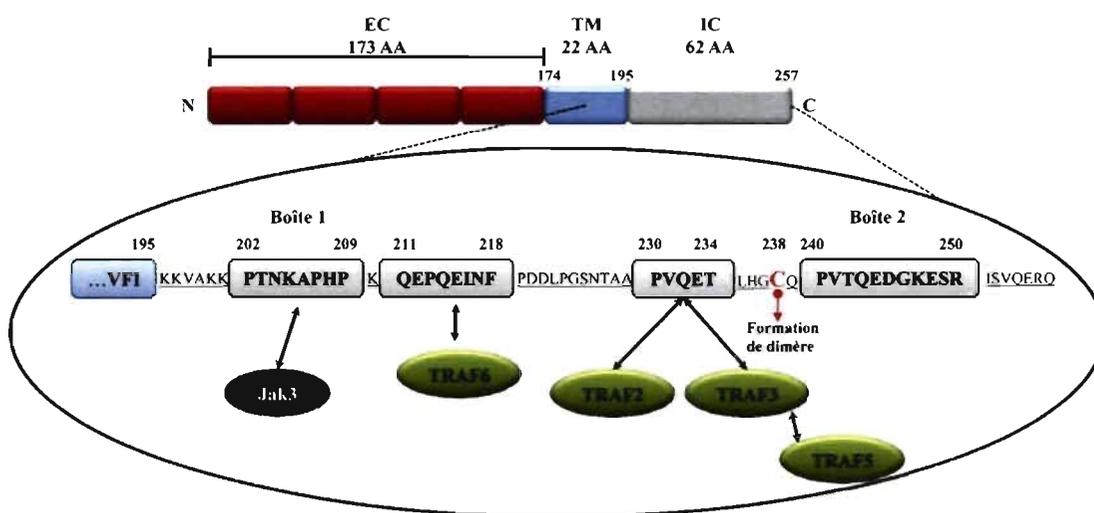


Figure 1-3: L'interaction entre le CD40 et les protéines adaptatrices.

Les protéines adaptatrices qui interagissent avec le CD40 se lient dans des régions spécifiques situées dans la queue cytoplasmique du CD40. Nous pouvons observer que le TRAF5 se lie de manière indirecte au CD40. Par ailleurs, il y a aussi la présence d'une cystéine qui est nécessaire à la dimérisation du CD40.

1.6.4.1 Les TNFR-associated factors (TRAFs)

Les TRAFs sont des protéines adaptatrices cytoplasmiques qui s'associent avec les TNFRs pour promouvoir l'activation des lymphocytes. Jusqu'à présent, on a découvert six membres de la famille des TRAFs : TRAF 1-2-3-4-5-6. Les six membres ont une structure similaire. Comme on peut le voir dans la Figure 1-4 (p. 14), ils possèdent tous un domaine C-terminal qui s'associe aux récepteurs et un domaine N-terminal caractérisé par la formation d'une super-hélice (coiled-coil leucine-zipper) qui permet la formation d'un homo- et hétéro-trimère [34]. Par contre, selon Aggarwal c'est la région C-terminal qui accomplit les deux rôles [17].

Mise à part les domaines N-terminal et C-terminal, les TRAF2, -3, -4, -5 et -6 possèdent aussi un domaine « zing finger » variable qui est responsable de l'association avec les protéines kinases et l'association avec les facteurs de transcriptions [34]. Il y a aussi un domaine N-terminal nommé RING « Really Interesting New Gene Domain » qui est riche en cystéine, important pour l'activation des voies de signalisation. Ainsi, les TRAFs dont le domaine RING est aboli bloquent l'activation de plusieurs voies de signalisation par les récepteurs [35-37]. Récemment, Xu et al ont découvert une nouvelle protéine qui possède aussi un domaine RING N-terminal et un domaine « zing finger » qu'ils ont prénommée TRAF7 [38, 39]. La caractérisation du TRAF7 a démontré qu'il active spécifiquement MEKK3 (MAP/ERK kinase kinase 3), ce qui mène à l'activation d'AP-1 et de CHOP (C/EBP-homologous protein) [38]. De plus, TRAF7 induit l'apoptose d'une manière caspase dépendante [38].

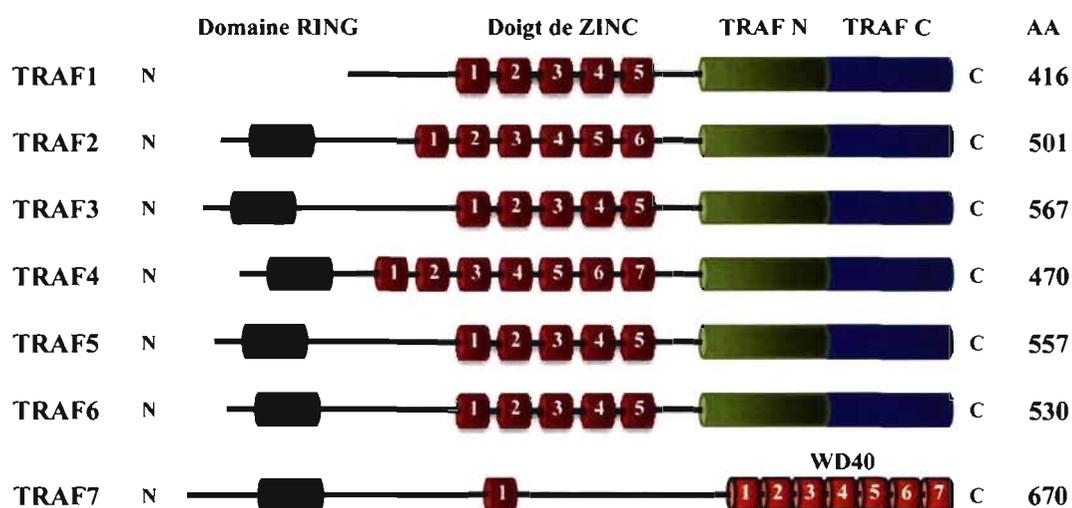


Figure 1-4: La structure des membres de la famille des TRAFs.

Les membres de la famille des TRAFs ont tous des structures similaires composées de quatre régions : un domaine TRAF N-terminal et C-terminal, un domaine « Zing finger » et un domaine RING. Les domaines TRAF N-terminal et C-terminal sont nécessaires pour l'interaction avec diverses protéines tandis que le domaine RING est important dans l'activation des voies de signalisations. Le TRAF7 possède uniquement deux régions caractérisant la famille des TRAFs puisque sa région C-terminale est composée de sept répétitions du domaine WD40.

Le rôle des TRAFs varie en fonction du type cellulaire. La caractérisation du rôle des TRAFs dans l'induction des voies de signalisation est complexe puisqu'on ne peut pas associer un TRAF à une unique voie de signalisation donnée car il y a un chevauchement dans le champ d'action des différents TRAFs [9, 17, 34, 35]. Par exemple, TRAF2 est identifié comme le responsable de l'activation du NFκB. Cependant, l'activation du NFκB par le CD40 n'est pas complètement abolie dans les cellules déficientes en TRAF2 [40]. Par ailleurs, le TRAF3 semble avoir un rôle ambigu car il régule négativement la signalisation via le CD40. Or, le TRAF3 induit positivement la signalisation via LMP-1, un récepteur qui mime le rôle du CD40 dans les cellules B transfectées avec l'EBV [34, 40, 41].

De manière générale, l'interaction du CD40 avec les TRAFs induit l'activation du p38 MAPK, du JNK et du NFκB [8]. Du point de vue du chevauchement des voies de signalisation, les TRAF2, -5 et -6 induisent l'activation du JNK et du NFκB et le TRAF3 est requis pour l'activation de p38 et de JNK [8]. Selon le groupe de Kehry, une activation optimale du NFκB et de JNK dépendrait des TRAF1, -2, -3 et -6. Par ailleurs et toujours selon ce groupe, l'activation du p38 MAPK dépendrait principalement de TRAF6. Le TRAF2 semble être impliqué dans la production de molécule d'adhésion telle que l'ICAM-1 via le NFκB dans un environnement où l'association de TRAF3 ne semble pas nécessaire [42]. Il y a aussi la découverte d'une protéine intermédiaire RIP-2 (Receptor-Interacting Protein 2), une kinase sérine/thréonine, qui interagit avec les TRAF1, -5, -6 [43]. Une surexpression du RIP-2 induirait une activation du NFκB et la mort cellulaire [43]. Par ailleurs le domaine RING du TRAF6 humain semble posséder la fonction de ligase E3 de l'ubiquitine [40, 44], pouvant induire l'ubiquitinylation et la dégradation de TRAF6.

1.6.4.2 Le rôle des janus tyrosine kinases (JAKs)

Outre les TRAFs, CD40 est aussi capable de se lier avec la famille de *janus tyrosine kinase* (JAK) [6]. Cette famille contient trois membres JAK -1, -2, -3 qui induisent la phosphorylation des protéines STATs (*signal transducer and activator of*

transcription) [8]. Cette famille comprend six membres, pouvant se lier directement à l'ADN sur des sites spécifiques ou activer des facteurs de transcription [45]. Schönbeck et al rapportent plusieurs évidences sur l'induction de STAT-6 par le CD40 [8]. Par ailleurs, Choudhury et al démontrent que dans les cholangiocytes, le CD40 conduit à l'activation de STAT3 via JAK2 [46].

1.6.5 L'impact de l'oligomérisation du CD40.

L'oligomérisation ou la dimérisation des récepteurs est nécessaire pour la signalisation dans la cellule. L'amplification de ce signal par le récepteur peut être induite de plusieurs façons. Les radeaux lipidiques peuvent servir de plateforme de concentration pour plusieurs récepteurs tels que les récepteurs des cellules T (RCT), les récepteurs des cellules B (RBC), les récepteurs EGF, les récepteurs de l'insuline, etc.

Les radeaux lipidiques sont caractérisés par des micro-domaines enrichis de cholestérol et de glycosphingolipides situés sur la membrane cytoplasmique (Figure 1-5, p. 17). Ainsi, lors de l'interaction avec son ligand, le récepteur se dirige vers les radeaux où il peut recruter des kinases et des protéines adaptatrices [47, 48]. Par ailleurs, les radeaux peuvent protéger les voies de signalisation induites par le récepteur en bloquant l'action inhibitrice des phosphatases qui ne peuvent migrer vers les radeaux [48]. Or, dans les lymphomes B non-Hodgkinien, le CD40 induit de manière constitutive NF κ B lorsqu'il se retrouve dans un complexe, « signalosome », à l'intérieur des radeaux lipidiques [49].

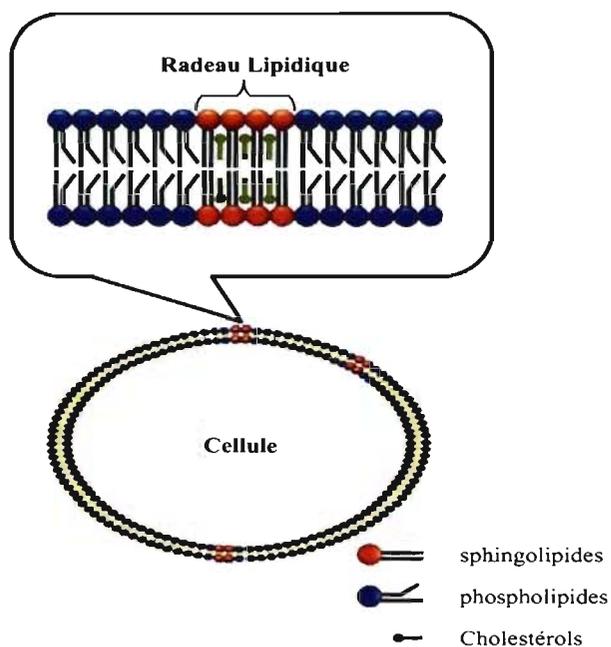


Figure 1-5: La structure des radeaux lipidiques.

Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines riches en cholestérol et en glycosphingolipides et se retrouvent dispersés à travers la membrane cellulaire.

Depuis la découverte de l'homodimère du CD40 formé constitutivement, plusieurs études ont été consacrées à l'analyse du rôle de cet homodimère et de sa génération. Ainsi, il a été prouvé que l'homodimérisation du CD40 est nécessaire pour l'activation du phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) qui par la suite régule l'expression de B7.2 (CD86) dans les cellules Bjab [50]. Ainsi, le traitement des cellules Bjab avec l'iodoacétamide bloque l'homodimérisation du CD40, ce qui a pour effet d'inhiber la phosphorylation de PI-3K. D'autre part, l'inhibition de l'homodimérisation n'affecte pas la phosphorylation de la MAP kinase p38. L'utilisation de l'iodoacétamide comme inhibiteur démontre que la formation du dimère (CD40/CD40) requiert un pont disulfure qui se crée entre deux cystéines. Or, il a été découvert qu'une mutation spécifique de la cystéine (C6Q) dans la partie extracellulaire du CD40 des cellules du carcinome de la vessie (HU549-TBC) empêcherait la formation du dimère. De plus, il a été démontré qu'une mutation spécifique de la cystéine intracellulaire (C238) pouvait empêcher la formation de

CD40/CD40 homodimère [51]. Par ailleurs, l'expression de ce mutant du CD40 par les cellules HEK 293 inhiberait l'expression de l'ARNm de l'IL-8 [51].

Il apparaît donc que le niveau d'oligomérisation du CD40 est important dans le fonctionnement du CD40 (Figure 1-6, p. 18).

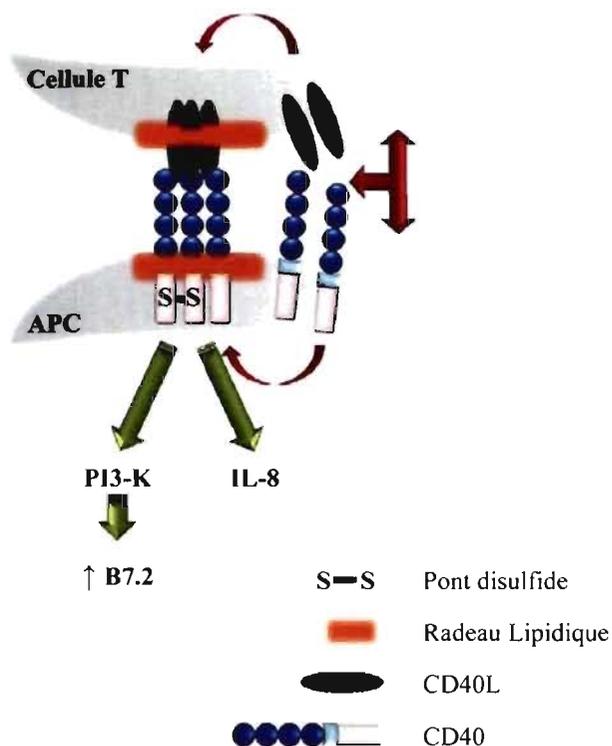


Figure 1-6: Le rôle de l'homodimérisation du CD40 dans l'induction de la signalisation.

L'interaction entre le CD40 et le CD40L mène à leur translocation dans les radeaux lipidiques. La localisation du CD40 dans les radeaux lipidiques mène à l'activation de voies de signalisation qui sont dépendantes de l'homodimérisation du CD40

1.7 Le rôle du CD40 dans la réponse immunitaire

1.7.1 *In vitro*

Le CD40 joue un rôle important dans l'activation des lymphocytes B. Les études *in vitro* faites sur le fonctionnement du CD40 ont été rendues possibles grâce à la caractérisation et l'isolation de sous-populations de lymphocytes B [52]. CD40 est un important régulateur de la réponse immunitaire, son engagement sur la surface des lymphocytes B induit leur prolifération, leur différenciation et la production d'immunoglobuline (Ig) (dans les cellules B matures et immatures) [6]. De plus, le CD40 induit la reprise de l'activité de la télomérase dans les cellules B mémoires, ce qui a pour conséquence d'augmenter leur durée de vie [53]. Ainsi, l'engagement du CD40 induit un signal de survie, la différenciation des cellules B dans les centres germinaux, la permutation de classes des Igs (Isotype switching) ainsi que la sélection et la maturation en cellules B mémoires [6]. Le CD40 empêche aussi la différenciation terminale des cellules B en plasmocytes [54, 55]. Les effets directs de l'engagement du CD40 sur les cellules B sont la production de cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α , LT- α), l'induction de l'expression de molécules d'adhésion (ICAM) et des récepteurs de co-stimulation (CD23, B7.1/CD80, B7.2/CD86) et l'augmentation du niveau d'expression des CMH de classe I et de classe II ainsi que les transporteurs TAP [6] (Figure 1-7, p. 20). En somme, un des impacts majeurs de la relation entre le CD40 et les cytokines ou les complexes récepteurs-ligands est la spécificité du changement de classe des Igs. Ainsi, Le CD40 initie le changement de classe ensuite le changement de IgE en IgG4, par exemple, dépend d'IL-4 et IL-13 [6].

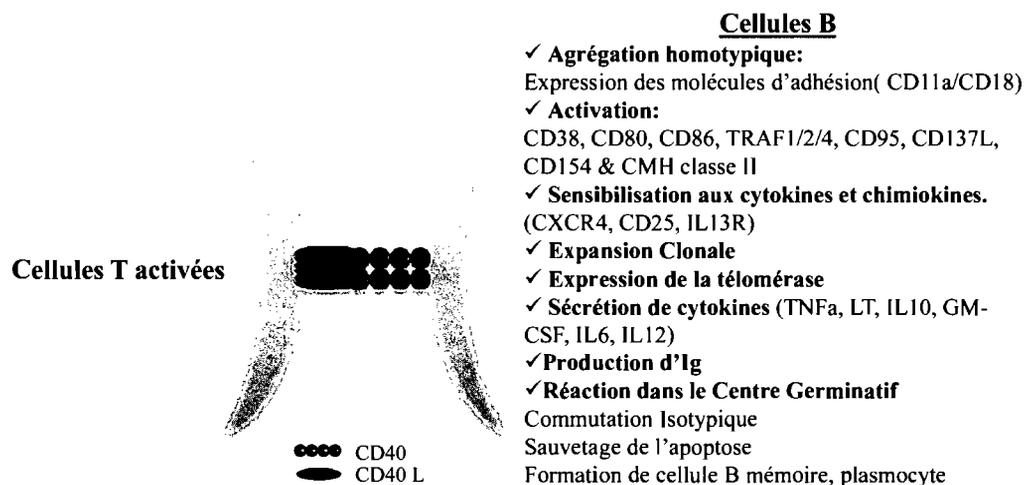


Figure 1-7: L'activation des cellules B par le CD40.

Les cellules T activées interagissent avec les cellules B par l'interaction entre le CD40 et le CD40L. Or, cette interaction mène à l'activation des cellules B. (inspirée de *Grammer & Lipski* 2001)

1.7.2 *In vivo*

L'importance de l'interaction du CD40-CD40L *in vivo* a été démontrée grâce au syndrome Hyper-IgM lié au chromosome X (HIGM) [56]. On note chez les patients souffrant du syndrome HIGM un niveau normal ou élevé du IgM et une faible concentration, voir une absence des IgG, IgA et IgE [56]. Cette immunodéficiences, dont il existe cinq formes, est due à une altération génétique dans le gène codant pour le CD40L (HIGM1) ou le gène codant pour le CD40 (HIGM3). L'HIGM1 comme l'HIGM3 est caractérisé par une déficience de la réponse immunitaire dépendante des cellules T, une incapacité des cellules B d'induire un changement de classe, et une incapacité de former des centres germinatifs [57, 58]. Par ailleurs, les symptômes du HIGM1-3 ont été reproduits dans un modèle murin CD40L négatif qui a pour effet de bloquer l'interaction CD40-CD40L [59]. Ceci démontre le rôle important joué par l'interaction CD40-CD40L dans la réponse immunitaire. Le CD40 joue aussi un rôle important dans l'activation (priming) des cellules T et leur fonctionnement (Figure 1-8, p. 21).

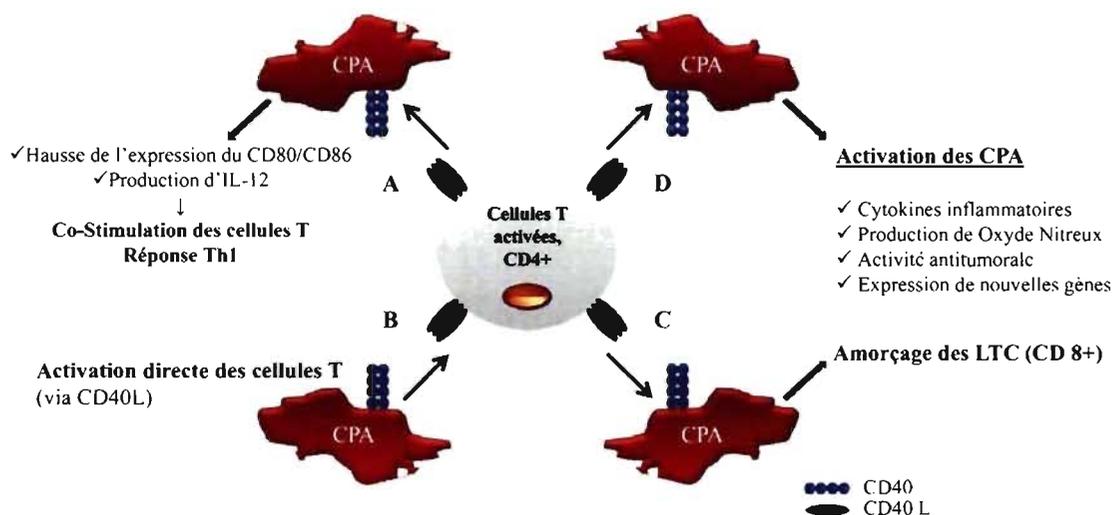


Figure 1-8: Le rôle du CD40 dans l'amorçage des cellules T et leur interaction avec les CPA.

L'interaction entre les cellules T et les cellules présentatrices telles que les cellules dendritiques par le biais du CD40-CD40L et leur effet sur la réponse immunitaire (*van Kooten & Banchemreau 2000*).

Or, la découverte du CD40 sur les cellules présentatrices (CPA) fut une percée importante pour l'étude de son réel rôle. L'activation du CD40 a un impact majeur sur l'expression de molécules de co-stimulation et la production d'IL-12. Par ailleurs, IL-12 sert de plaque tournante entre une réponse de type Th1 et une réponse de type Th2 [6]. Le CD40 induit indirectement la présentation croisée dû à une interaction CD40/CD40L entre les cellules CD4⁺ et les cellules dendritiques [6]. Cette interaction va faire en sorte que les cellules dendritiques vont être capable de stimuler des cellules T CD8⁺, des cellules cytotoxiques [6]. Le CD40 est aussi lié à des pathologies immunitaires diverses tels l'auto-immunité, le rejet de greffes et l'inflammation [6]. Ainsi, l'inhibition du CD40 a eu un effet bénéfique dans plusieurs modèles immunopathologiques tels l'arthrite, les souris diabétiques non obèse (NOD) [60], l'athérosclérose et la réaction de greffe contre l'hôte [6].

1.8 Le rôle du CD40 dans la mort cellulaire

Le CD40 est un important régulateur de la réponse immunitaire. Comme, il a été indiqué ci-haut dans les études *in vitro*, le CD40 joue un rôle important dans la survie, la prolifération des cellules B ainsi que le maintien de la réponse immunitaire. Or, le CD40 joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire [61]. Ainsi, il joue un rôle important dans la régulation entre le signal de survie et l'induction de la mort cellulaire [6]. Pour ce faire, le CD40 induit soit des récepteurs qui stimulent la survie, soit des récepteurs qui stimulent la mort cellulaire. Ce phénomène peut intervenir à n'importe quel stade du développement de la cellule. Il y a plusieurs sous catégories de mort cellulaire que l'on peut regrouper en deux formes principales: l'apoptose et la nécrose.

1.8.1 L'apoptose vs la nécrose

L'apoptose constitue un événement hautement régulé. Ainsi, l'apoptose est un processus actif qui dépend de l'ATP (Adénosine triphosphate) [62]. De plus, il est caractérisé par une fragmentation nucléaire, une dégradation de l'ADN, une condensation de la chromatine, un rétrécissement de la cellule, un bourgeonnement et une asymétrie de la membrane cellulaire ainsi que la formation de corps apoptotiques [63]. Finalement, les corps apoptotiques sont phagocytés, avant l'éclatement de la membrane par les cellules voisines. L'apoptose peut être initiée par une signalisation intrinsèque ou extrinsèque [64]. La nécrose est un événement accidentel qui correspond à un processus passif qui ne serait pas régulé. À l'instar de l'apoptose, la nécrose est caractérisée par une inhibition de la production d'ATP [62]. Contrairement à l'apoptose, il n'y a pas de condensation de la chromatine durant la nécrose [65]. Lors de l'enclenchement du processus, la cellule gonfle jusqu'à l'éclatement de la membrane cellulaire. Ainsi, on se retrouve avec la formation de

débris cellulaire. Or, lors d'une nécrose, une réponse inflammatoire est induite due à la présence de ses débris intracellulaire puisque la phagocytose des débris cellulaire se fait après l'éclatement de la cellule [65].

La découverte d'apoptose qui soit indépendante des caspases et de nécrose contrôlée rend leur catégorisation plus complexe [62, 65, 66]. Dorénavant, on peut sous catégoriser la mort cellulaire contrôlée en trois catégories: l'apoptose, la mort cellulaire programmée semblable à l'apoptose et la mort cellulaire programmée semblable à la nécrose (Figure 1-9, p. 23) [65]. La mort cellulaire semblable à l'apoptose est caractérisée par une condensation de la chromatine, type 1, qui est moins compacte que l'apoptose. De plus, cette mort peut aussi être indépendante des caspases. La mort cellulaire semblable à la nécrose peut être induite par des récepteurs de la mort cellulaires ou par autophagie. Son lien avec la nécrose vient du fait que la mort cellulaire programmée semblable à la nécrose est caractérisée par une absence ou une très faible condensation de la chromatine [65].

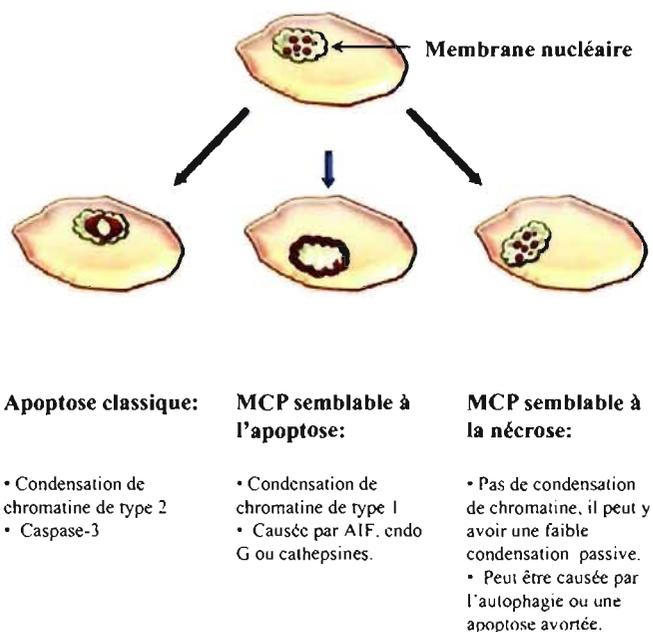


Figure 1-9: Les différents types de mort cellulaire programmée (MCP).

La mort cellulaire programmée (MCP) a été divisée en différents types afin de mieux cerner leurs fonctions. Le comportement de la chromatine lors de la mort cellulaire a permis de classifier la mort en trois différents types : Apoptose classiques, MCP semblable à l'apoptose et MCP semblable à la nécrose (inspirée de *Jäättelä & Tschopp* 2003)

1.8.2 Les récepteurs de la mort cellulaire

Un stress cellulaire (radiation UV, irradiation aux rayons gamma, agent cytotoxique...), un manque de facteurs de croissance représentent des facteurs qui peuvent induire la mort programmée de la cellule de manière intrinsèque [64].

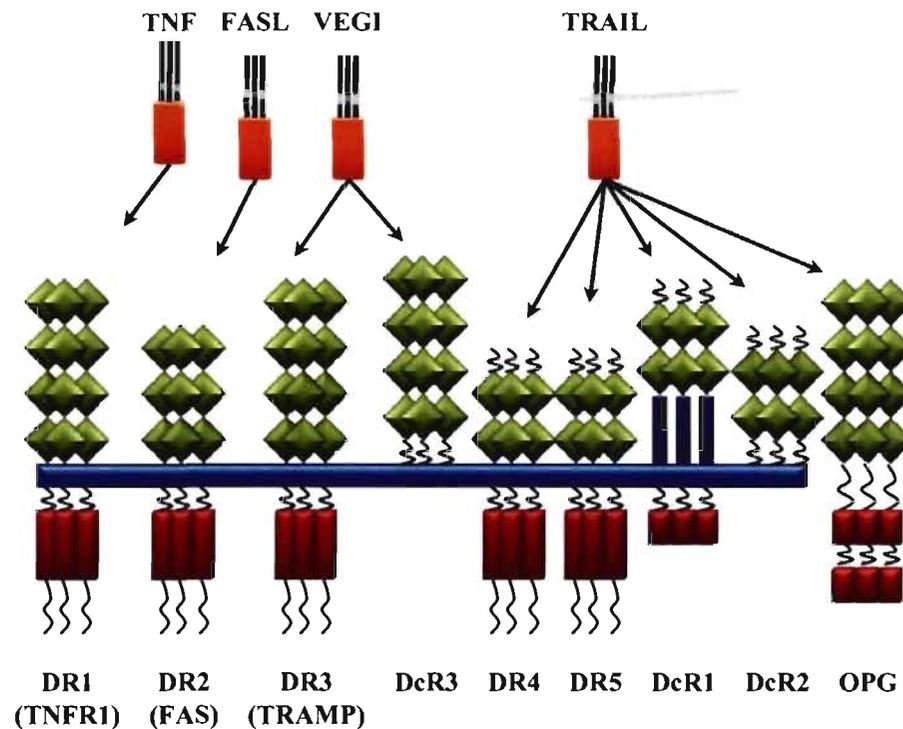


Figure 1-10: Les récepteurs de la mort cellulaire appartenant à la famille des TNFR.

Les différents récepteurs de la mort cellulaire et leurs ligands respectifs. On peut voir la présence de « decoy receptors » (DcR1, 2, 3) qui inhibent la mort cellulaire et qui entrent en compétition avec les récepteurs de la mort (inspirée de *Bhardwaj & Aggarwal 2003*).

La voie extrinsèque de la mort cellulaire requiert, quant à elle, l'implication des récepteurs de la mort cellulaire, appartenant à la famille des TNFR, qui possèdent un « death domain » (DD) de 80 aa dans leur partie intracellulaire [67]. Les membres possédant un DD incluent: TNFR1 (p55TNFR), FAS (CD95), DR3 (TNF receptor-associated apoptosis-mediating protein (TRAMP)), DR4 (TNF-related apoptosis-

inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DR6, EDAR (ectodermal dysplasia receptor) et NGFR (nerve growth factor receptor) (Figure 1-10, p. 24) [65, 67] Lorsqu'ils s'associent avec leur ligand respectif, ces récepteurs forment des homo-trimères qui génèrent deux types de complexes pour induire la mort cellulaire [65, 67]. FAS, DR4 et DR5 se lient avec le « FAS-associated-death domain » (FADD), qui se lie à son tour avec la pro-caspase 8 pour former le complexe DISC (death-inducible signaling complex) (figure 1-10, p. 24). TNFR1, DR3, DR6 et EDAR recrute « TNF receptor-associated death domain » (TRADD) qui s'associe avec FADD et pro-caspase 8 pour former un complexe, le TRADDosome (Figure 1-11, p. 26) [68]. La particularité du TNFR1 c'est qu'il peut former deux différents complexes avec le TRADD (Figure 1-11, p. 26) [69]. Le premier complexe (complexe de type I) consiste en l'association du TRADD, TRAF1/2 et RIP et induit l'activation du NF κ B, de JNK et des facteurs de survie [67, 69]. Le deuxième complexe (complexe de type II) est le TRADDosome. Or, l'inhibition de l'activation du pro-caspase 8 favorise la formation du premier complexe [65, 68, 69]. RIP joue un rôle de régulateur, car il peut s'associer avec FAS ou TNFR1 pour induire la nécrose ou l'apoptose outre son rôle dans la survie [65, 67, 70]. Par ailleurs, il y a des récepteurs, « decoy receptor » (DcR1, DcR2, DcR3) qui n'ont pas de domaine intracellulaire ou qui ont un DD tronqué (Figure 1-10, p. 24) [67]. Les DcRs s'associent avec les mêmes ligands que les récepteurs DR3, DR4 et DR5 et ainsi, ils bloquent l'induction de l'apoptose [67]. On peut observer l'importance de la régulation de la mort cellulaire dès le début de son activation, comme tout au long de son déroulement.

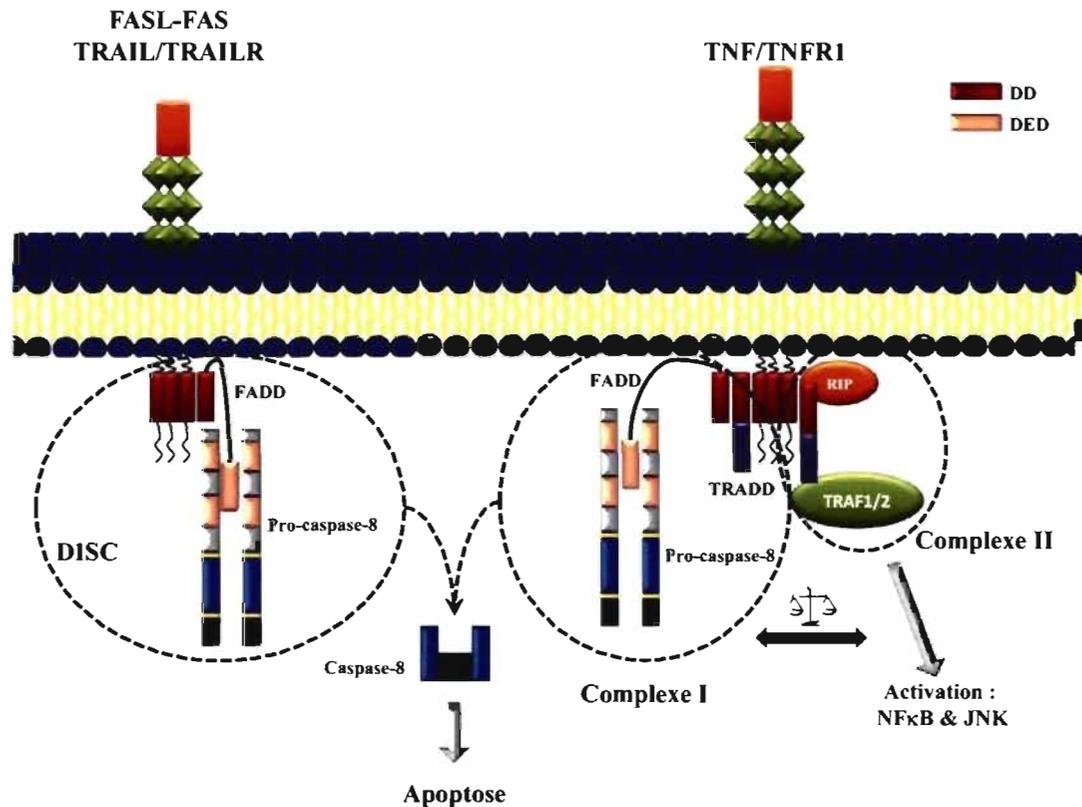


Figure 1-11: L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque est activée différemment par des récepteurs de la mort cellulaire. Les récepteurs FAS, DR4 et DR5 induisent l'activation des pro-caspase-8 en formant un complexe DISC. D'autre part, les récepteurs TNFR1, DR3, DR6 et EDAR forment un complexe TRADDosome. Or, TNFR1 peut aussi induire l'activation du NFκB et du JNK en formant un autre complexe avec les TRAFs (inspirée *Bhardwaj & Aggarwal 2003*).

1.8.3 Les organelles impliquées dans la mort cellulaire programmée

1.8.3.1 La Mitochondrie :

La mitochondrie est le principal aiguilleur en chef de la mort cellulaire programmée (Figure 1-12, p. 30). Une des dernières étapes de l'induction de l'apoptose consiste à la déstabiliser. Ainsi, la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP), permet la sécrétion de plusieurs facteurs pro-apoptotiques favorables à la mort cellulaire qui est soit caspases dépendante ou caspases indépendante [61, 65]. Or, la famille des Bcl-2, voir la section 1.8.4.2, joue un rôle

clé dans la déstabilisation de la mitochondrie. La survenue du MMP dépend d'un stimulus externe ou interne de la mort cellulaire. Comme, nous allons voir ci-dessous, la famille des Bax, en s'agglomérant sur la surface de la mitochondrie (Figure 1-12, p. 30), peut induire la formation du MMP suite à une activation par un récepteur de la mort cellulaire ou un stress provenant de l'intérieur de la cellule comme le démontre l'activation des Bax par p53 [61]. Le type de mort cellulaire programmée suite à une perforation de la mitochondrie dépend des facteurs en aval de cette étape [65]. Par conséquent, l'endonuclease G (EndoG) et l'apoptosis-inducing factor (AIF) libérés s'attaqueront au noyau de façon caspases indépendante, tandis que le cytochrome *C* activera la mort via les caspases [61, 65]. De plus, la mitochondrie peut induire la nécrose [65]. « Receptor-interacting protein 1 » (RIP1), lorsque recruté par les récepteurs de la mort, induit un dysfonctionnement de la mitochondrie, ce qui permet la libération de « reactive oxygen species » (ROS) mitochondriales dans les cellules T [65]. Fait à noter, les ROS ne sont pas seulement impliqués dans l'induction de la nécrose, car ils peuvent jouer un rôle en amont de la mitochondrie et ainsi, induire l'apoptose. L'activation des « Centrocyte/Centroblast Marker 1 » (CM1), un marqueur des GCs, sur les cellules B transformées à l'EBV causerait un réarrangement du cytosquelette ce qui provoquerait la génération de ROS [71]. Les ROS générés causeraient la déstabilisation de la mitochondrie et induiraient l'apoptose.

1.8.3.2 Le lysosome:

La formation de pore sur la membrane du lysosome, « lysosomal membrane permeabilization » (LMP), a souvent été considérée comme une caractéristique de la nécrose. Or, en regardant de plus près, on réalise que l'intensité du LMP déterminerait le type de mort cellulaire induite. Une LMP généralisée induirait la nécrose, tandis qu'une LMP partielle induirait l'apoptose [72]. Les stimuli permettant l'induction d'une LMP partielle peuvent être externes par le biais de BCR ou la famille du TNFR ou internes par p53, camptothecin ou oxydants [72-78]. Le lysosome devenue perméable permet la sécrétion des cathepsines, des enzymes protéolytiques (Figure 1-12, p. 30). La cathepsine B, une protéase de la cystéine, et la cathepsine D, une protéase de l'acide aspartique, sont souvent impliquées dans toutes les formes de mort cellulaire programmée avec ou sans l'aide des caspases [65, 79]. Les cathepsines peuvent être cytotoxiques et induire une mort nécrotique à cause de leur fonction exopeptidase non-spécifique [65]. Cependant, dans un environnement à pH neutre, les cathepsines retiennent partiellement leur fonction endopeptidase, qui est plus spécifique, et perdent rapidement leur fonction exopeptidase [65]. De plus, les cathepsines et les caspases se partagent beaucoup de substrats reliés à la mort programmée tels que les caspases elles-mêmes, la poly (ADP) ribose polymérase (PARP), la phospholipase cytosolique A₂ (cPLA₂) [65]. Par ailleurs, l'inhibition de l'activité des cathepsines peut protéger les cellules de la mort cellulaire programmée dépendante des lysosomes [65, 72, 79]. Finalement, les facteurs impliqués dans l'induction de la mort par les cathepsines et le type de cellules impliquées font en sorte que les cathepsines peuvent agir en amont, en aval ou indépendamment des voies de signalisation impliquant les caspases.

1.8.3.3 Le réticulum endoplasmique :

Le réticulum endoplasmique (RE) peut être impliqué dans la mort cellulaire à cause d'une accumulation de protéines anormalement repliées (misfolded proteins) ou une sécrétion incontrôlée du calcium (Ca^{2+}) [61, 65]. Le stress induit dans le RE peut provoquer une formation de pore sur la mitochondrie (Figure 1-12, p. 30) [61, 65]. Par ailleurs, le calcium libéré active les calpains, protéase de la cystéine, qui induisent la mort cellulaire programmée [65]. Les calpains peuvent participer en amont ou en aval de la signalisation des caspases pour induire la mort. De plus, les calpains peuvent agir indépendamment des caspases, car la molécule EB1089, qui est analogue à la vitamine D, provoque, par l'activation des calpains, la mort programmée semblable à l'apoptose dans les cellules cancérigènes [65]. De plus, cette molécule, EB1089, est en essai clinique (phase 3) comme traitement pour le cancer [65]. L'implication du calcium n'est pas l'unique façon que possède le RE pour induire la mort. En effet, le RE peut induire le clivage de la caspase-4 qui est localisée dans le RE dans l'apoptose des neurones [80]. Or, ceci est spécifique à la perturbation du RE, car la surexpression de Bcl-2 n'affecte pas le clivage de caspase-4 [80]. Par conséquent, le clivage de caspase-4 est indépendant de l'induction du MMP.

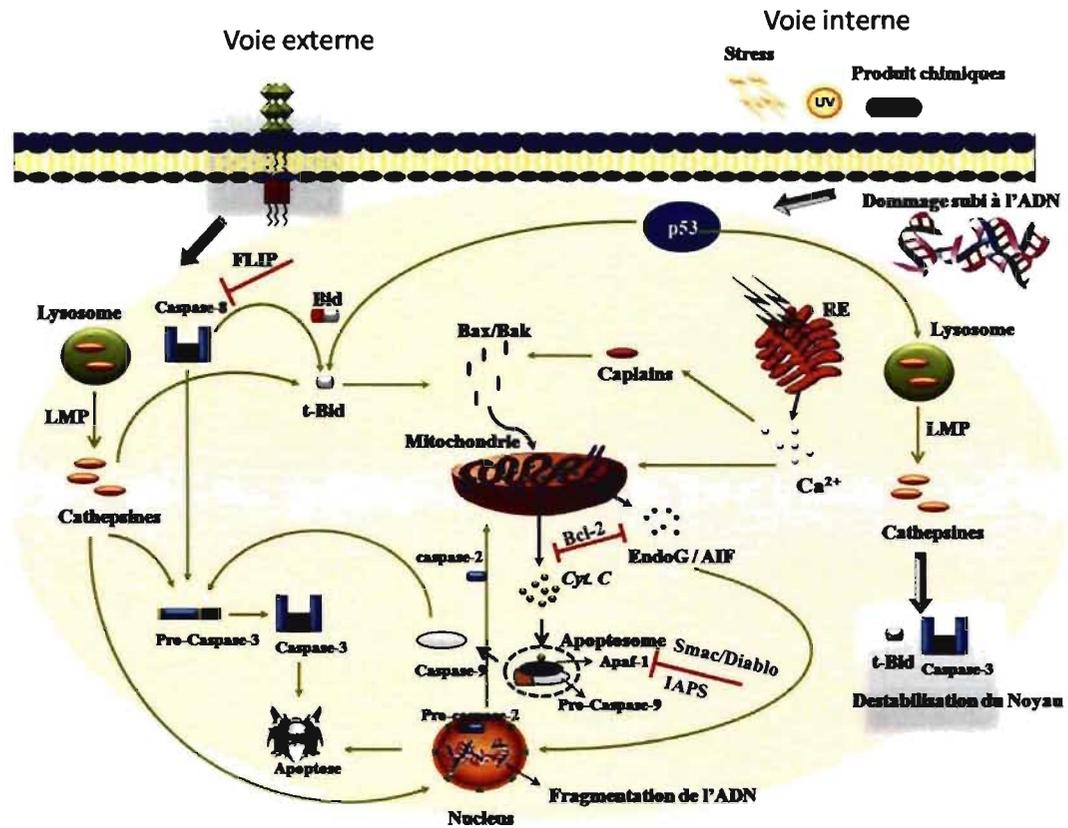


Figure 1-12: L'implication des organelles dans l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque ou intrinsèque.

La voie extrinsèque induit l'apoptose en activant directement les pro-caspase-3 ou par le biais de la déstabilisation du lysosome et de la mitochondrie. D'autre par, la voie intrinsèque mène à l'apoptose par la déstabilisation des organelles telles que le RE, la mitochondrie et le lysosome.

1.8.4 Les protagonistes de la mort cellulaire programmée

1.8.4.1 Les caspases :

Les caspases sont des « cysteinyl aspartates protéinases » dont le principal rôle est d'exécuter la mort cellulaire programmée. On dénote 14 membres dans la famille des caspases regroupés en deux catégories : les caspases initiatrices et les caspases effectrices [61]. Les caspases sont synthétisées sous une forme inactive contenant trois domaines, un pro-domaine N-terminal, un large domaine et un petit domaine (Figure 1-13, p. 31). La longueur du pro-domaine varie selon les catégories de caspases. Ainsi, sous la forme pro-caspase (inactive), les caspases initiatrices (caspases -1,-2,-4,-5,-8,-9,-10 et -12) ont un long pro-domaine N-terminal. Dans ces longs pro-domaines, on retrouve des sites d'interaction entre protéines « DED », death effector domain, pour les caspases -8 et -10, et « CARD », caspase recruitment domain, pour les caspases-2 et -9 [81] auxquels vont se lier les protéines adaptatrices pour initier la mort cellulaire programmée.

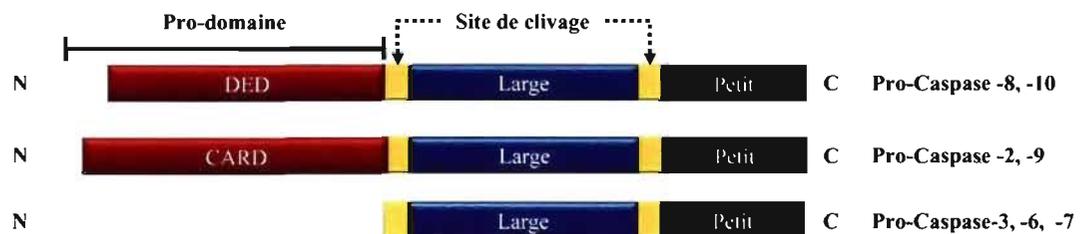


Figure 1-13: La structure des différentes caspases.

À l'état inactif, les caspases se retrouvent sous formes non-clivées appelées pro-caspases. Les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9, -10), ont un pro-domaine auquel les protéines adaptatrices vont se lier pour initier la mort. Les caspases effectrices, caspases-3, -6, -7, ont un pro-domaine court (inspirée *Kumar 2007*).

Les caspases effectrices (caspases -3,-6,-7,-11 et -13) possèdent un pro-domaine N-terminal court, car elles n'ont pas de sites d'interaction entre protéines. Ainsi, le

passage de la forme pro-caspase (inactive) à la forme caspase (active) dépend de leur clivage par les protéines protéolytiques (au niveau de la cystéine et de l'acide aspartique) comme les caspases initiatrices et les cathepsines (Figure 1-14, p. 32) [61, 65].

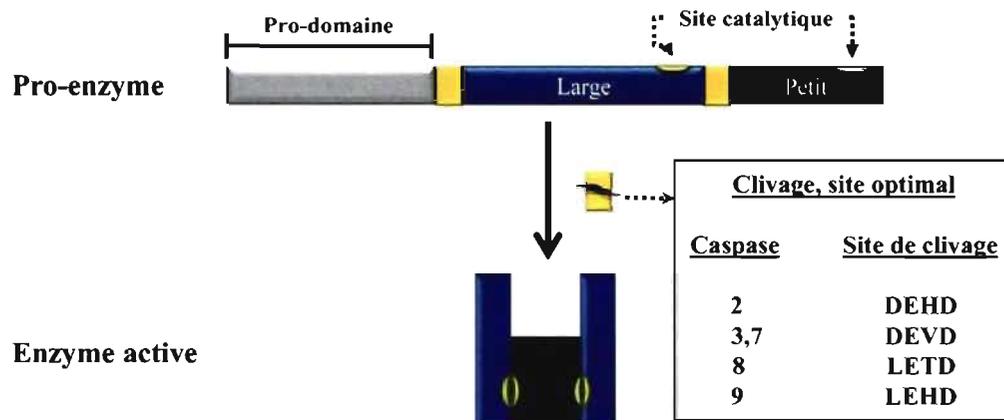


Figure 1-14: Les sites de clivage des différentes caspases.

Les caspases sous forme inactives (pro-caspase) doivent être clivées pour être actives. Les sites de clivages sont composés de quatre aa.

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par des récepteurs de la mort cellulaire (FAS, TNFR1). En s'associant avec leur ligand respectif, FAS recrute la protéine adaptatrice FADD et TNFR1 recrute TRADD. FADD et TRADD activent pro-caspase-8 (FLICE) en s'associant avec les domaines DED dans son pro-domaine N-terminal. Cette association induit la fonction auto-protéolytique de caspase-8. Or, après son auto-clivage, la caspase-8 se réorganise pour former un tétramère (deux domaines larges et deux domaines petits). La caspase-8 peut induire l'activation de la pro-caspase-3 en la clivant directement ou par l'intermédiaire de la mitochondrie (Figure 1-12, p. 30) [61, 65]. L'activation indirecte de la pro-caspase-3 survient lorsque la caspase-8 enclenche la cascade apoptotique en induisant le clivage de Bid. Le Bid tronqué (t-Bid), maintenant actif, induit l'agrégation de Bak et Bax sur la membrane de la mitochondrie ce qui permet la libération du cytochrome *c*. Une fois

dans le cytosol, le cytochrome *c* forme un complexe, à l'aide de l'ATP, avec l'Apaf-1, protéine adaptative possédant un domaine CARD, et pro-caspase-9 ce complexe est appelé apoptosome (Figure 1-12, p. 30) [61].

Dans cet apoptosome, pro-caspase-9 s'auto-protéolyse pour former la caspase-9 qui induit le clivage de la pro-caspase-3. En tant que caspase effectrice, caspase-3 induit la mort cellulaire programmée en clivant la majorité des substrats cellulaire [81]. Fait à noter, la caspase-10 agit de la même manière que la caspase-8 [61, 65, 81]. Par ailleurs, l'activation de la caspase-9 joue un rôle central dans l'induction de la mort cellulaire de manière intrinsèque dépendante des caspases. L'activation de manière intrinsèque de la mort cellulaire programmée passe par les organelles de la cellule suite à un stress cellulaire [61, 65]. La caspase-2 a été la première caspase à être découverte chez les mammifères [61, 81]. Cependant son rôle semble redondant ou facilement compensé par les autres caspases, car une souris caspase-2^{-/-} se développe normalement avec un dysfonctionnement mineure dans l'apoptose [82, 83]. Selon ce que rapporte Viktorsson et al. et Kumar, le rôle de la caspase-2 semble converger vers une initiation de la mort cellulaire par l'intermédiaire de la mitochondrie [61, 81]. D'ailleurs, la caspase-2 est activée suite à la détection d'un dommage au niveau de l'ADN. La caspase-2 est activée, de la même manière que la caspase-9, dans un complexe, le « PIDDosome ». Le PIDDosome est composé de PIDD et RAIDD, des protéines adaptatrices contenant un domaine CARD, et de pro-caspase-2 [61, 81]. La caspase-2 peut se localiser dans le noyau, l'appareil de Golgi et dans le cytosol [81].

1.8.4.2 La famille des Bcl-2:

La famille des Bcl-2 contient plus de trente membres qui possèdent au moins un des quatre domaines conservés « Bcl-2 homology » (BH 1-4) (Figure 1-15, p. 35) [61]. Le BH-3 est essentiellement pro-apoptotique; tandis que le BH-4 joue un rôle important dans la réponse anti-apoptotique [61]. La famille Bcl-2 agit principalement sur la réponse apoptotique passant via la mitochondrie. Plusieurs membres de cette famille agissent au niveau du Réticulum Endoplasmique (ER) et de la membrane nucléaire [84]. Les membres de l'entité pro-apoptotique des Bcl-2 sont divisés en sous-groupes. La famille des Bax, regroupant tous les membres de la famille Bcl-2 contenant les domaines BH-1 à BH-3, et la sous-famille des « BH-3 only » (Bid, Bad, Bim ...). Dans l'ordre de l'exécution de la voie apoptotique passant par les Bcl-2, c'est la sous-famille des « BH-3 only » qui bloque les Bcl-2 anti-apoptotiques et qui active la sous-famille des Bax (Figure 1-12, p. 30) [61]. Une fois activé, Bax et Bak s'agglomèrent sur la membrane extérieure de la mitochondrie ce qui induit la sécrétion du cytochrome *c*. Les Bcl-2 anti-apoptotique agissent sur les différents niveaux de l'apoptose. Ainsi, Bcl-2 peut bloquer la translocation des Bax/Bak vers la mitochondrie ce qui empêche la sécrétion des facteurs apoptotiques tels que AIF, EndoG, Omi/HtrA2 et SMAC/Diablo [61]. Une fois sécrété par la mitochondrie, AIF et Endo G migrent vers le noyau pour induire une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN [61]. Omi/HtrA2 et SMAC/Diablo sont des protéines mitochondriales qui inhibent directement les « Inhibitor of apoptosis proteins » (IAPs) [61].

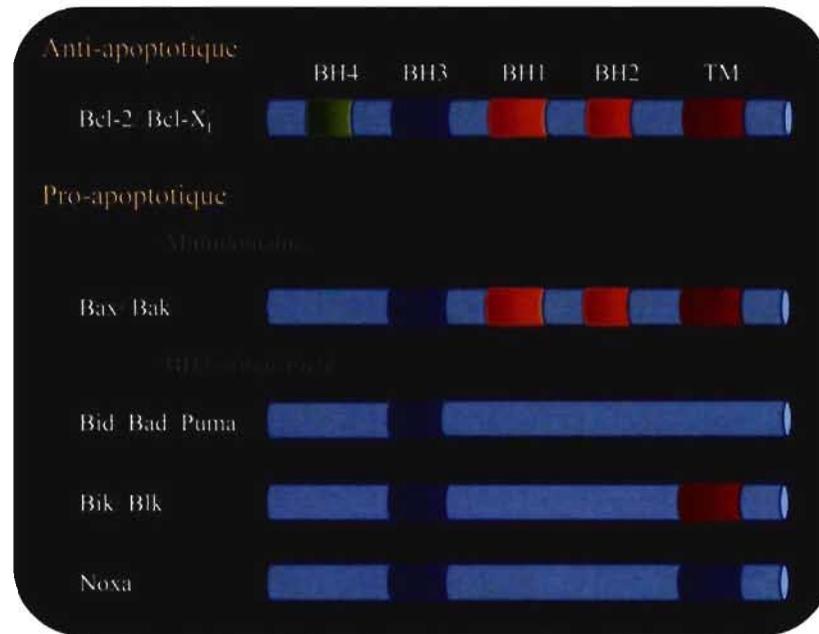


Figure 1-15: Les membres de la famille de Bcl-2.

Les membres de la famille de Bcl-2 sont répartis, suivant leur domaine BH, en deux groupes. Les Bcl-2 anti-apoptotique sont caractérisés par la présence du domaine BH4 tandis que les Bcl-2 pro-apoptotique ne possèdent pas le domaine BH4 (inspirée de *Opferman & Korsmeyer 2003*)

1.8.5 Les régulateurs de l'apoptose.

1.8.5.1 Les régulateurs anti-apoptotiques.

Plusieurs facteurs contrôlent la réponse apoptotique soit positivement, soit négativement. Les « Heat Shock Proteins » (HSP), protéines contrôlées par le choc thermique et qui sont divisées en deux sous-groupes : les grandes HSP (HSP-60, -70, -90) et les petites HSP (HSP-27). Par conséquent, une augmentation de l'expression des HSP-27 peut bloquer le signal pro-apoptotique en empêchant la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie, en empêchant la redistribution de Bid et en bloquant l'activation de la pro-caspase-3. De plus, HSP-70 semble inactiver Apaf-1, en s'associant avec son domaine CARD, ce qui bloque l'activation de la pro-caspase-9. Par ailleurs, les HSP-27 et -70 bloquent le signal apoptotique via JNK et p38 en empêchant Ask-1 de les activer. En contre partie, la réponse du HSP-90 face à la

mort cellulaire varie selon le stimulus. Donc, HSP-90 induit la mort des cellules U937 lorsqu'il y a une stimulation induite via le TNF- α [85], par contre, HSP-90 inhibe la mort cellulaire de la même manière que le reste de la famille HSP, en formant un complexe avec Apaf-1 [86].

À part les HSP, la famille des IAPs contrôle l'induction de l'apoptose via les caspases [61]. Cette famille regroupe XIAP, cIAP-1, cIAP-2 et survivin. Les IAPs bloquent l'action des caspases en s'associant avec ces derniers par le biais des domaines « baculoviral IAP repeat » (BIR). Les caspases-3 et -7 se lient au domaine BIR2 tandis que la caspase-9 se lie au domaine BIR3 [87]. Survivin est unique car il contient uniquement un seul domaine BIR, BIR2 [88]. Survivin, surexprimé dans les tumeurs, possède deux fonctions: de bloquer l'action des caspases-3 et -7 en se liant à elles et servir de régulateur de la mitose [89, 90].

Par ailleurs, les protéines 14-3-3, la protéine nucléaire Ku70 et les kinases, PI3K et AKT, peuvent aussi bloquer l'induction de l'apoptose. La protéine 14-3-3 et la protéine nucléaire Ku70, qui fait partie du complexe de réparation de l'ADN (DNA-PK), sont capables de se lier à Bax afin de l'empêcher de provoquer une MMP en se liant à la surface de la mitochondrie [61, 91-93]. Les kinases jouent un important rôle dans la régulation de la mort cellulaire programmée. Ainsi, lorsque PI3K est dérégulé, ceci amplifie le signal de survie chez les cellules cancéreuses. Or, lorsque PI3K est activée, elle induit AKT, une kinase serine/thréonine qui est un important facteur anti-apoptotique [61]. L'AKT peut induire un signal de survie de différentes manières. Premièrement, AKT peut induire la phosphorylation de Bad, ce qui le rend inactif suite à une liaison avec la protéine 14-3-3. Par conséquent, Bad est vulnérable à une phosphorylation par la protéine kinase A (PKA), ce qui a pour effet de libérer Bcl-2/Bcl-xL, un facteur anti-apoptotique [94]. Deuxièmement, AKT inhibe l'expression du gène pro-apoptotique en induisant la phosphorylation de « fork head transcription factor 1 » (FKHRL1) [95].

1.8.5.2 Les régulateurs pro-apoptotiques.

Outre les facteurs anti-apoptotiques, il y a des facteurs stimulant l'apoptose tels que JNK et p53. L'activation de JNK due à un facteur de stress induit l'activation des facteurs pro-apoptotiques. Ainsi, JNK peut induire la phosphorylation des protéines 14-3-3 ce qui bloque leur action sur Bax. De plus, JNK peut augmenter la fonction pro-apoptotique de Bad par sa phosphorylation ce qui a pour effet de contrebalancer le signal de survie induit par AKT [96]. Par ailleurs, JNK peut, en induisant la phosphorylation du complexe Bcl-2/Bcl-xL, bloquer leur activité anti-apoptotique [97]. Outre JNK, il se pourrait aussi que p38 induise la sécrétion du cytochrome *c* dans le cytoplasme en recrutant Bax à la mitochondrie [98]. Le p53 représente un important facteur de régulation, car ce dernier contrôle la transcription génique, la synthèse et la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [61]. p53 induit aussi l'accumulation de Bax et de Bak à la surface de la mitochondrie [99]. En plus, de stimuler l'expression de la famille des Bcl-2 pro-apoptotique, p53 inhibe aussi les Bcl-2 anti-apoptotique et survivin. On peut voir que l'induction de la mort cellulaire via la mitochondrie est fortement régulée, car la perforation de la mitochondrie constitue un point de non-retour dans la cascade apoptotique.

1.8.6 Le CD40 et la mort cellulaire:

Les TNFR ne possédant pas de DD ont comme fonction première, la promotion de la survie et de la prolifération de la cellule. Or récemment, il a été démontré que ces mêmes récepteurs pouvaient être impliqués dans l'activation de la mort cellulaire. Certes, ceci entre dans leurs fonctions de régulateurs de l'homéostasie cellulaire, comme le CD40 [6]. Il a été démontré que TNFR2, lorsqu'il est surexprimé à la surface, peut induire la mort cellulaire [100]. Or, on a démontré

plus tard que l'induction de la mort par TNFR2 pouvait être indirecte [101]. Grell et al ont démontré que TNFR2 induisait l'expression du ligand TNF qui en retour activait TNFR1 et la mort cellulaire [101]. Par ailleurs, selon le même groupe, le CD30 et le CD40 agissaient de la même manière. En plus, la combinaison de TNFR2 et du CD40 amplifiait de manière synergique la mort cellulaire par le TNFR1 [101]. Or, il y a plusieurs investigations qui penchent vers une implication directe du CD40 dans la mort cellulaire des cellules transformées.

En prenant pour acquis qu'il y a une homologie structurale entre le DD du CD95, de TNFR1 et une partie cytoplasmique du CD40, en plus du fait qu'il existe un chevauchement entre les voies de signalisation activées par ces trois récepteurs, Hess et al ont émis l'hypothèse que le CD40 pourrait induire la mort cellulaire directement [102]. Ainsi, ils ont démontré que le CD40, CD95 et TNFR1 pouvaient induire la mort cellulaire de manière distincte en utilisant divers inhibiteurs métaboliques [102]. Ainsi, Hess et al ont démontré que l'utilisation de butylhydroxyanisole (BHA), un antioxydant, et du vanadate, inhibiteur de phosphatase, réduisaient la mort cellulaire induite par le TNFR1 et le CD40 sans affecter la mort induite par CD95. Par contre, l'utilisation d'ionophore pour le calcium (A23187) ou un inhibiteur de la calmoduline n'ont pas affecté l'induction de la mort par le CD40 et le CD95 tout en réduisant la mort induite par TNFR1. De plus, il a été démontré que le CD40 induisait la mort cellulaire dans les cellules B transformées par EBV indépendamment des caspases qui mènent au clivage de l'enzyme poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) [103]. Par ailleurs, l'induction de la mort par le CD40 était similaire à l'induction de la mort par le CMH classe II [103]. De plus, Léveillé et al ont reconfirmé que le CD40 n'avait pas besoin de la synthèse de nouvelles protéines pour induire la mort cellulaire [102, 103]. Des études récentes par Eliopoulos et al montrent que l'activation du CD40 avait des bénéfices anti-tumorales [1]. En effet, le CD40 est exprimé sur de nombreuses cellules malignes, comme les lymphomes non hodgkiniens, des leucémies lymphoblastiques et plusieurs carcinomes (du nasopharynx, de la vessie urinaire, du col de l'utérus, des ovaires) [1]. Ainsi, le CD40L soluble recombinant induisait un arrêt de croissance du carcinome du sein [104], tandis qu'il pouvait induire l'apoptose dans les tumeurs colorectales CD40⁺

[105]. La signalisation impliquée dans la mort cellulaire induite par le CD40 demeure vague. Il a été démontré que dans les lymphomes de Burkitt, un AcM, anti-CD40, ou un recombinant soluble du CD40L induiraient la mort cellulaire par une amplification de l'expression de Bax [106]. De plus, on a découvert que dans les tumeurs urothéliales que l'induction de la mort cellulaire par le CD40 impliquerait l'activation du JNK, des caspases-3 et -9 [107]. Par contre, dans les lymphomes diffus à larges cellules B, une activation constitutive d'ERK est nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire [108]. Par ailleurs, Hollmann et al ont démontré que dans ce système le JNK ne jouerait pas un rôle important dans l'induction de la mort.

En somme, d'autres études seront requises afin de déterminer la manière avec laquelle le CD40 induit directement la mort cellulaire, pour analyser son comportement lorsqu'il exprimé à la surface de la cellule, son interaction avec ses protéines adaptatrices et son effet sur les organelles impliqués dans la mort cellulaire.

1.9 L'hypothèse et les Objectifs de travail.

L'implication du CD40 dans la réponse immunitaire est un processus vaste et complexe. En plus d'être utilisé dans le traitement des maladies auto-immunes, le CD40 pourrait éventuellement être un agent important pour le traitement anti-tumoral. Le CD40 a la capacité de stimuler plusieurs voies de signalisations qui peuvent même être des antagonistes telles que la survie et la mort cellulaire programmée. Il a été montré que l'utilisation du CD40L ou d'AcM agoniste pourraient induire la mort des cellules exprimant le CD40 à leur surface [46, 103, 105, 106, 108]. De plus, il a été démontré que le CD40 est capable de former des homodimères (CD40/CD40) et cette homodimérisation est absolument requise pour la signalisation induite via le CD40 en plus d'être primordiale pour une signalisation bidirectionnelle au cours de l'interaction APC/cellules T [51]. En se basant sur ces nombreuses observations, nous avons émis comme hypothèse que l'homodimérisation du CD40 pouvait avoir un rôle dans l'induction de la mort cellulaire, mais tout d'abord il faut identifier et caractériser cette mort cellulaire induite via le CD40.

- 1) Notre premier objectif sera d'étudier l'effet de l'agrégation du CD40 à la surface sur l'induction de la mort cellulaire ainsi que l'influence du stade d'activation et de la transformation à l'EBV des cellules dans ce processus.
- 2) Si l'homodimérisation du CD40 est un processus requis pour induire l'activation de la voie de signalisation MAPK kinase, et ainsi la phosphorylation de l'AKT [50], il reste à savoir si en présence ou en absence d'un tel processus, il y aura un changement dans la mort cellulaire programmée induite via le CD40.
- 3) Sachant que toutes les voies de signalisation impliquant le CD40 doivent passer par les TRAFs, nous voudrions identifier quel membre de la famille des TRAFs est impliqué dans la mort cellulaire via le CD40 dans notre système cellulaire.
- 4) En fin, comme, il a été déjà démontré que l'induction de la mort cellulaire par le CD40 était indépendante de l'activation des caspases [103], nous voulions

étudier le rôle que pourrait jouer d'autres protéines protéolytiques, telles que les cathépsines, dans notre système. De plus, la mitochondrie et le lysosome ont un rôle central dans l'induction de l'apoptose. Pour cela nous voudrions détailler l'implication de ces organelles, dans la mort cellulaire induite par le CD40 dans notre système.

Chapitre 2 Matériels et Méthodes

Lignées cellulaires, anticorps et réactifs.

Les lymphomes de Burkitt, Raji (EBV-positive) et Ramos (EBV-négative), et les cellules HEK 293 ont été obtenues d'American Type Culture Collection (ATCC) (CEDARLANE LABORATORIES Ltd, Burlington, CA). Les cellules ont été cultivées dans du RPMI 1640 ou du DMEM supplémenté avec 5% de FBS (Fetal Bovine Serum, Wisent St-Bruno, CA) et avec de la pénicilline, streptomycine et de la glutamine de GIBCO. Les anticorps anti-CD40 (G28.5), anti-CMH de classe I (W6/32) ont été purifiés du surnageant de la culture des hybridomes respectifs par le biais de la colonne Protéine G Sepharose (Sigma-Aldrich). IgG (chèvre anti-souris Alexa Fluor 488), 5,5' 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocycamine iodide (JC-1), Acridine Orange (AO), Propidium Iodide (PI) proviennent d'Invitrogen Life Technology, Annexin V-FITC (AV) (BD Biosciences) l'inhibiteur spécifique de Cathepsine B (CA-074ME), et l'inhibiteur général des Cathepsines (Z-FA-FMK) proviennent de Calbiochem, *N-acetyl-L-cystein* (NAC) et Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) Sigma-Aldrich.

Plasmides et transfections.

Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec l'ADN du CD40 sauvage (CD40-WT), CD40-C238A, CD40-T234A ou du CD40 dont la queue cytoplasmique a été tronquée (CD40 Δ Stop) [51]. L'ADN de diverses formes du CD40 a été inséré dans le vecteur pcDNA3.1. Par ailleurs, les cellules transfectées avec le vecteur le pcDNA3.1 vide ont été utilisées comme contrôle négatif. La transfection a été réalisée par précipitation au chlorure de calcium (CaCl₂). Les cellules transfectées ont été sélectionnées avec de l'hygromycine (400 μ g/mL) pour la génération des lignées stables. Pour les expériences nécessitant une transfection transitoire, les HEK 293 ont été utilisées 48h après la transfection.

Quantification de l'expression du CD40 par Cytométrie en flux.

Les cellules ont été incubées avec l'anticorps monoclonal, G28.5, (1 µg/100 µL) pour 30 min sur la glace, elles ont ensuite été lavées avec du PBS froid et incubées avec l'IgG, anti-souris, conjugué avec à l'Alexa-488. Un total de 1×10^4 cellules vivantes ont été isolées et analysées par FACS LSR-1 (BD Biosciences) et le programme Cell Quest (BD Biosciences).

Induction de la mort cellulaire via le CD40.

Les cellules B en suspension (Raji et Ramos) ont été mises en culture à 10^5 cellules par puits dans une plaque de 96 puits à fond arrondi. Puis, elles ont été incubées en présence de l'AcM agoniste, anti-CD40 (G28.5) (1 µg/mL) ou anti-CMH classe I, (W6/32) (1 µg/mL) comme contrôle négatif pour les temps indiqués. Les cellules adhérentes HEK 293 exprimant le CD40WT humain ou les différents mutants ont été distribuées dans des plaques de 96 puits à fond plat pour une concentration finale de 1×10^5 de cellules /mL et traitées avec les anticorps (1 µg/mL) dans un volume total de 200 µL de DMEM (5% FBS) pour 16h à 37°C. Après l'incubation, les cellules sont lavées délicatement avec du PBS et détachées avec la trypsine (0.05 %) pour 5 min à 37°C.

Quantification de la mort cellulaire.

La mort cellulaire a été évaluée par l'absorption du PI. Après le traitement, les cellules ont été transférées dans des tubes pour FACS (titertubes) puis, marquées avec du PI à une concentration finale de 1 µg/mL pour 5 min sur la glace dans l'obscurité. Par ailleurs, nous avons utilisé aussi l'annexin V-FITC pour étudier l'apoptose. Après traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS et suspendues dans 100 µL de tampon d'Annexin V (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Après avoir ajouté 1 µL d'AV-FITC et 1 µL de PI, les cellules ont été incubées pendant 15 min dans l'obscurité à température ambiante. Ensuite, 400 µL de tampon AV sont ajoutées aux cellules pour faire l'analyse par cytométrie en flux.

Analyse de la préméabilisation de la membrane lysosomale.

LMP est mesuré à l'aide de l'acridine orange. Sous sa forme protonée, l'AO émet une fluorescence de couleur rouge (le canal FL2 ou FL3 sur le FACs-LSR-1) à l'intérieur du lysosome. Lors, de la déstabilisation du lysosome, l'AO se diffuse dans le cytoplasme sous forme déprotonée et émet une fluorescence verte (le canal FL1). Pour l'analyse du LMP, 0.5×10^6 cellules sont traitées dans les mêmes conditions que la mort cellulaire. Après le traitement, les cellules sont lavées avec du PBS + 1% FBS et suspendues dans une solution de l'AO (5 $\mu\text{g/ml}$) et du PBS + 1% FBS. Après 15 min d'incubation à 37°C dans l'obscurité, les cellules sont lavées avec du PBS froid et suspendues dans 400 μL de PBS et analysées par cytométrie en flux.

Western Blot.

Après le traitement, les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon de lyse constitué de triton 1%, d'un tampon TNE (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA), de l'orthovanadate 2 mM (Na_3VO_4) et d'inhibiteurs de protéases (Tablettes, Roche). Le lysat de chaque échantillon traité a été mélangé avec du tampon SDS (Sodium dodécyl sulfate) puis chauffé pendant 5 min à 95°C. Les protéines ont été séparées par électrophorèse (à l'aide d'un gel acrylamide de 10%) puis transférées sur des membranes polyvinylidene difluoride (Millipore Corporation). Par la suite, les membranes ont été bloquées avec une solution de 5% de lait écrémé dans du TBS, 0.05% Tween 20, (TBS-T) pendant 30 min. Ensuite, les membranes ont été incubées avec du G28.5 (1/2000) 1h à 37°C. Après un lavage extensif au TBS-T, les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-IgG1 de souris conjugué au horseradish peroxidase (HRP) (1/10 000) pour 1h à température ambiante. Finalement, les membranes ont été révélées par chimioluminescence ECL plus (GEHealthcare Biosciences).

Chapitre 3 Résultats

3.1 L'induction de la mort cellulaire par CD40 dans différents types cellulaires.

Nos études antérieures (Léveillé et al. 1999) montrent que la mort cellulaire programmée induite via le CD40 était similaire à la mort induite par le CMH de classe II [103]. Cependant, les cellules Raji, utilisées lors de ces études, sont des lymphomes de Burkitt transformés par l'EBV. Le récepteur « latent membrane protein 1 » (LMP-1), qui est exprimé suite à une infection par l'EBV, est constitutivement actif. De plus, LMP1 induit une augmentation de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion cellulaire (ICAM, LFA-1...) ainsi que le CD40 dans les lymphocytes B [109]. Par ailleurs, LMP1 s'associe avec les mêmes protéines que le CD40 telles que les TRAFs et JAK3 indépendamment d'une association avec un ligand [110]. Par conséquent, nous voulions déterminer si la sensibilité des cellules à l'induction de la mort cellulaire était due à la présence de l'EBV. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules EBV négatives, Ramos, et des cellules EBV positives, Raji, et par la suite regarder l'effet de l'activation de ces cellules sur l'induction de la mort cellulaire.

La Figure 3-1A (p. 53) représente une cinétique de stimulation des cellules Raji et Ramos par l'anti-CD40 (G28.5). Le pourcentage de la mort cellulaire représente le ratio de cellules qui ont absorbé le PI analysé par cytométrie en flux. La mort cellulaire induite dans les cellules Raji suite à une stimulation par le G28.5 est dépendante du temps d'incubation (Figure 3-1A, p. 53). Comme les cellules Ramos inactives ne sont pas sensibles à la mort cellulaire induite par le CD40 (Figure 3-1A, p. 53), un prétraitement avec PMA (10 ng/mL), connue pour induire l'activation des cellules et augmenter le niveau d'expression en surface du CD40 (figure 3-1B, p. 53), a été nécessaire. Par conséquent, un prétraitement avec PMA a rendu les cellules Ramos sensibles à la mort cellulaire par l'anti-CD40 (figure 3-1A, p. 53). Cependant, les Ramos activées ont nécessité plus de temps d'incubation avec l'anticorps que les cellules Raji. La figure 3-1B (p. 53) représente une analyse de la moyenne de l'intensité de fluorescence émise par les cellules Raji, Ramos et Ramos prétraitées

avec PMA marquées en cytométrie en flux. Ces résultats suggèrent que le CD40 induit la mort de manière EBV indépendante.

3.2 Le niveau d'expression du CD40 influence la mort cellulaire induite.

Le niveau d'expression du CD40 semble jouer un rôle entre l'induction de la mort cellulaire et la sauvegarde de la cellule [1, 108]. Ainsi, nous avons utilisé l'approche chimique et l'approche génétique pour déterminer l'impact du niveau d'expression du CD40 sur l'induction de la mort cellulaire.

Dans la première série d'expériences, nous avons prétraité les cellules Ramos avec différentes concentrations de PMA pour créer des populations ayant un niveau d'expression variable de CD40 à leur surface. On remarque que l'augmentation du niveau d'expression du CD40 sensibilisait les Ramos prétraitées à la mort cellulaire (Figure 3-2A, p. 54). Cependant, le PMA est un puissant stimulant qui peut induire l'activation de différentes voies de signalisation. Pour cela nous avons choisi un autre système où il n'y aura pas d'interférence avec des voies de signalisation. Ainsi, des cellules HEK 293 qui n'expriment pas le CD40 ont été transfectées avec différentes concentrations d'ADN exprimant le CD40 sauvage (CD40 WT). En analysant le pourcentage de mort induite par l'anti-CD40, nous avons observé que les cellules HEK293 exprimant un haut niveau de CD40 avaient un niveau plus élevé de mort cellulaire (figure 3-2B, p. 54). Par ailleurs, la stimulation de ces mêmes cellules avec l'anti-CMH classe I (W6/32) n'a pas induit la mort cellulaire de manière significative, ce qui démontre ainsi, la spécificité du rôle joué par le CD40 dans l'induction de la mort. Pour confirmer nos résultats, nous avons utilisé un autre marqueur de la mort cellulaire programmée qui est l'annexin V (AV). L'AV est un marqueur spécifique de l'apoptose puisqu'il agit comme marqueur des phospholipides (PS) qui sont exposés à la surface suite à l'asymétrie de la membrane cellulaire durant la MCP. Par conséquent, la majorité des cellules mortes,

dues à une stimulation par l'anti-CD40, étaient AV positives (Figure 3-2C, p. 54). Ces résultats confirment l'habileté du CD40 à induire la mort cellulaire dépendamment de son niveau d'expression à la surface des cellules.

3.3 La nécessité de la cascade de signalisation du CD40 dans l'induction de la mort.

Pour démontrer que l'induction de la mort passe par une voie de signalisation spécifiquement activée par le CD40, nous avons évalué l'importance du domaine cytoplasmique du CD40 dans l'activation de la mort. Ainsi, nous avons généré un CD40 tronqué, où la totalité de la partie cytoplasmique a été enlevée. Les cellules HEK 293 utilisées exprimaient le CD40 tronqué (CD40- Δ Stop) à un niveau semblable à celui des HEK 293 exprimant le CD40 sauvage (Figure 3-3A, p. 55). L'abolition de la partie cytoplasmique du CD40 a été examinée par gel SDS-PAGE des cellules transfectées. On observe une réduction du poids moléculaire du CD40- Δ Stop par rapport au CD40 sauvage (figure 3-3B, p. 55). En plus la stimulation des HEK 293 (CD40- Δ Stop) avec l'anti-CD40 n'a pas induit de mort cellulaire (figure 3-3D, p. 55). Par conséquent, ce résultat démontre l'implication directe du domaine cytoplasmique du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire.

3.4 L'oligomérisation du CD40 n'est pas requise dans l'induction de la mort cellulaire.

La dimérisation et/ou l'oligomérisation de récepteurs comme le CD40 sont souvent importantes pour la transmission et l'amplification d'une cascade signalétique [50]. Ainsi, suite à une réticulation, le CD40, grâce à une liaison disulfure, forme un homo-dimère [50] dont la fonction diffère du CD40 sous forme monomérique. De plus, on a récemment démontré que la cystéine cytoplasmique (C238) est requise pour l'homodimérisation du CD40 [51].

Pour étudier la nécessité de l'homo-dimérisation du CD40 dans l'induction de la mort cellulaire, nous avons utilisé des cellules HEK 293 exprimant de manière stable et un niveau comparable du CD40 sauvage (CD40-WT) ou du CD40 muté au niveau de la cystéine 238 (CD40-C238A), une mutation qui empêche le CD40 de former un homodimère (Figure 3-3A, p. 55). L'inhibition de la formation du dimère par la mutation spécifique C238A a été examinée par gel SDS-PAGE. Les cellules HEK 293 exprimant CD40-WT ou CD40-C238A ont été stimulées pour une période de 24h avec l'anti-CD40 (G28.5) ou l'anti-chaîne α du CMH classe II (DA-6) comme contrôle. La forme monomérique du CD40 a un poids moléculaire de 37 kDa lorsqu'elle est résolue par électrophorèse à l'aide d'un gel 10% d'acrylamide tandis que l'homodimère CD40/CD40 a un poids moléculaire d'environ 74 kDa (figure 3-3C, p. 55). Les cellules HEK exprimant le CD40-WT ou le CD40-C238A étaient sensibles à la mort cellulaire lorsqu'elles sont stimulées avec l'anticorps monoclonal du CD40 (G28.5) (figure 3-3D, p. 55). Par ailleurs, on remarque que l'inhibition de la dimérisation rendait les cellules plus sensibles à l'induction de la mort par le CD40 (figure 3-3D, p. 55). Ces résultats montrent que l'induction de la mort cellulaire via ce CD40 ne nécessite pas une homodimérisation.

3.5 Le rôle des TRAF2/3 et 5 dans l'induction de la mort cellulaire par le CD40.

Les kinases jouent un rôle important dans la régulation de la réponse menant à la survie ou à la mort de la cellule [111]. De plus, l'engagement du CD40 peut induire une variété de signaux impliquant les PTK, P38, ERK1/2 et PI3K [6, 9, 50].

Par ailleurs, la signalisation via le CD40 passe par son association avec les différents membres de la famille des TRAFs. L'induction de la mort cellulaire par le CD40 requiert l'implication de son domaine cytoplasmique dans l'activation de la signalisation de la mort (figure 3-3D, p. 55). Par conséquent, nous avons analysé l'implication des TRAF2/3/5 dans l'induction de la mort par CD40. Or, il a été démontré que la thréonine 234 du CD40 joue un rôle important dans l'association du CD40 avec TRAF2/3/5. Ainsi, nous avons comparé l'induction de la mort des

cellules HEK 293 exprimant le CD40-WT ou le mutant CD40-T234A. Comme on peut l'observer dans la figure 3-4 (p. 56), la stimulation des récepteurs CD40-T234A ou CD40-WT avec l'anticorps monoclonal du CD40 provoque un niveau de mort cellulaire comparable. Cela montre que la mort induite via CD40 ne passe pas par TRAF2/3 et 5.

3.6 Le rôle des ROS dans l'induction de la mort.

L'engagement du CD40 génère du ROS dans la cellule [112]. Or, les ROS jouent un rôle important dans la signalisation conduisant à la mort cellulaire [113]. En effet, les ROS peuvent maintenir et amplifier le stress conduisant à une déstabilisation du lysosome [73]. Par conséquent, il est important d'analyser le rôle des ROS dans l'induction de la mort cellulaire via le CD40. Dans le but d'évaluer l'impact des ROS, nous avons utilisé l'antioxydant NAC pour empêcher leur génération. NAC agit comme promoteur de la glutathion réduite (GSH) qui agit comme un réducteur. Comme on peut le voir dans la figure 3-5A (p. 57), le prétraitement des cellules Raji avec une concentration de 10 mM de NAC a réduit l'induction de la mort cellulaire par le G28.5. Donc, on peut conclure que la présence des oxydants est requise pour l'induction de la mort par le CD40.

3.7 Le CD40 induit la mort cellulaire via cathepsine B

L'implication du lysosome dans l'apoptose a été rapportée dans plusieurs études [72, 73, 114]. Cependant, la déstabilisation du lysosome était souvent due à une signalisation induite par le BCR dans les lymphocytes B. Par ailleurs, van Nierop K., et al., ont démontré que le CD40 protégeait les lymphocytes B des centres germinaux en empêchant la déstabilisation du lysosome et la libération de la cathepsine B dans le cytosol. Or, durant leur étude, ils ont observé que le CD40 pouvait, des fois, induire une déstabilisation du lysosome, une LMP. Par conséquent,

ceci nous a incités à étudier l'implication du lysosome et des cathepsines dans l'induction de la mort par le CD40 dans les cellules Raji.

Pour étudier l'implication du lysosome dans la mort cellulaire induite via le CD40, nous avons observé l'effet de l'anti-CD40 sur la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) à l'aide de l'acridine orange. L'acridine orange émet une fluorescence rouge d'une forte intensité lorsqu'elle est sous forme protonée dans le milieu acide du lysosome. Or, à cause d'une déstabilisation du lysosome, l'acridine orange émet une fluorescence rouge d'une faible intensité (AO low) lorsqu'elle est diffusée dans le cytosol, dû à un environnement neutre. Suite à une stimulation des cellules Raji par l'anti-CD40 pendant 24 h, nous avons évalué l'effet sur LMP par un marquage à l'acridine orange. Un changement du LMP est induit seulement lorsque les cellules Raji et les cellules HEK 293 sont stimulées avec le G28.5. L'effet spécifique du G28.5 sur LMP, des cellules Raji et HEK 293, est traduit par un grand pourcentage de cellules exprimant un faible pourcentage d'AO « AO low » (Figure 3-5B-C, p. 57). De plus, parallèlement à un changement du LMP, il y a aussi une hausse du pourcentage de la mort cellulaire (Figure 3-5B-C, p. 57). Une variation du LMP induit forcément la libération d'enzymes lysosomales comme les cathepsines. Pour analyser la contribution des cathepsines dans notre système, nous avons prétraité les cellules Raji avec un inhibiteur général des cathepsines, Fa-Z-FMK (200 μ L), et/ou avec un inhibiteur spécifique de la cathepsine B, CA-074ME (100 μ L). Les résultats montrent que les deux inhibiteurs réduisent de moitié l'induction de la mort cellulaire par le CD40 (Figure 3-5D, p. 57). Cela suggère que l'induction de la mort cellulaire par le CD40 passe par une déstabilisation du lysosome et une implication des cathepsines dans ce phénomène, plus spécifiquement l'implication de la cathepsine B dans la mort cellulaire induite via CD40.

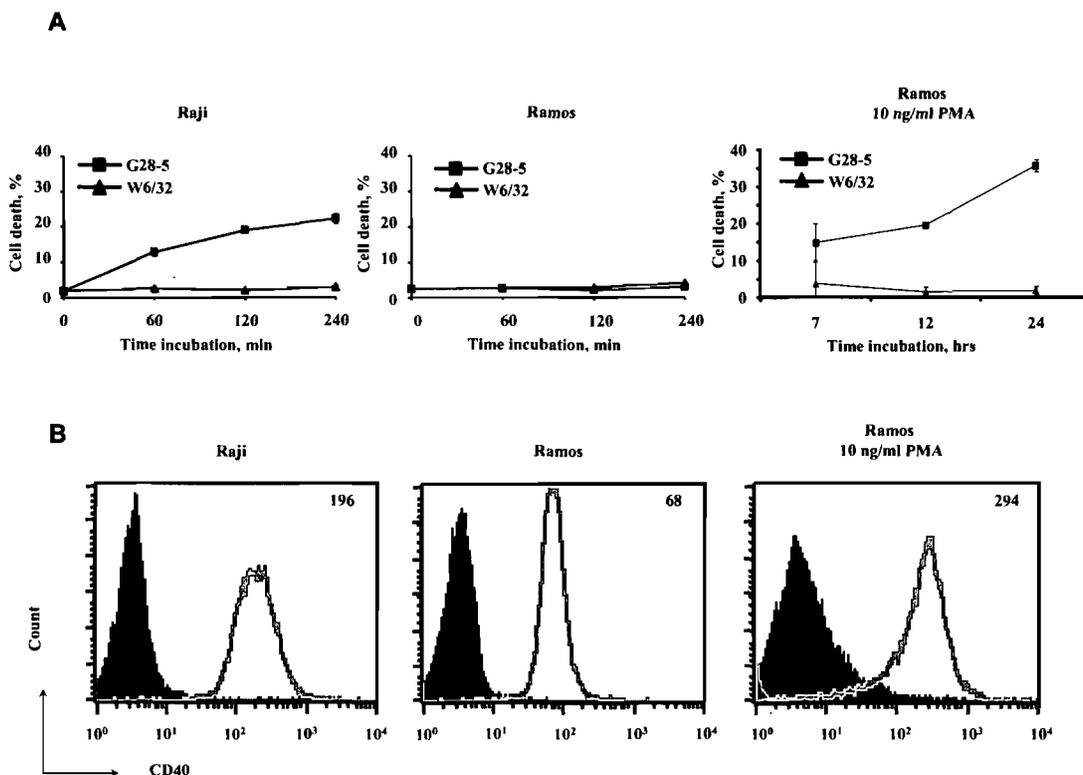


Figure 3-1: L'induction de la mort cellulaire par le CD40 dans les lymphomes de Burkitt.

(A) Les cellules Raji, Ramos ou Ramos prétraitées avec du PMA ont été stimulées avec $1 \mu\text{g/mL}$ de l'anti-CD40 (G28.5) ou de l'anti-CMH classe I (W6/32) comme contrôle négatif. Après l'ajout des anticorps pour les temps indiqués, la mort cellulaire a été observée par l'analyse de l'absorption de propidium iodide (PI) ($1 \mu\text{g/mL}$) par cytométrie en flux. Les résultats représentent une moyenne d'un triplicata d'une expérience répétée trois fois. (B) L'analyse par cytométrie en flux du niveau de l'expression du CD40 sur la surface des cellules Raji, Ramos et Ramos prétraitées avant la stimulation avec les anticorps.

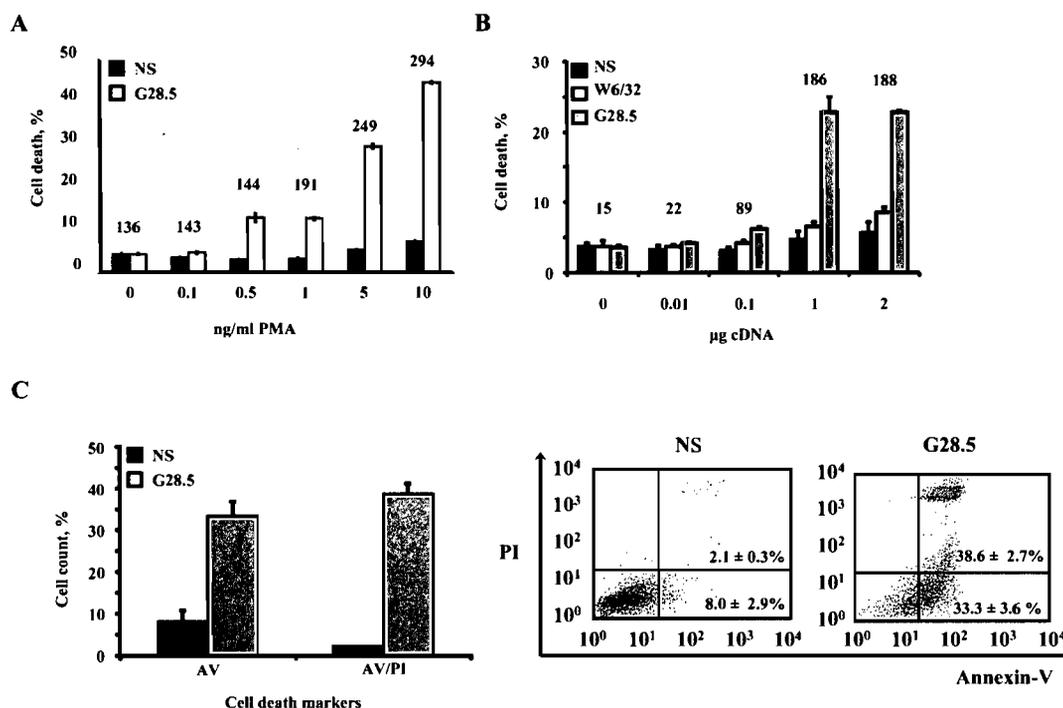


Figure 3-2: Corrélation entre le niveau d'expression du CD40 et la sensibilité à la mort cellulaire.

(A) Le niveau d'expression du CD40 sur la surface des cellules Ramos prétraitées avec différentes concentrations de PMA est indiqué au dessus de chaque échantillon dans le graphique. La mort cellulaire a été analysée par absorption de PI après l'incubation des cellules Ramos avec différentes concentrations de PMA uniquement ou une combinaison de PMA et de G28.5 (1 µg/mL) pendant 24h. (B) Les cellules HEK 293 ont été transfectées de manière transitoire pendant 48h avec différentes concentrations du plasmide contenant le CD40 WT. Le niveau d'expression du CD40 après la transfection est indiqué au dessus de chaque spécimen dans le graphique. Puis, la mort cellulaire des HEK transitoires a été analysée après 24h de stimulation avec le G28.5 ou le W6/32 à l'aide du PI. (C) Les HEK 293 stables exprimant le CD40WT ont été stimulées pendant 24h avec l'anti-CD40 (1 µg/mL) ou avec du milieu. Le pourcentage de mort cellulaire est représenté par les cellules marquées positivement à l'annexin V (AV) lorsqu'elles sont analysées par cytométrie en flux. Les résultats représentent une moyenne d'un triplicata d'une expérience répétée trois fois.

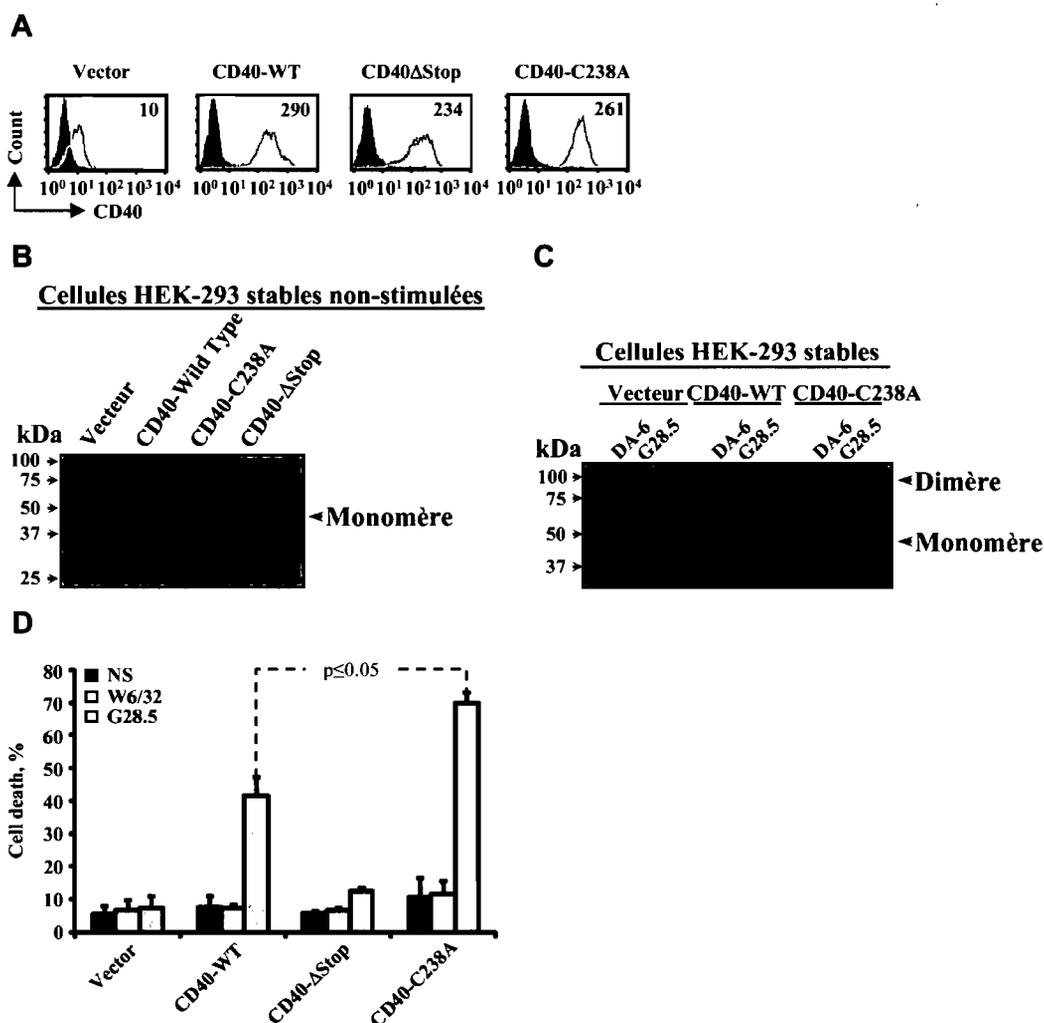


Figure 3-3: La mort cellulaire induite via le CD 40 est indépendante de son homodimérisation.

(A) L'analyse par cytométrie de l'expression du CD40 sur la surface des cellules HEK transfectées avec le plasmide seul, CD40-WT, CD40-C238A ou le CD40DStop. L'effet des mutants sur la protéine du CD40 a été démontré par western blot. (B) On peut voir une réduction du poids moléculaire du CD40 ayant le domaine cytoplasmique tronqué (CD40 Δ) après analyse par western du lysat des cellules HEK transfectées non-stimulées. (C) De plus, la mutation de la cystéine 238 empêche l'homodimérisation du CD40 et ce, après une incubation de 24h avec 1 μ g/mL de G28.5 ou DA-6 (anti-chaîne α du CMH classe II) comme contrôle négatif. (D) Les cellules HEK ont ensuite été stimulées avec 1 μ g/mL de G28.5 ou W6/32 pendant 24h. Puis la mort cellulaire a été analysée par l'absorption du PI. Les résultats représentent une moyenne d'un triplicata d'une expérience répétée trois fois.

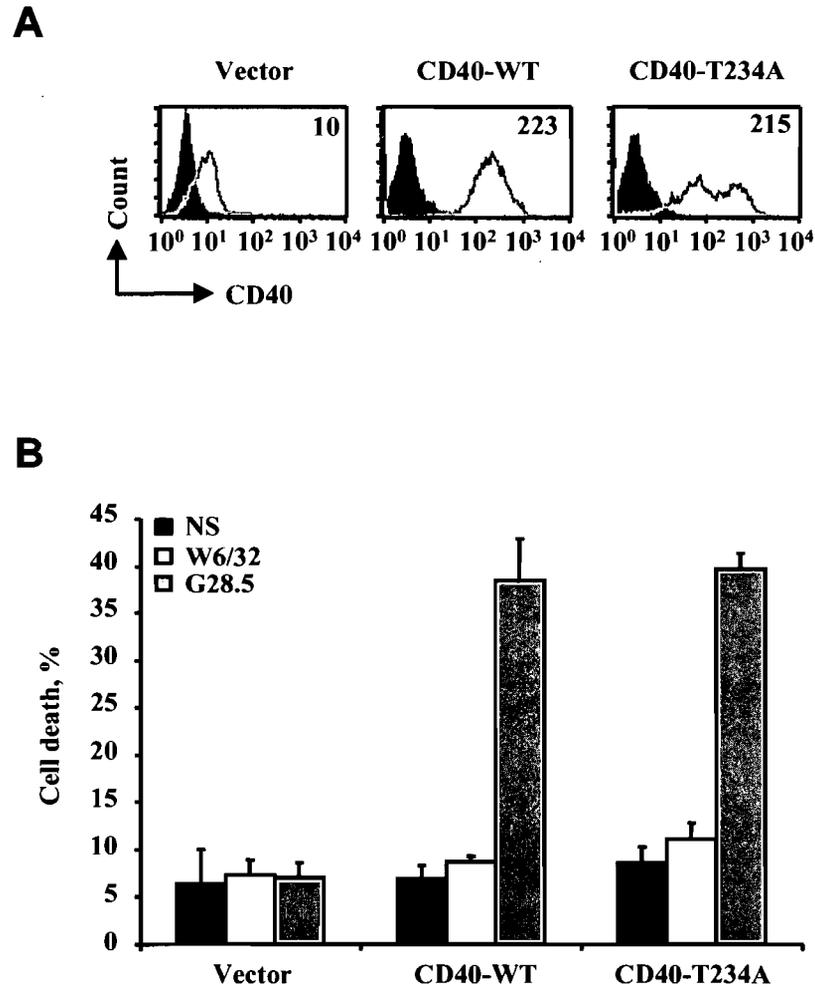


Figure 3-4: La non-implication des TRAF2, 3 et 5 dans la mort cellulaire induite via le CD40.

(A) L'analyse par cytométrie de l'expression du CD40 sur la surface des cellules HEK stablement transfectées avec le plasmide seul, CD40-WT, CD40-T234A. (B) Les cellules HEK ont ensuite été stimulées avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G28.5 ou W6/32 pendant 24h. Puis la mort cellulaire a été analysée par l'absorption du PI. Les résultats représentent une moyenne d'un triplicata d'une expérience répétée deux fois.

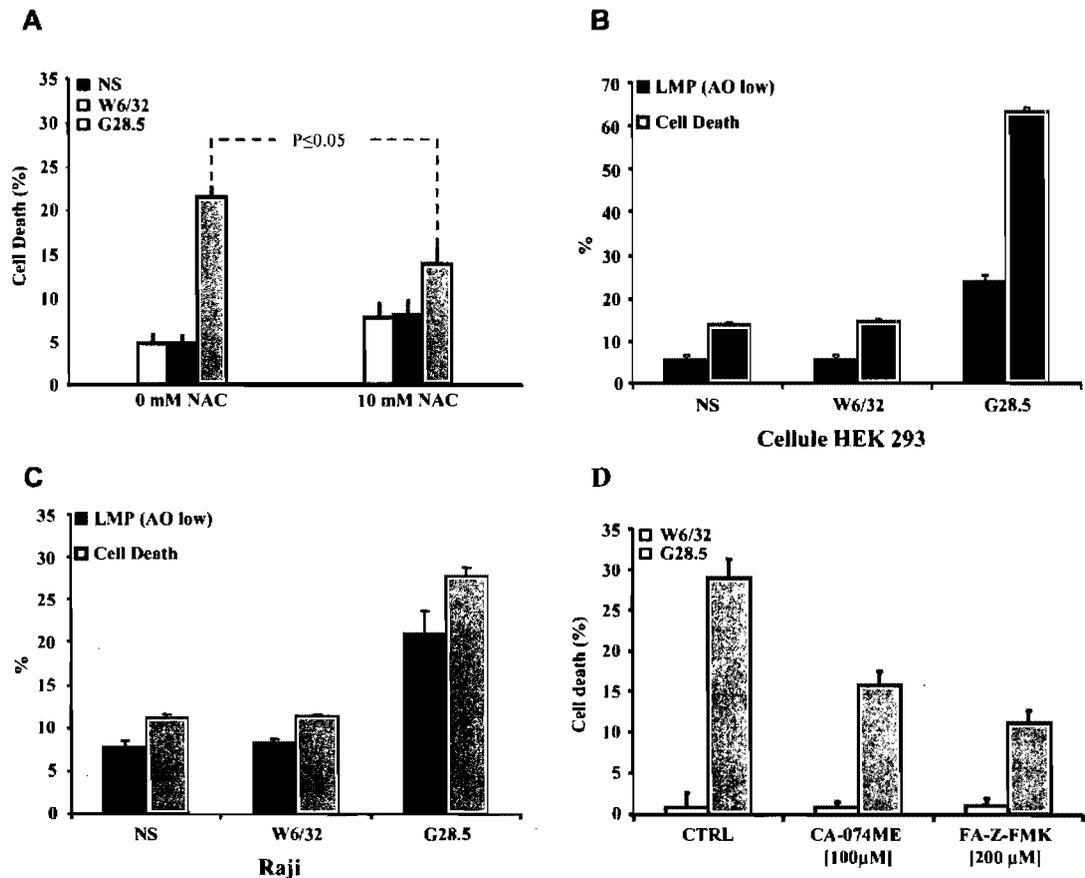


Figure 3-5: L'implication du lysosome et du ROS dans la mort cellulaire induite par le CD40.

(A) Dans le but d'étudier l'implication des ROS, les cellules Raji ont été prétraitées pendant 1h avec un antioxydant, NAC, (10 mM) dans un incubateur à 37°C. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 24 h avec le milieu, W6/32 et G28.5. (B, C) Les cellules Raji et HEK 293 transfectées de manière stable avec du CD40WT ont été stimulées pendant 24h avec de l'anti-CD40, de l'anti-MHC de Classe I ou du milieu. La mort cellulaire a été analysée par l'absorption du PI. La stabilité du lysosome a aussi été analysée par l'acridine orange (AO). Après un traitement similaire à la mort cellulaire, les cellules ont été incubées avec 5 mg/mL d'AO dans l'obscurité à 37°C. Après, l'émission de la fluorescence rouge de 10 000 cellules a été analysé par cytométrie. Le pourcentage de cellule pâle (basse émission de fluorescence rouge, AO low) a été utilisé comme marqueur de déstabilisation du lysosome. (D) Les cellules Raji ont été prétraitées pendant 30 min. avec un inhibiteur général des cathepsines (FA-Z-FMK) et un inhibiteur spécifique de la cathepsine B (CA-074ME). Puis, les cellules ont été stimulées pendant 4 h avec le G28.5 (1µg/mL) ou le W6/32 (1 µg/mL). Les résultats représentent une moyenne d'un triplicata d'une expérience répétée trois fois.

Chapitre 4 Discussion et Perspectives

En plus d'induire l'immunité humorale en stimulant l'activation des cellules T et B, il a été démontré que le CD40 pouvait être impliqué dans l'immunité innée [8]. Ainsi le fait que le CD40 se retrouve sur plusieurs cellules impliquées dans la réponse immunitaire, il est normale de le voir accomplir plusieurs tâches telles que l'activation, l'induction d'une réponse pro-inflammatoire, la stimulation de la prolifération et de la survie, la sensibilisation à la mort ou l'induction directe de la mort cellulaire.

Depuis l'observation de la mort cellulaire induite par le CD40 dans les lymphomes B [102, 115, 116], plusieurs études ont essayé de décrire les mécanismes impliqués. Comme on a pu voir, la signalisation induite par le CD40 est diverse, complexe et dépend du type de cellules impliquées. Certains groupes ont déterminé que le CD40 induisait la mort cellulaire en activant les caspases, par exemple chez les cellules urothéliales et dans les cellules B murines [107, 117]. Notre groupe a démontré que la mort induite par le CD40 dans la lignée cellulaire Raji était indépendante des caspases [103]. Georgopoulos et al ont démontré que l'activation du JNK était requise chez les cellules urothéliales [107], tandis que Hollmann et al ont démontré que la mort cellulaire induite par le CD40 dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBL) passait par l'activation d'ERK [108]. L'objectif de notre étude était de mieux comprendre le mécanisme utilisé par le CD40 pour induire la mort cellulaire chez les cellules B ainsi que dans les cellules épithéliales. Nos résultats suggèrent que l'induction de la mort chez ces cellules nécessite un niveau d'expression élevé du récepteur à la surface. De plus, nos résultats suggèrent que la liaison du CD40 stimule une mort cellulaire impliquant la cathepsine B. Par ailleurs, cette réponse ne nécessite pas la formation d'homodimère CD40/CD40.

La corrélation entre le niveau d'expression du CD40 et l'induction de la mort cellulaire décrite dans notre étude est intéressante car elle montre que le statut de l'activation des cellules joue un rôle majeur dans l'induction de la mort cellulaire. Il a été démontré antérieurement que la plupart des cellules transformées ou malignes expriment un haut niveau de CD40 et que cette caractéristique était nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire via le CD40. Ainsi, une cellule maligne peut induire

un faible niveau d'activation du CD40 en exprimant en faible quantité le CD40L et ainsi maintenir de façon autonome sa prolifération [1]. Par ailleurs, Hollmann et al ont récemment démontré qu'un haut niveau de CD40 sur la surface des cellules DLBL rendait ces dernières sensibles à la mort [108]. Or, selon leur étude cette sensibilité est due à une activation constitutive d'ERK. Notre équipe a montré qui semble être un lien direct entre le niveau d'expression du CD40 et l'induction de la mort.

La nécessité d'un haut niveau d'expression du CD40 pour l'induction de la mort nous a incités à étudier le rôle du CD40 homodimère dans cette réponse. Or, en utilisant un CD40 mutant (CD40-C238A) incapable de former de dimère, nous avons démontré que la mort cellulaire était indépendante de la dimérisation du CD40. Au contraire, un haut niveau de CD40-C238A, comparable au niveau d'expression du CD40 sauvage (CD40-WT) capable d'induire la mort, a rendu les cellules HEK beaucoup plus sensible à la mort. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'homodimérisation du CD40 est reconnue pour induire des voies de signalisation propre à la survie telles que l'AKT/PI3K et le NF κ B [50, 118]. Ainsi, lors de liaison du CD40 sauvage, il y aurait une compétition entre les voies de signalisation de la mort et les voies de signalisation de la survie, ce qui n'est plus le cas avec des cellules transfectées avec le CD40-C238A. Il sera intéressant d'étudier comment le CD40-C238A arrive à augmenter le niveau d'induction de la mort cellulaire. En utilisant, les HEK 293 transfectées avec le CD40-C238A et le CD40-WT, on comparera l'expression des gènes des facteurs pro-apoptotiques tels que p53 ou les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bad...) ou la répression des gènes des facteurs anti-apoptotiques tels que survivin grâce à une RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR). Nous avons récemment décrit l'interactivité entre l'intégrité des radeaux lipidiques et la formation de CD40 homodimère [51]. Donc, comme l'homodimérisation du CD40 ne semble pas être nécessaire, on pourrait déduire que l'intégrité des radeaux lipidiques ne semblerait pas être impliquée dans l'induction de la mort cellulaire via le CD40. De plus, deux études sur deux récepteurs avec des fonctions similaires au CD40, une sur le RCB et l'autre sur le CMH de classe II semble renforcer cette hypothèse. Ainsi, Trujillo et al montrent que l'induction de la

mort cellulaire par le RCB demeure intacte après perturbation de l'intégrité des radeaux lipidiques des cellules B humaines (2G6) à l'aide d'un inhibiteur chimique, Nystatin [119]. De plus, Guo et al ont démontré que l'induction de la mort cellulaire dans les cellules Raji via le CMH de classe II (HLA-DR) se produisait aussi à l'extérieure des radeaux lipidiques [120]. Or, il a été démontré que la partie transmembranaire était nécessaire à la translocation du CD40 dans les radeaux lipidiques [121]. En substituant, grâce à la mutagenèse, le domaine transmembranaire du CD40 avec le domaine transmembranaire du CD45, un récepteur qui n'est pas transféré dans les radeaux lipidiques, on pourra déterminer l'apport des radeaux lipidiques dans l'induction de la mort cellulaire en altérant la molécule du CD40 comme il a été proposé auparavant.

L'induction des voies de signalisation via le CD40 dépendrait de l'association de la partie cytoplasmique du CD40 avec les diverses protéines adaptatrices telles que JAK3 et les TRAFs puisque le CD40 ne possède pas de domaine kinase. Ainsi, il a été déjà rapporté qu'un « Knock down » de TRAF3 réduisait l'induction de la mort via CD40 dans les cellules malignes urothéliales de la vessie. De plus, l'inhibition de TRAF3 se traduirait par un blocage de l'activation de JNK. Or, nous avons utilisé un mutant du CD40 dans lequel le résidu T234 a été muté pour bloquer l'interaction avec les TRAFs 2/3/5 [6, 122]. Or, selon nos résultats, l'utilisation de ce mutant n'a pas diminué l'induction de la mort cellulaire par le CD40. Grammer et al ont démontré que le dominant négatif TRAF3 transfecté dans des cellules B n'affectait pas l'induction de l'apoptose, suite à une activation du CD40, mais plutôt, inhibait totalement la phosphorylation de p38 et partiellement la phosphorylation de JNK [123]. TRAF6 représente un effecteur potentiel de l'apoptose car, on a récemment découvert une liaison directe entre le DED de la pro-caspase 8 et le domaine C-terminal du TRAF6 [44].

On pourra mieux caractériser l'implication des TRAFs dans l'induction de la mort cellulaire via le CD40 en utilisant deux approches. Premièrement, par mutagenèse on pourra altérer l'interaction du CD40 avec les protéines adaptatrices TRAF6 et JAK3 pour déterminer leur implication dans la mort cellulaire. Or, comme nous avons vu

auparavant, les TRAFs peuvent être impliqués dans plusieurs voies de signalisation. Par conséquent, il sera important d'observer de quelle manière la cinétique ou l'interaction des TRAFs avec le CD40 peut influencer l'induction de la mort. Ainsi, en utilisant le mutant CD40-C238A incapable de former d'homodimère, nous pourrions caractériser l'association des TRAFs avec ce mutant pour comprendre le rôle des TRAFs dans l'intensité de la mort cellulaire induite par CD40-C238A.

Auparavant la déstabilisation du lysosome était perçue comme un événement passif impliqué dans la nécrose. Cependant, des études récentes lui confèrent un rôle dans le schéma complexe de l'apoptose [65, 114, 124, 125]. Par ailleurs, tout comme pour l'apoptose impliquant la déstabilisation de la mitochondrie, la déstabilisation du lysosome peut aussi se faire par une voie extrinsèque, à l'aide du TNFR1 et du RCB [72, 79, 114]. Ainsi, nos résultats suggèrent que le CD40 pourrait aussi être impliqué dans la déstabilisation du lysosome. Pour confirmer l'implication du lysosome dans l'induction de la mort cellulaire via le CD40 nous avons étudié le rôle des cathepsines car, les cathepsines sont des enzymes protéolytiques sécrétées par le lysosome dans le cytoplasme. Ainsi, nous avons réduit l'induction de la mort cellulaire en bloquant l'action des cathepsines, avec l'inhibiteur général Fa-Z-FMK, et la cathepsine B spécifiquement, avec son inhibiteur spécifique Ca-074ME. L'action des cathepsines peut induire l'apoptose indirectement par le biais de la mitochondrie ou induire l'apoptose directement en clivant les pro-caspases-9 et -3 [65, 72]. La voie utilisée par le CD40 pour induire la déstabilisation du lysosome est encore inconnue. En se basant sur l'étude d'He et al qui démontrent que le RCB induirait la déstabilisation du lysosome via la phosphorylation de Syk, nous pourrions étudier l'implication de Syk dans la déstabilisation du lysosome via le CD40. Fait intéressant, il a été démontré que la cathepsine B peut être un effecteur dominant de la mort cellulaire dans les cellules malignes [72]. Par ailleurs, Coopman et al ont démontré aussi que l'induction de Syk bloquait la prolifération des cellules cancéreuses du sein [126]. De plus, les ROS peuvent représenter une autre voie d'induction de la déstabilisation du lysosome. En effet, Zhao et al ont démontré que les ROS peuvent être à l'origine de la déstabilisation du lysosome dans les lymphomes de macrophages [127]. Nous avons démontré, comme Hess et al avant

nous, que les ROS étaient nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire. Le rôle des ROS dans la mort cellulaire est très complexe. Les ROS agissent d'une manière dose dépendante. D'ailleurs, la réponse face aux ROS va dépendre de la sévérité du dommage, le type de cellule affecté et la durée de l'exposition au stress. Ainsi, une faible dose de ROS peut induire la prolifération, tandis qu'une dose intermédiaire peut induire un arrêt de croissance. Une dose élevée de ROS peut induire l'apoptose ou la nécrose de la cellule [128]. La manière dont le CD40 induit la production de ROS demeure vague. Ha et al démontrent que dans les cellules B WEHI 231, le CD40 se sert de TRAF3 pour induire la production de ROS par le biais des enzymes NADPH Oxidase (NOX). Un autre moyen de produire les ROS serait par le biais du réarrangement de l'actine du cytosquelette comme dans les cellules B du CG suite à l'activation du récepteur CM1 [71]. Nous avons démontré que le CD40 n'était pas responsable de la déstabilisation de la mitochondrie [51]. Par conséquent, il faudra trouver de quelle manière le CD40 induit la production de ROS et si ce dernier est responsable de la déstabilisation du lysosome.

La prochaine étape serait de voir comment le CD40 induit la mort cellulaire dans un système *in vivo*. Or, on a déjà rapporté, dans une récente étude, que des souris SCID/NOD (immunodéficiente / non obèse diabétique) infectées par des cellules B du lymphome de Burkitt (Raji) et traitées avec du CD40L auraient survécue à l'injection des lymphomes sans développer de tumeur cancéreuse [106]. Présentement, nous avons déjà commencé la génération de souris transgéniques exprimant soit le CD40-WT, soit le CD40-C238A. Ainsi, ces souris seront un outil important pour l'étude et l'analyse du rôle du CD40 dans la mort cellulaire programmée dans un modèle *in vivo*.

Conclusion

En somme, ce travail démontre une corrélation du niveau d'expression du CD40 et l'induction de l'apoptose dans des lignées de cellules B transformées ou activées en tenant compte de la nécessité de la cathepsine B dans l'induction de la mort via le CD40 sans l'aide de la formation d'homodimères. Ces résultats suggèrent un rôle primordial du CD40 dans le contrôle de l'homéostasie des cellules B, tout en limitant leur transformation, et dans le traitement anti-tumoral de façon moins invasive et moins cytotoxique que les traitements utilisant FAS comme agent anti-tumoral.

Ce travail a permis de générer certaines réponses mais d'autres réponses importantes restent en suspens comme qu'elle est l'action des cathepsines dans notre système, d'où proviennent les ROS nécessaires pour l'induction de la mort cellulaire via le CD40. Parallèlement, nous avons aussi généré de nouvelles questions intéressantes. Ainsi, il sera intéressant de comprendre pourquoi le CD40-C238A est capable d'induire un niveau important de mort cellulaire. Pour ce faire, il faudra caractériser l'interaction du CD40-C238A avec les différentes TRAFs et le rôle de ce mutant dans la signalisation qui mène à mort cellulaire.

En conclusion, l'émergence des AcMs tels que Trastuzumab (Herceptin; « humanized anti-HER2/neu/ErbB-2 mAb »), cetuximab (« chimeric anti-epidermal growth factor récepteur mAb ») et rituximab (« anti-CD20 mAb ») pour le traitement des tumeurs a été bénéfique pour amélioration de l'efficacité des thérapies utilisées contre le cancer. Il a récemment été rapporté que l'AcM anti-CD40 agoniste combiné à d'autres AcMs, anti-DR5 et anti-CD137 agoniste pourrait servir de traitement anti-tumoral efficace [129]. Cependant, plusieurs études seront nécessaires pour assimiler le rôle du CD40 dans la mort cellulaire afin d'optimiser son action anti-tumorale tout en préservant son rôle bénéfique sur les cellules saines.

Bibliographie

1. 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.
2. Paulie, S., et al., *A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 1985. **20**(1): p. 23-8.
3. Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(12): p. 4494-8.
4. Gordon, J. and G.R. Guy, *The molecules controlling B lymphocytes*. *Immunology Today*, 1987. **8**(11): p. 339-344.
5. Stamenkovic, I., E.A. Clark, and B. Seed, *A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas*. *Embo J*, 1989. **8**(5): p. 1403-10.
6. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 2-17.
7. 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.
8. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(1): p. 4-43.
9. 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.
10. 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.
11. van Kooten, C., et al., *B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(4): p. 787-92.
12. 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.
13. Gruss, H.J., 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.
14. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. *Microsc Res Tech*, 2000. **50**(3): p. 184-95.
15. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. *Trends Biochem Sci*, 1998. **23**(2): p. 74-9.
16. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 487-501.

17. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Wykes, M., et al., *Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 548-59.
22. Williams, K.T., et al., *C4b binding protein binds to CD154 preventing CD40 mediated cholangiocyte apoptosis: a novel link between complement and epithelial cell survival*. PLoS ONE, 2007. **2**(1): p. e159.
23. Lindahl, G., U. Sjobring, and E. Johnsson, *Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 44-51.
24. Clark, E.A. and A. Craxton, *A CD40 bridge between innate and adaptive immunity*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 724-5.
25. Brodeur, S.R., et al., *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 837-48.
26. 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.
27. Pido-Lopez, J., et al., *Stimulation of cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up-regulates APOBEC3G expression in CD4(+) T cells and dendritic cells*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1671-9.
28. Nolan, A., et al., *Cd40 but not CD154 knockout mice have reduced inflammatory response in polymicrobial sepsis: a potential role for Escherichia coli heat shock protein 70 in CD40-mediated inflammation in vivo*. Shock, 2004. **22**(6): p. 538-42.
29. Faris, M., et al., *CD40 signaling pathway: anti-CD40 monoclonal antibody induces rapid dephosphorylation and phosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins including protein tyrosine kinase Lyn, Fyn, and Syk and the appearance of a 28-kD tyrosine phosphorylated protein*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1923-31.
30. Gulbins, E., et al., *Activation of the Ras signaling pathway by the CD40 receptor*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2844-50.
31. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
32. Ren, C.L., et al., *Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 673-80.

33. Sakata, N., et al., *Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30823-8.
34. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 775-86.
35. Bradley, J.R. and J.S. Pober, *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6482-91.
36. Kobayashi, N., et al., *Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis*. Embo J, 2001. **20**(6): p. 1271-80.
37. Zapata, J.M. and J.C. Reed, *TRAF1: lord without a RING*. Sci STKE, 2002. **2002**(133): p. PE27.
38. Xu, L.G., L.Y. Li, and H.B. Shu, *TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17278-82.
39. Bouwmeester, T., et al., *A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 97-105.
40. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling*. Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 131-51.
41. Busch, L.K. and G.A. Bishop, *The EBV transforming protein, latent membrane protein 1, mimics and cooperates with CD40 signaling in B lymphocytes*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2555-61.
42. Lee, H.H., et al., *Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1421-6.
43. McCarthy, J.V., J. Ni, and V.M. Dixit, *RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16968-75.
44. He, L., et al., *TRAF6 regulates cell fate decisions by inducing caspase 8-dependent apoptosis and the activation of NF-kappaB*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11235-49.
45. Ihle, J.N., *STATs: signal transducers and activators of transcription*. Cell, 1996. **84**(3): p. 331-4.
46. Ahmed-Choudhury, J., et al., *CD40 mediated human cholangiocyte apoptosis requires JAK2 dependent activation of STAT3 in addition to activation of JNK1/2 and ERK1/2*. Cell Signal, 2006. **18**(4): p. 456-68.
47. Dykstra, M., et al., *Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 457-81.
48. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
49. 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.
50. 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. 7799-806.

51. 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.
52. Liu, Y.J., et al., *Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 241-50.
53. Hu, B.T., et al., *Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1068-71.
54. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.
55. Randall, T.D., et al., *Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers*. Immunity, 1998. **8**(6): p. 733-42.
56. Notarangelo, L.D. and M.C. Peitsch, *CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 511-6.
57. 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.
58. Ferrari, S., et al., *Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12614-9.
59. Xu, J., et al., *Mice deficient for the CD40 ligand*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 423-31.
60. Datta, S.K. and S.L. Kalled, *CD40-CD40 ligand interaction in autoimmune disease*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(10): p. 1735-45.
61. Viktorsson, K., R. Lewensohn, and B. Zhivotovsky, *Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies*. Adv Cancer Res, 2005. **94**: p. 143-96.
62. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
63. Blagosklonny, M.V., *Cell death beyond apoptosis*. Leukemia, 2000. **14**(8): p. 1502-8.
64. Siegel, R.M., *Caspases at the crossroads of immune-cell life and death*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 308-17.
65. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 416-23.
66. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
67. Bhardwaj, A. and B.B. Aggarwal, *Receptor-mediated choreography of life and death*. J Clin Immunol, 2003. **23**(5): p. 317-32.
68. Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer, *Death receptor signaling*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 2): p. 265-7.

69. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
70. Meylan, E. and J. Tschopp, *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(3): p. 151-9.
71. Kim, Y.S., et al., *Ligation of centrocyte/centroblast marker 1 on Epstein-Barr virus--transformed B lymphocytes induces cell death in a reactive oxygen species--dependent manner*. Hum Immunol, 2006. **67**(10): p. 795-807.
72. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 999-1010.
73. Guicciardi, M.E., et al., *Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c*. J Clin Invest, 2000. **106**(9): p. 1127-37.
74. Katz, E., et al., *B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI-231 B cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 137-47.
75. Roberg, K., U. Johansson, and K. Ollinger, *Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(11-12): p. 1228-37.
76. Roberts, L.R., P.N. Adjei, and G.J. Gores, *Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis*. Cell Biochem Biophys, 1999. **30**(1): p. 71-88.
77. Roberts, L.R., et al., *Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes*. Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1714-26.
78. van Eijk, M. and C. de Groot, *Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2478-82.
79. He, J., et al., *Lysosome is a primary organelle in B cell receptor-mediated apoptosis: an indispensable role of Syk in lysosomal function*. Genes Cells, 2005. **10**(1): p. 23-35.
80. Hitomi, J., et al., *Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death*. J Cell Biol, 2004. **165**(3): p. 347-56.
81. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
82. Bergeron, L., et al., *Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice*. Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1304-14.
83. O'Reilly, L.A., et al., *Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9*. Cell Death Differ, 2002. **9**(8): p. 832-41.
84. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 437-44.
85. Galea-Lauri, J., et al., *Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following*

- induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology.* J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4109-18.
86. Pandey, P., et al., *Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90.* EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4310-22.
87. Maier, J.K., et al., *The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7.* J Neurosci, 2002. **22**(6): p. 2035-43.
88. Muchmore, S.W., et al., *Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 173-82.
89. Altieri, D.C., *Validating survivin as a cancer therapeutic target.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 46-54.
90. Grossman, D., et al., *Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53.* J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 991-9.
91. Tsuruta, F., et al., *JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins.* EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1889-99.
92. Nomura, M., et al., *14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax.* J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 2058-65.
93. Sawada, M., et al., *Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(4): p. 320-9.
94. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L).* Cell, 1996. **87**(4): p. 619-28.
95. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.* Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
96. Donovan, N., et al., *JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery.* J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40944-9.
97. Kharbanda, S., et al., *Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage.* J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 322-7.
98. Ghatan, S., et al., *p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons.* J Cell Biol, 2000. **150**(2): p. 335-47.
99. Chipuk, J.E., et al., *Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis.* Science, 2004. **303**(5660): p. 1010-4.
100. Heller, R.A., et al., *The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity.* Cell, 1992. **70**(1): p. 47-56.
101. Grell, M., et al., *Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF.* EMBO J, 1999. **18**(11): p. 3034-43.
102. Hess, S. and H. Engelmann, *A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells.* J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 159-67.
103. Leveille, C., et al., *CD40- and HLA-DR-mediated cell death pathways share a lot of similarities but differ in their use of ADP-ribosyltransferase activities.* Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 719-30.

104. Hirano, A., et al., *Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand*. Blood, 1999. **93**(9): p. 2999-3007.
105. Georgopoulos, N.T., et al., *CD40-mediated death and cytokine secretion in colorectal cancer: a potential target for inflammatory tumour cell killing*. Int J Cancer, 2007. **121**(6): p. 1373-81.
106. 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.
107. 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.
108. Hollmann, C.A., et al., *Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase predisposes diffuse large B-cell lymphoma cell lines to CD40-mediated cell death*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3550-7.
109. Wang, F., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23*. J Virol, 1990. **64**(5): p. 2309-18.
110. Kaykas, A., K. Worringer, and B. Sugden, *CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2641-54.
111. Anderson, P., *Kinase cascades regulating entry into apoptosis*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(1): p. 33-46.
112. Ha, Y.J. and J.R. Lee, *Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 231-9.
113. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
114. van Nierop, K., et al., *Lysosomal destabilization contributes to apoptosis of germinal center B-lymphocytes*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(12): p. 1425-35.
115. Funakoshi, S., et al., *Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation*. Blood, 1994. **83**(10): p. 2787-94.
116. Funakoshi, S., et al., *Effects of CD40 stimulation in the prevention of human EBV-lymphomagenesis*. Leuk Lymphoma, 1997. **24**(3-4): p. 187-99.
117. Hollmann, A.C., Q. Gong, and T. Owens, *CD40-mediated apoptosis in murine B-lymphoma lines containing mutated p53*. Exp Cell Res, 2002. **280**(2): p. 201-11.
118. Berberich, I., G.L. Shu, and E.A. Clark, *Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B*. J Immunol, 1994. **153**(10): p. 4357-66.
119. Trujillo, M.A., et al., *Clustering of the B cell receptor is not required for the apoptotic response*. DNA Cell Biol, 2003. **22**(8): p. 513-23.
120. Guo, W., et al., *Signaling through HLA-DR induces PKC beta-dependent B cell death outside rafts*. Eur J Immunol, 2003. **33**(4): p. 928-38.

121. Bock, J. and E. Gulbins, *The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts*. FEBS Lett, 2003. **534**(1-3): p. 169-74.
122. Pullen, S.S., et al., *CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization*. Biochemistry, 1998. **37**(34): p. 11836-45.
123. Grammer, A.C., et al., *TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1183-93.
124. Chen, W., et al., *The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) and FYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40985-95.
125. Yuan, X.M., et al., *Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6286-91.
126. Coopman, P.J., et al., *The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 742-7.
127. Zhao, M., J.W. Eaton, and U.T. Brunk, *Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis*. FEBS Lett, 2001. **509**(3): p. 405-12.
128. Martindale, J.L. and N.J. Holbrook, *Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival*. J Cell Physiol, 2002. **192**(1): p. 1-15.
129. Takeda, K., K. Okumura, and M.J. Smyth, *Combination antibody-based cancer immunotherapy*. Cancer Sci, 2007. **98**(9): p. 1297-302.