



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES
SERVICE DE BIOCHIMIE

PRODUCTION D'UNE PROTEINE CD40L BOVINE RECOMBINANTE
SOLUBLE : UN ADJUVANT VACCINAL POTENTIEL CONTRE LES
MAMMITES A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

PRODUCTION OF A SOLUBLE BOVINE CD40L RECOMBINANT PROTEIN: A
POTENTIAL VACCINE ADJUVANT AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS
MASTITIS

Julien PUJOL

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN
SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2015-2016

Promoteur : Dr. Laurence FIEVEZ

Co-promoteur : Pr. Fabrice BUREAU

Comité de thèse : Pr. Pierre LEKEUX
Pr. Jacques MAINIL
Pr. Fabrice BUREAU
Dr. Laurence FIEVEZ

Président du jury : Pr. Benjamin DEWALS

Composition du Jury : Pr. Christian BURVENICH
Pr. Georges FELLER
Pr. Laurent GILLET
Pr. Christian HANZEN
Pr. Jean-Jacques LETESSON
Pr. Alain VANDERPLASSCHEN

REMERCIEMENTS

“L'échec est le fondement de la réussite” aurait dit Lao-Tseu. Lisant ces mots après quelques mois de doctorat, je compris que j'avais fait le bon choix... Aujourd'hui, même si parler de réussite est sans doute excessif, je suis heureux de vous présenter ma thèse. Elle comprend les principaux résultats obtenus à l'issue des 6 années passées au laboratoire d'immunologie cellulaire et moléculaire. Durant cette longue période, au-delà de l'enseignement scientifique reçu, ce sont les belles rencontres, les amitiés sincères, la découverte de personnalités admirables que je retiens. Puisque l'occasion se présente, je vais maintenant adresser, avec bienveillance et maladresse, quelques mots à tous ceux qui ont compté dans ma vie de chercheur.

Je remercie en premier lieu Fabrice 1, siège social du laboratoire, pour m'avoir accueilli. Je remercie Fabrice 2 pour son soutien scientifique efficace, son expérience, ses conseils avisés et son intelligence. Je te remercie pour la gestion en “bon père de famille” de notre petit labo, sans quoi rien n'aurait été possible et j'espère que le bonhomme de neige va garder encore longtemps sa carotte. La profonde humanité dont tu fais preuve est rassurante, j'ai aimé ton humour et ta folie... Merci de m'avoir permis de vivre l'expérience de ces 6 années.

Je remercie bien entendu Laurence, collègue et promotrice dévouée. Je n'ai pas oublié que je te devais un poème, alors tant pis pour toi...

Laurence,

Merci pour ton soutien sans faille
Ta gentillesse, le sérieux de ton travail
Ton intelligence, ta motivation imperturbable
Ta modestie, ton savoir incommensurable

... J'arrête là par respect pour les poètes. Je rajouterai que nous avons formé un bon duo, besogneux, sachant utiliser les compétences de chacun. Merci pour ton aide dans tant de domaines : j'ai toujours été rassuré et impressionné par ton efficacité. J'ai vraiment aimé travailler avec toi. Merci à ma deuxième maman que j'aime beaucoup.

Un rien plus sobrement, je remercie tous les membres du jury. Je remercie le Pr. Pierre Lekeux pour son soutien lors des réunions avec les partenaires financiers ainsi que pour son intérêt envers le vaccin contre les mammites. Son talent pour vendre le projet nous a permis de réaliser l'essai clinique final. Un grand merci. Je remercie également le Pr. Jacques Mainil, pour son soutien et sa participation aux réunions de comité de thèse, pour l'intérêt marqué qu'il porte au projet et ses remarques judicieuses. J'en profite pour remercier le CER de Marloie qui a réalisé l'essai clinique et particulièrement Eric Fichant pour son investissement personnel. Je remercie également le Pr. Frédéric Rollin et tout le service de médecine des Ruminants de la fac vétérinaire pour l'aide généreuse fournie lors des premiers tests. Je remercie particulièrement Léo, Vincent, Anna, François et Arnaud. Je remercie enfin Isabelle Dufrasne et les hommes forts de la ferme expérimentale : Antoine, Driss, Seb et les autres. Un immense merci. Votre aide et votre travail rigoureux a permis de tester le vaccin dans les meilleures conditions et de montrer pour la première fois son effet chez la vache. Je remercie le CIP, particulièrement le Pr. Moreno Galleni et Fabrice Bouillenne. Un grand merci, Fabrice, pour m'avoir toujours accueilli et aidé quand j'en avais besoin.

Je remercie maintenant mes collègues, pour la plupart devenus amis. Je ne tarirais normalement pas d'éloges à votre égard, mais le manuscrit étant encore long, je ferai au plus court. Par ordre de jeunesse décroissante : Merci Joey pour ta giga bonne humeur et ton intense

REMERCIEMENTS

sens de l'humour, que, même si je ne devrais pas t'encourager, j'apprécie beaucoup... Courage pour débiter cette thèse! Merci Tigrou pour ton amitié sincère, ta vivacité d'esprit, ta profonde gentillesse, ton verbe assassin. Merci de m'accompagner dans des randonnées internationales préparées après coup... Je te souhaite un maximum de réussite à tous les niveaux et un chouia de confiance en toi. Et puis je suis bien d'accord avec ton regard critique de la société et ta conclusion générale : "qu'elles aillent toutes c***** ces t**** f***** !" . Merci Dorien pour ton style ultra placide que j'aime bien. Merci Coraline pour ta bonne humeur malade, ta douce folie, ta naïveté et tes grimaces. Merci de poser les questions cruciales telle la différence entre un chiot et un bébé chien. Merci Adeline pour ta ligne sportive et racée, pour la joie de vivre qui rayonne généralement de ton sourire. Dommage que notre concours de sosie réciproque n'ait pas abouti... Merci Stef pour ta franchise et ta gentillesse, pour tes convictions délirantes ou profondes. Merci pour les compliments que tu me fais régulièrement. Enfin, depuis le temps que tu veux partir, je ne peux que te souhaiter "bon vent" comme on dit dans Thalassa. Merci Sophie pour ta gentillesse, merci d'être si bon public et de ne pas pouvoir respirer sous l'eau! Encore désolé pour les 3 mètres cubes... Merci Catherine S. pour ta douceur et ta discrète empathie, tes étternuements de bichon nain et tes petites indignations. J'ai toujours su que tu rêvais d'enseigner la biochimie... Merci Pedredon pour être toujours motivé à manger et surtout boire. Merci pour toutes ces folles soirées passées en trio lors de l'adolescence du petit... Merci d'être éternellement content, joyeux et même drôle! Merci Amélie pour tes crumbles à la viande et tes performances en aquariophilie... Merci pour ce périple inoubliable en Californie ! Merci Gael pour les activités sportives. Merci Jérôme pour ta passion café. Tu es un garçon bien sympathique même si tu as une tête de français... Merci Irène pour ton accent chantant, merci de râler contre un peu tout mais de m'expliquer toutes tes misères en m'offrant des snacks et des cafés. Merci Thomas de partager avec moi, après quelques verres de trop, le goût du risque... Merci Zheshen d'être un ami fidèle, d'être toujours prêt à m'aider. Merci pour ta très grande générosité, les albums photo, merci d'être à l'écoute, pour ta franchise et de m'inciter à renouveler ma garde-robe... Merci pour les vacances passées ensemble, pour le voyage en Islande, merci de faire connaître la cuisine chinoise à Mémé... Je te souhaite la plus belle vie après cette fichue thèse. Merci Marie pour ton énergie et ton humour, tu es partie trop tôt... Merci Claudia d'être toute petite et rigolote, merci d'être constamment choquée... Merci Catherine M. pour ton humour au top, ton humeur radieuse et ta sociabilité extrême. Merci pour ton énergie sauf le matin avant 11 h 30... Merci pour tes records de courbatures lors de nos virées à vélo, pour nos matchs de tennis et notre amitié solide. Ton départ a laissé un vide. Merci Gene pour ta gentillesse, ton sourire et ton pantalon de kimono. Merci Eve pour ton innocente gentillesse. Tu as largement égayé mes séjours à la FMV. Merci Ludo pour les soirées festives, et les barbecues dans ton salon... Merci Raafat pour ton aide précieuse et indispensable, pour ta bonne humeur, ta spécialisation en ragots, bières et relations amoureuses... Merci de motiver les troupes et d'organiser sorties et soirées! Merci Claire, tu m'as accompagné pendant si longtemps dans nos études ou le travail que je me demande ce que tu attends pour te mettre au chômage... Je ne me souviens pas de tout mais me rappelle que nous avons bien ri et c'est déjà beaucoup. Merci Hugues pour avoir guidé mes premières pipettes. Merci Christophe P. pour ton humour et ta passion des jeux de mots... Merci Agnieszka pour tes bouclettes blondes, ton accent et ta bonne humeur. Merci Laoura pour tes histoires sordides qui ont longtemps agrémenté nos repas. Merci Christophe D. d'avoir gardé la ligne. Merci pour ton érudition, ton calme et ton langage châtié... Merci mon petit cèdre pour ton amitié, ta générosité et ta gentillesse, ta drague expérimentale, tes nombreuses blagues et ton humour parfois fin... Je te souhaite des jolies filles à la pelle et du succès dans ton entreprise immobilière... Merci Sandra pour ton aide au Facs et tes ponchos. Merci Dim d'être tellement gentil, malin et drôle. Tu n'es pas vraiment gros en fait... Merci Nathalie d'avoir accepté Christophe dans ton bureau pour qu'il fasse moins de bruit. Merci Ilham pour le travail que tu fais avec zèle et bienveillance. Merci d'avoir toujours une anecdote sur n'importe quel sujet et d'être très bon public. Merci Raja pour ton calme tellement apaisant. Merci de vouloir me caser... Merci Monique pour tes défilés en maillot de bain, ta bonne humeur, ton analyse éclairée des relations humaines. Merci Kim pour

REMERCIEMENTS

ta compagnie en biochimie et ton caractère joyeux et surprenant. Merci Tania pour ton style bougon et pince sans rire. Merci à Sandra, Caroline, Isabelle, Aurélie, Sophie, Alexis de la coordination du GIGA pour le travail remarquable et l'aide souriante et efficace apportée. Merci à vous tous. C'est avec grande émotion que je vous quitte. J'ai été très heureux de travailler et de vivre tant de choses avec vous. Ce n'est, je l'espère et ferai le nécessaire pour, qu'un au revoir.

Je remercie aussi tous mes amis, rencontrés au collège, au lycée ou pendant mes études vétérinaires qui ne sont pas rattachés à l'université. Merci Cédric, Milvic, Thomas, Nico, Johan Fred, Momo, Seb, Camille L, Camille R et Ophélie et quelques autres d'être restés fidèles malgré l'éloignement. Merci pour nos rares mais joyeuses retrouvailles.

Je remercie maintenant ma famille, Papa, Maman, Vincent, Pépé, Mémé, Papi, Mamie, toutes les cousines, les tatas et les tontons. Merci de m'avoir toujours soutenu, choyé, félicité, même si comme Papa, vous vous êtes souvent demandé ce que je fichais encore à la fac « alors qu'il y a plein de bestioles à soigner ici ». Je suis très heureux de pouvoir enfin passer un peu de temps avec vous. Je te remercie enfin, Cécile, pour ta douceur, ton humour malicieux, tes yeux magnifiques, ta curiosité, ton courage face aux guêpes, ta folie... Merci de me faire rire, voyager et découvrir tant de choses. Merci pour la joie de te retrouver, pour tous nos moments complices et tendres.

RESUME

Staphylococcus aureus est le principal agent responsable des mammites chroniques chez la vache laitière. Malgré les lourdes pertes économiques engendrées et les décennies de recherche sur le sujet, aucun vaccin réellement efficace n'a encore été mis au point. Cet échec pourrait être dû à la capacité de survie du pathogène dans les cellules épithéliales mammaires et les phagocytes, où il échappe à l'immunité humorale induite par les vaccins. Les études semblent en effet unanimes sur l'importance majeure de la réponse immune cellulaire, particulièrement la réponse cytotoxique des lymphocytes TCD8⁺, dans la lutte contre *S. aureus*. Il a par ailleurs été prouvé, chez les animaux de laboratoire comme chez l'homme, que l'administration de CD40 ligand est un moyen efficace de stimuler cette réponse. Nous avons alors produit, dans un système bactérien et dans des cellules de mammifères, plusieurs formes de CD40L recombinants bovins multimériques. Nous avons ensuite montré leur capacité à activer *in vitro* le récepteur CD40 de différentes cellules bovines. Enfin, nous avons observé que l'immunisation de bovins avec notre CD40L produit en bactéries, combiné à des bactérines de *S. aureus*, augmentait significativement le nombre et la réactivité des lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ spécifiques de celles-ci dans les noeuds lymphatiques. L'évaluation de la protection conférée par l'adjuvant GST-CD40L lors d'une infection intramammaire expérimentale a malheureusement montré l'incapacité de ce nouvel outil moléculaire à prévenir les mammites bovines à *S. aureus*. Il pourrait cependant rester utile au développement de stratégies vaccinales contre d'autres maladies bovines causées par *S. aureus* ou d'autres pathogènes intracellulaires.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is currently the main pathogen responsible for chronic mastitis in dairy cows. Despite severe economical losses, no effective vaccine has been developed to date. This could be due to the ability of the bacteria to survive intracellularly in phagocytes and mammary epithelial cells, which allows protection against humoral immunity. The most efficient strategy to fight against Staphylococcal infection seems to be the exacerbation of cellular response and particularly CD8⁺ T lymphocyte-mediated cytotoxicity. It has also been proved that in both laboratory pets and human, CD40 ligand administration is a very effective way to trigger this particular immune response. We thus first produced several forms of soluble recombinant multimeric bovine CD40 ligand purified from *E. coli* and mammalian cell production systems. We then observed that they were able to potently stimulate bovine cells *in vitro*. Finally, we provide evidence that immunization of cows with CD40L produced in *E. coli* combined with *S. aureus* bacterins was able to significantly increase the number of both bacterin-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the draining lymph nodes. Unfortunately, intramammary challenge with *S. aureus* has shown the inability of this new molecular tool to prevent *S. aureus* bovine mastitis. However, it could still be useful to the development of vaccine strategies against other bovine diseases caused by *S. aureus* or other intracellular pathogens.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....1

RESUME4

SUMMARY5

TABLE DES MATIERES.....6

ABREVIATIONS.....14

INTRODUCTION.....19

**CHAPITRE 1 : LE POINT SUR LA VACCINATION CONTRE LES MAMMITES
BOVINES CAUSEES PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.....19**

1 L'enjeu économique19

2 Les vaccins actuels.....21

2.1 Les vaccins avec la bactérie tuée entière22

2.2 Les vaccins sous unitaires23

2.3 L'échec de la prévention vaccinale24

3 Comparaison avec la situation chez l'homme24

4 Les raisons biologiques de l'échec thérapeutique25

4.1 Rappels sur la pathogénèse des infections à *S. aureus*25

4.2 Résistance de *S. aureus* à la réponse immunitaire adaptative25

4.3 Survie intracellulaire de *S. aureus*.....26

5 Réussites partielles chez les animaux de laboratoire28

6 Evaluation d'une nouvelle stratégie vaccinale: la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs).29

6.1 Importance des CTLs dans l'immunité bovine.....29

TABLE DES MATIERES

6.1.1	Lors d'infection par des pathogènes intracellulaires	29
6.1.2	Lors des mammites à <i>S. aureus</i>	29
6.2	Efficacité de la stimulation thérapeutique des CTLs spécifiques de <i>S. aureus</i>	30
7	Conclusion	31
CHAPITRE 2 : LE RECEPTEUR CD40 ET SON LIGAND		32
1	Le récepteur CD40	32
1.1	Découverte	32
1.2	Séquence du CD40 bovin	33
1.3	Structure	33
1.3.1	Monomère	33
1.3.2	Multimérisation	35
1.3.2.1	Evidences	35
1.3.2.2	Mécanisme	35
1.4	Expression	38
2	Le CD40 ligand	39
2.1	Découverte	39
2.2	Séquence du CD40L bovin	39
2.3	Structure	41
2.3.1	Monomère	41
2.3.1.1	Conformation générale du CD40L bovin	41
2.3.1.2	Domaine d'homologie des TNFs	41
2.3.2	Multimères	42
2.4	CD40L soluble naturel	44
2.5	Expression	44
3	La liaison CD40-CD40L	45
3.1	Structures impliquées	45
3.1.1	A l'échelle des trimères	45
3.1.2	Au niveau des acides aminés	48
3.1.2.1	Ensemble des résidus impliqués dans liaison CD40-CD40L	48
3.1.2.2	Résidus dont la mutation perturbe la liaison	48
3.1.3	Interactions électroniques	50
3.1.4	Résumé	50
3.2	Transduction du signal	52
3.3	Rôle immunitaire	54
3.3.1	Modulation de l'immunité humorale	54
3.3.2	Régulation de l'immunité cellulaire cytotoxique	59
3.3.2.1	La présentation croisée	59
3.3.2.2	La répression des Treg	63
3.3.2.3	Le CD40L des LTCD8 ⁺	63
3.3.3	Activation des macrophages et de la réponse Th1	64
3.3.4	Activation de l'endothélium et recrutement des leucocytes	64
3.4	Réciprocité de la stimulation	65

TABLE DES MATIERES

3.4.1	La stimulation du ligand par CD40.....	65
3.4.2	Le CD40 des lymphocytes T.....	67
3.4.2.1	Rôle de CD40 sur les LTCD4 ⁺	67
3.4.2.2	Rôle du CD40 sur les LTCD8 ⁺	68
3.5	Interaction CD40L-intégrines.....	69
4	Thérapies ciblant la voie du CD40.....	69
4.1	Intérêts potentiels.....	69
4.1.1	Maladies aggravées par l'activation de CD40.....	69
4.1.2	Maladies améliorées par l'activation de CD40.....	71
4.2	Traitement avec des inhibiteurs.....	71
4.2.1	Anti-CD40L.....	72
4.2.2	Anti-CD40 bloquants.....	72
4.2.3	Autres inhibiteurs.....	72
4.3	Traitement avec des activateurs.....	73
4.3.1	Structure et fonction des activateurs.....	73
4.3.1.1	Les anti-CD40 agonistes.....	73
4.3.1.2	Les CD40L solubles.....	74
4.3.2	Effet sur la réponse immunitaire.....	77
4.3.2.1	Réponse humorale.....	77
4.3.2.2	Réponse des cellules T cytotoxiques.....	78
4.3.2.3	Réponse Th1.....	78
4.3.3	Efficacité contre les tumeurs.....	79
4.3.3.1	Tumeurs traitées avec les anti-CD40 agonistes.....	79
4.3.3.2	Tumeurs traitées avec CD40L.....	80
4.3.4	Efficacité contre les maladies infectieuses.....	80
4.3.4.1	Protection contre les pathogènes intracellulaires.....	80
4.3.4.2	Le cas du bovin et de <i>S. aureus</i>	82
	<u>OBJECTIF.....</u>	<u>83</u>
	<u>SECTION EXPERIMENTALE.....</u>	<u>84</u>
	<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</u>	<u>84</u>
	CHAPITRE 1 : CLONAGE DES DIFFERENTES FORMES DU CD40L BOVIN.....	84
1	Génération des séquences.....	84
1.1	Séquences naturelles.....	84
1.1	Génération de 4 séquences de base.....	85
1.2	Clonage du CD40L soluble en bactéries.....	85
1.2.1	Constructions principales.....	85
1.2.2	Constructions supplémentaires.....	88

TABLE DES MATIERES

1.3	Clonage de la protéine de fusion GST-CD40L en bactéries	88
1.4	Clonage du CD40L soluble en cellules de mammifère.....	90
1.4.1	Formes de recombinants CD40L	90
1.4.2	Formes de recombinants GST-CD40L.....	90
1.4.3	Formes de recombinants FLAG-CD40L.....	93
1.4.4	Formes de recombinants FLAG-GST-CD40L	93
2	Production des protéines.....	93
2.1	CD40L bovin et GST-CD40L produits en bactéries	93
2.2	CD40L bovin produit en cellules de mammifères.....	94
2.2.1	Protocole standard de production	94
2.2.2	Protocole avec inhibiteur du protéasome	94
2.2.3	Protocole final.....	94
3	Purification.....	95
3.1	Purification du CD40L bovin produit en bactéries	95
3.1.1	Extraction et purification.....	95
3.1.1.1	Protocole non dénaturant.....	95
3.1.1.2	Protocole dénaturant	95
3.1.1.3	Protocole mixte.....	97
3.1.2	Dialyse.....	97
3.1.3	Induction de la sécrétion dans le périplasme.....	97
3.2	Purification du GST-CD40L bovin produit en bactéries	97
3.2.1	Extraction	97
3.2.2	Purification au sens strict	98
3.2.2.1	Chromatographie échangeuse d'ions	98
3.2.2.2	Colonnes de détoxification.....	98
3.2.2.3	Utilisation du détergent Triton	98
3.2.2.4	Technique finale	100
3.3	Purification du CD40L bovin produit en cellules de mammifères.....	100
4	Tests de vérification de la production et de la conformation.....	100
4.1	Vérification de la transcription	100
4.2	Dosages protéique	101
4.2.1	Dosage des productions protéiques en bactéries	101
4.2.2	Dosage des productions en cellules eucaryotes.....	101
4.2.2.1	Protéines couplées au GST.....	101
4.2.2.2	Protéines couplées au FLAG	101
4.3	Electrophorèses.....	104
4.4	Test de la capacité de liaison du GST-CD40L à son récepteur	105
4.5	Tests fonctionnels.....	105
4.5.1	Test d'activation des cellules aortiques bovines.....	105
4.5.2	Test d'induction de la prolifération et de l'agrégation des lymphocytes B bovins	106
	CHAPITRE 2 : TEST DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE DE FUSION GST-CD40L IN VIVO CHEZ LE BOVIN.....	107
1	Génisses	107

TABLE DES MATIERES

2	<u>Composition du vaccin.....</u>	107
3	<u>Modélisation du comportement potentiel du GST-CD40L après injection</u>	108
4	<u>Protocole d’immunisation</u>	108
5	<u>Evaluation de la réponse humorale contre HKSA</u>	110
6	<u>Re-stimulation <i>in vitro</i> des cellules des bovins immunisés</u>	110
7	<u>Numération et isolement des lymphocytes TCD8⁺ et TCD4⁺ des bovins immunisés</u>	111
8	<u>Mesure de la prolifération <i>in vitro</i> des lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺</u>	111
9	<u>Protocole du test de protection vaccinale</u>	112
	<u>RESULTATS EXPERIMENTAUX.....</u>	113

CHAPITRE 1 : CLONAGE DU CD40L BOVIN EN BACTERIES 113

1	<u>Clonage du CD40L.....</u>	113
1.1	<u>Production de la protéine.....</u>	113
1.2	<u>Purification.....</u>	113
1.2.1	<u>Solubilité limitée aux tampons dénaturants.....</u>	113
1.2.1.1	<u>Extraction</u>	113
1.2.1.2	<u>Purification</u>	115
1.2.2	<u>Tentatives pour obtenir une protéine à la fois native et soluble</u>	115
1.2.2.1	<u>Purification mixte.....</u>	116
1.2.2.2	<u>Dialyse.....</u>	116
1.2.2.3	<u>Sécrétion dans le périplasme</u>	116
1.2.3	<u>Retrait du <i>tag</i> HIS et test de la solubilité du CD40L humain.....</u>	117
2	<u>Clonage d’une protéine de fusion GST-CD40L</u>	119
2.1	<u>Production et extraction de la protéine</u>	119
2.1.1	<u>Production.....</u>	119
2.1.2	<u>Extraction</u>	119
2.1.2.1	<u>Succès de l’extraction native</u>	119
2.1.2.2	<u>Mise au point d’un protocole de production-extraction sur mesure</u>	120
2.2	<u>Purification et tests d’activité fonctionnelle</u>	122
2.2.1	<u>Principe de la purification utilisée</u>	122
2.2.2	<u>Premier test fonctionnel</u>	123
2.3	<u>Amélioration de la purification et preuve de l’activité du GST-CD40L.....</u>	125
2.3.1	<u>Echec de la chromatographie par échange d’ions.....</u>	125
2.3.2	<u>Echec des colonnes de détoxification</u>	127
2.3.3	<u>Améliorations majeures apportées par le détergent Triton-X-100</u>	127
2.3.3.1	<u>Augmentation de la solubilité et du rendement</u>	127
2.3.3.2	<u>Elimination du LPS.....</u>	128

3	<u>Production d'une protéine contrôlée.....</u>	131
4	<u>Validation de l'activité dans 2 tests fonctionnels différents.....</u>	132
4.1	Test de stimulation de cellules endothéliales bovines.....	132
4.2	Test de prolifération et d'agrégation des lymphocytes B	134
4.3	Comparaison avec l'activité des CD40L commerciaux	134
5	<u>Evaluation des interactions physiques ligand-ligand et récepteur-ligand.....</u>	137
5.1	Interaction ligand-ligand	137
5.2	Interaction ligand-récepteur.....	139

CHAPITRE 2 : CLONAGE DU CD40L BOVIN EN CELLULES DE MAMMIFERES .141

1	<u>Production</u>	141
1.1	Technique.....	141
1.2	Problèmes rencontrés.....	141
1.2.1	Absence de la protéine dans les culots cellulaires	141
1.2.1.1	Détection inefficace	141
1.2.1.2	Production inefficace	142
1.2.2	Absence de la protéine dans les surnageants.....	144
1.2.2.1	Détection inefficace	144
1.2.2.2	Production trop faible.....	146
1.3	Solutions.....	149
1.3.1	Stimulation de la sécrétion	149
1.3.2	Stabilisation de la protéine	149
1.3.3	Amélioration de la détection	150
1.3.4	Remarques.....	152
1.3.4.1	Comparaison des productions de chaque forme de ligand.....	152
1.3.4.2	Solubilité de la protéine du surnageant vs protéine du culot.....	154
2	<u>Evaluation de la structure quaternaire</u>	154
3	<u>Sélection des formes activant le mieux les cellules bovines.....</u>	156
3.1	Les protéines couplées au GST.....	156
3.1.1	Preuve d'une activité diminuée par la fusion avec le GST	156
3.1.2	Explication possible	157
3.2	Formes avec et sans motif de trimérisation.....	157
3.2.1	Comparaison des formes par le test de stimulation des cellules endothéliales	159
3.2.2	Comparaison des formes par le test de prolifération-agrégation des lymphocytes B.....	159
4	<u>Choix du plasmide d'expression</u>	160

**CHAPITRE 3 : EVALUATION DE LA REPOSE INDUITE PAR L'INJECTION
SIMULTANEE DE STAPHYLOCOQUES TUES ET DE GST-CD40L CHEZ LE BOVIN
..... 163**

1	<u>Production d'une dose raisonnable d'adjuvant purifié</u>	163
----------	--	------------

<u>2</u>	<u>Informations apportées par le premier test <i>in vivo</i></u>	<u>163</u>
2.1	Symétrie sagittale des nœuds lymphatiques du bovin	164
2.2	Réponse humorale	164
2.3	Réponse cellulaire locale	166
<u>3</u>	<u>Compréhension du problème</u>	<u>166</u>
3.1	Elimination de « l'effet génisse »	166
3.2	Hypothèse de la biodisponibilité nulle	168
3.2.1	Hypothèse de la destruction par le système immunitaire	168
3.2.2	Hypothèse de la précipitation au niveau du site d'injection	168
3.2.2.1	Fondements théoriques et précision de l'hypothèse	168
3.2.2.2	Vérification	169
<u>4</u>	<u>Modification de la formule et du protocole vaccinal</u>	<u>172</u>
<u>5</u>	<u>Preuve de l'efficacité <i>in vivo</i> de l'adjuvant GST-CD40L produit</u>	<u>172</u>
5.1	Réponse humorale	172
5.2	Confirmation de l'adénomégalie	173
5.3	Prolifération cellulaire <i>in vivo</i>	173
5.4	Prolifération cellulaire après re-stimulation <i>in vitro</i>	175
5.5	Effet sur la réponse cytotoxique spécifique	178
5.6	Diminution de la réponse immune aspécifique?	178
	180	
<u>6</u>	<u>Résultats du test de protection vaccinale</u>	<u>181</u>

DISCUSSION **185**

<u>1</u>	<u>Résumé du travail</u>	<u>185</u>
<u>2</u>	<u>Evaluation de la stratégie thérapeutique</u>	<u>186</u>
2.1	Stimulation des CTLs par CD40L	186
2.2	Choix du CD40L soluble	188
2.3	Présence du GST	188
2.4	Antigène HKSA	189
2.5	Dose	190
2.6	Robustesse économique du vaccin	191
2.7	Choix du plasmide pVAX pour la vaccination ADN	191
<u>3</u>	<u>Evaluation de la technique expérimentale</u>	<u>192</u>
3.1	Qualité de l'adjuvant vaccinal produit	192
3.1.1	Faiblesses	192

TABLE DES MATIERES

3.1.2	Points forts.....	192
3.1.2.1	Efficacité supérieure aux autres CD40L existants	192
3.1.2.2	Absence d'endotoxines	193
3.1.2.3	Conservation par congélation	194
3.2	Qualité du protocole expérimental.....	194
3.2.1	Vérification de l'activité <i>in vitro</i>	194
3.2.2	Vérification de l'activité <i>in vivo</i>	194
3.2.2.1	Faiblesses.....	194
3.2.2.2	Points forts.....	195
4	<u>Evaluation du test de protection vaccinale.....</u>	<u>196</u>
4.1	Choix des groupes contrôles et du nombre d'animaux.....	196
4.2	Choix de la voie d'immunisation	197
4.3	Choix de la souche bactérienne	197
4.4	Choix de la dose inoculée	198
4.5	Résultats obtenus	199
5	<u>Perspectives</u>	<u>200</u>
5.1	Vacciner contre d'autres maladies bovines.....	200
5.2	Améliorer la voie d'administration du vaccin	201
5.3	Soutenir l'action des neutrophiles	202
5.4	Combiner à d'autres adjuvants.....	203
	<u>CONCLUSION</u>	<u>204</u>
	<u>ANNEXES</u>	<u>205</u>
	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>214</u>
	<u>ARTICLE.....</u>	<u>239</u>

ABREVIATIONS

Aa = Acide aminé

ADN = Acide désoxyribonucléique

ADNc = ADN complémentaire

AID = Activation-induced cytidine deaminase

ARN = Acide ribonucléique

ARNm = ARN messenger

ASM = Sphingomyelinase acide

BAEC = Bovine aortic endothelial cell

BAFF = B-cell activating factor belonging to the TNF family

BCL-6 = B cell lymphoma 6

BCR = B cell receptor

BHV-1 = Bovine herpes virus-1

BLIMP-1 = B- lymphocyte-induced maturation protein

BSA = Bovine serum albumin

c-Cbl = casitas B-lineage lymphoma-c

C-CD40L = Forme courte de CD40L extracellulaire

c-IAP = Cellular inhibitor of apoptosis

CCI = Comptage cellulaire individuel

CCR7 = C-C chemokine receptor type 7

CXCR5 = Chemokine (C-X-C motif) receptor 5

CD = Cluster of differentiation

CFU = Colony-forming unit

Clf = Clumping factor

CMH = Complexe majeur d'histocompatibilité

Cna = Collagen adhesin

CP = Capsule polysaccharidique

ABREVIATIONS

CTL = Lymphocyte T cytotoxique

CRD = *Cysteine rich domain*

Da = Dalton

DC = *Dendritic cell*

DO = Densité optique

E74 = Acide glutamique 74 (nomenclature à une lettre des acides aminés, acide glutamique utilisée comme exemple)

E. coli = *Escherichia coli*

EDTA = Ethylène diamine tétraacétique

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ER = Réticulum endoplasmique

FACS = *Fluorescence-activated cell sorting*

Fas = *Apoptosis stimulating fragment*

FasL = Ligand du Fas

FBS = *Fetal bovine serum*

Fnbp = *Fibronectin binding protein*

GC = *Germinal center*

Gp39 = Glycoprotéine 39

GST = Glutathion S-transférase

GVHD = *Graft versus host disease*

HIS = Tag de polyhistidine

HIV = Human immunodeficiency virus

HKSA = *Heat-killed Staphylococcus aureus*

HO-1 = *Heme oxygénase-1*

HRP = *Horseradish peroxidase*

ICAM = *Intercellular adhesion molecule*

IFN = Interféron

Ig = Immunoglobuline

IκB = *Inhibitor of NF-κB*

ABREVIATIONS

I κ K = *I κ B kinase*

IL = Interleukine

Ile = Isoleucine

IP3 = Inositol triphosphate

IRF4 = *Interferon regulatory factor 4*

Irsd = *Iron regulated surface determinants*

JAK 3 = Janus kinase 3

JNKs = *c-Jun N-terminal Kinases*

L-CD40L = Forme longue de CD40L extracellulaire

LB = *Lysogeny broth*

LBGC = Cellules B du GC

LFA-1 = *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LPS = Lipopolysaccharide

LT = Lymphocytes T

LTA = Acide lipoteichoïque

LTfh = Lymphocyte T *helper* folliculaire

MAP3K = *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MCP-1 = *Monocyte chemoattractant protein-1*

MEC = *Mammary epithelial cell*

MIP-1 α = *Macrophage inflammatory protein 1 α*

NFAT = *Nuclear factor of activated T-cells*

NF- κ B = *Nuclear factor-kappa B*

NIK = *NF- κ B inducing kinase*

NK = *Natural killer*

NLPC = Nœuds lymphatiques précuraux

NLPS = Nœuds lymphatiques préscapulaires

NOD = *Non-obese diabetic*

PAGE = *Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*

ABREVIATIONS

PAMPs = Pathogen-associated molecular patterns

PBMC = Peripheral blood mononuclear cell

PBS = Phosphate-buffered saline

PCR = Polymerase chain reaction

PDL1 = Programmed death-ligand 1

Pi3K = Phosphatidylinositol 3-kinase

PKB = Protéine kinase B

PLAD = Pre-ligand assembly domain

PNAG = Poly-N-Acetylglucosamine

PRRSV = Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

PTK = Protein tyrosine kinase

RAG = Recombination-activating gene

RANTES = Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

rFGF = Recombinant Fibroblast Growth Factor

RING = Really Interesting New Gene

RT = Reverse transcription

S. aureus = Staphylococcus aureus

SCC = Somatic cell count

SCID = Severe combined immunodeficiency

SCV = Small colony variant

Sdr = Serine-aspartate (D)- repeats

SDS = Sodium dodecyl sulfate

SHM = Somatic hypermutation

LES = Lupus érythémateux systémique

SOC = Optimal broth with Catabolite repression

STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription

SV40 = Simian virus 40

TAP = Transporter associated with antigen processing

ABREVIATIONS

TCR = T cell receptor

TAK 1 = TGF β -activated kinase 1

Th = T helper

THD = TNF homology domain

TLRs = Toll-like receptors

TM = Transmembranaire

TNF = Facteur de nécrose tumorale

TNFR = Récepteur du facteur de nécrose tumorale

TNFSF5 = Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5

TRAF = TNF receptor-associated factor

TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRAP = Target of RNAIII-activating protein

TRAP (2^e sens) = TNF-related activation protein

Treg = T régulateurs

TSST = Toxic shock syndrom toxin

VCAM-1 = Vascular cell adhesion molecule-1

ZC-CD40L = Forme courte de CD40L extracellulaire avec motif d'Ile

ZL-CD40L = Forme longue de CD40L extracellulaire avec motif d'Ile

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE POINT SUR LA VACCINATION CONTRE LES MAMMITES BOVINES CAUSEES PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Une mammite est une inflammation de la glande mammaire résultant le plus souvent d'une réaction de défense contre un pathogène (Djabri *et al.*, 2002). Elle s'accompagne de modifications de la qualité du lait et d'altérations histologiques. On distingue classiquement les mammites cliniques des mammites subcliniques (tableau 1). Dans les premières, une modification macroscopique du pis (inflammation locale) et parfois également du lait (couleur, caillots de fibrine) est présente, éventuellement accompagnée de signes systémiques. Dans les autres, la numération cellulaire du lait est la seule méthode de diagnostic fiable. On définira finalement la mammite comme étant une maladie caractérisée par un comptage cellulaire individuel (CCI) des cellules somatiques dans le lait élevé (les glandes saines auraient un CCI inférieur à 70 000 cellules par millilitre (ml) d'après Djabri et collaborateurs en 2002).

1 L'enjeu économique

Le coût des mammites (voir annexe* n°1) est, en moyenne, de 100 euros pour une mammite subclinique et de 300 euros pour une mammite clinique (Miller *et al.*, 1993 ; Seeger *et al.*, 2003, Hagnestam *et al.*, 2007 et 2009, Huijps *et al.*, 2008). Les mammites causées par *Staphylococcus aureus* sont très fréquentes. En Flandre, 25 % des infections mammaires seraient dues à *S. aureus* (Piepers *et al.*, 2007). Ce taux est régulièrement retrouvé en Europe, même s'il reste inférieur chez les primipares (Barret *et al.*, 2005; Tenhagen *et al.*, 2006 ; Fox, 2009). *S. aureus* est même considéré comme la seconde cause de mammite subclinique après les *staphylococcus coagulases* négatifs (De Vlieger *et al.*, 2012). Pour une vache infectée, le risque de contagion au reste du troupeau est grand et les chances de succès des traitements antibiotiques, qui diminuent avec l'âge de la vache, le CCI, la chronicité, la charge bactérienne et le nombre de quartiers infectés, sont faibles, si bien que la réforme doit fréquemment être envisagée (Sol *et al.*, 1997; Barkema *et al.*, 2006).

* Les annexes peuvent être ignorées afin d'accélérer la lecture.

INTRODUCTION

Tableau 1. Classification des mammites bovines en fonction de leurs conséquences sur la qualité du lait et sur l'état clinique de la vache (d'après Hanzen, 2014).

	Normal	Sub-clinique		Clinique à sévérite variable	
			1	2	3
			Faible Grade 1	Moyenne Grade 2	Forte Grade 3
Etat général	-	-	-	-	+
Etat de la glande	-	-	-/+	+	++
Aspect du lait	-	-	+	++	+++
Cellules	-	+	+	++	+++
Germes	-	+	+	++	+++

- Absence de manifestations ou + Présence de manifestations

Ainsi, quoique le plus souvent subcliniques, la fréquence élevée associée au caractère persistant et difficilement curable de ces mammites les rend extrêmement coûteuses pour l'industrie laitière. En plus d'une efficacité faible, l'antibiothérapie pose toujours le problème des résidus retrouvés dans le lait. L'élevage laitier complète donc son usage par des mesures d'hygiène lors de la traite et, de manière plus marginale, par l'utilisation de vaccins (annexe n°2). L'approche vaccinale mobilise les scientifiques depuis plus de 50 ans et semble particulièrement intéressante. Nous montrerons les difficultés rencontrées par cette dernière puis tenterons d'expliquer la stratégie envisagée dans notre projet de vaccin.

2 Les vaccins actuels

En 2011, une large revue de la littérature, réalisée par Pereira et collaborateurs donne un aperçu assez optimiste des vaccins contre les mammites à *S. aureus* testés chez le bovin depuis 1984. Ainsi, sur 24 études sélectionnées uniquement selon le critère « réalisé *in vivo* chez le bovin et publié en anglais », 4 montrent au moins une augmentation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire et 6 montrent au moins une « protection ». Dans le cas des 4 premières, il n'y a pas eu de challenge infectieux *post*-immunisation et il n'a pas été détecté de différences entre les taux de nouvelles infections naturelles des vaches vaccinées ou contrôles. Pour les 6 autres études, ce qui est entendu par protection est un quartier qui reste négatif pour la souche bactérienne du challenge lors des échantillonnages réalisés après le challenge. Cette protection concernait 50% des quartiers pour 5 des 6 études et entre 30 et 50% pour la dernière. De plus, 3 de ces études ont montré une réponse humorale et cellulaire jugée suffisante pour expliquer cette protection. Cependant, cette revue se contentait de recueillir objectivement les conclusions des études sélectionnées et ne cherchait pas à les vérifier. En réalité, il est notable que les bons résultats peinent à être reproduits et d'autres revues réalisées dans ce domaine sont nettement moins enthousiastes (Middleton *et al.*, 2008). Nous allons dans cette partie décrire les essais et événements les plus marquants de la recherche sur les vaccins contre les mammites à *S. aureus* chez le bovin. Nous nous concentrerons majoritairement sur les vaccins utilisant la bactérie tuée entière (ou bactérine) car ils ont été les plus testés et restent les seuls vaccins commerciaux jamais produits. Nous aborderons cependant certains essais réalisés avec les techniques plus modernes telles les vaccins sous-unitaires.

2.1 Les vaccins avec la bactérie tuée entière

Lysigin est un vaccin commercialisé dans les années 1970 par Boehringer. Il est composé de 5 souches de *S. aureus* exprimant les antigènes de capsules 5, 8 et 336, majoritairement retrouvées dans les mammites bovines. Son efficacité a été mesurée dans de nombreuses études (Williams *et al.*, 1966 ; Pankey *et al.*, 1985 ; Nickerson *et al.*, 1999) et une diminution des signes cliniques et des comptes de cellules somatiques a souvent été rapportée. Cependant, des études ultérieures méticuleuses n'ont pas confirmé ces résultats. Ainsi, en 2006, Middleton et collaborateurs testent l'efficacité du vaccin Lysigin et de 2 autres formules vaccinales à base de bactérines sur 4 groupes (dont 1 groupe contrôle) de 12 génisses. Les génisses sont vaccinées 2 fois pendant le mois précédant leur première lactation, comme conseillé par Boehringer. Un challenge infectieux a lieu 8 jours après le vêlage et toutes les vaches développent une mammite clinique. Il n'y a donc pas de protection et ils ne voient aucune réduction du CCI ou de la durée de l'infection. De même, l'augmentation de la réponse humorale spécifique dans le lait est excessivement limitée. Cependant, ils constatent une réduction de la durée et de la sévérité des symptômes et une augmentation du taux sérique d'IgG spécifiques de *S. aureus*. En 2009, cette même équipe teste l'effet protecteur de Lysigin sur 90 vaches en lactation (dont 45 contrôles), toujours selon 2 immunisations, mais sans challenge. Dans cette expérience, ils ne constatent aucune diminution du CCI, aucune augmentation des IgG1, IgG2, IgA et IgM mesurés dans le lait. Enfin, autant de nouvelles détections de *S. aureus* ont lieu dans chaque groupe. Pour ces chercheurs, la multiplication des immunisations peut peut-être expliquer l'efficacité rapportée par Nickerson et collaborateurs en 1999.

En 2003, Leitner et collaborateurs ont annoncé une efficacité impressionnante d'un autre vaccin à base de bactérines dans 2 tests *in vivo*. Cependant, quelques années après le 2^e essai réalisé sur un grand nombre de vaches, l'équipe développe une voie vaccinale totalement différente (Leitner *et al.*, 2011), ce qui suppose un échec de ce premier vaccin.

En 2009, un nouveau vaccin contenant des bactérines est commercialisé : le Startvac d'Hypra. Par rapport au Lysigin, il contient en plus le *slime associated antigenic complex* et le *poly-N-Acetylglucosamine PNAG* qui ont permis de réduire la charge bactérienne de manière significative (Perez *et al.*, 2009). Cependant, peu de souches responsables de mammites bovines produisent le slime, ce qui diminue fortement l'intérêt de cette dernière formule.

2.2 Les vaccins sous unitaires

Une seule tentative de commercialisation d'un vaccin sous unitaire a pour l'instant été réalisée, mais plusieurs vaccins ont cependant été testés. Ils sont généralement composés de protéines de surface telles les adhésines et la protéine A, de toxines modifiées ou de polysaccharides de surface. Le premier essai a été réalisé avec la protéine A purifiée par affinité, en 1985, par Pankey et collaborateurs. La vaccination n'a pas diminué le nombre d'infections suite au challenge bactérien mais a augmenté significativement le taux de guérisons spontanées. La vaccination avec les adhésines tels les Fnbp et ClfA a été testée par Shkreta et collaborateurs en 2004. La moitié des quartiers vaccinés ont résisté au challenge infectieux contre seulement 10 % des contrôles. Une immunisation avec le vaccin commercial Mastovac (mis au point en 2006 par LG Life science), contenant la *staphylococcal enterotoxin type C*, a été réalisée par Chang et collaborateurs en 2008. Aucun des 9 quartiers des vaches vaccinées n'a développé de mammites suite au challenge infectieux contre 6 pour le groupe contrôle. Cependant, le très faible nombre d'animaux utilisés, l'absence de dosage d'anticorps spécifiques dans le lait, l'absence 7 ans plus tard de la suite promise de l'étude à grande échelle et l'annotation « a été financé par LG life science » imposent une interprétation prudente de ces résultats. De plus, la purification de la protéine recombinante a été réalisée de manière très grossière dans l'étude de Chang et collaborateurs. En 2011, Leitner et collaborateurs réalisent une immunisation avec la protéine *Target of RNAlII activating protein* (TRAP) recombinante. TRAP est une enzyme membranaire intervenant dans la protection de l'ADN bactérien et son inactivation induit des mutations du locus agr (*accessory gene regulator* = ensemble de gènes régulant l'expression des facteurs de virulences). Ces mutations inhibent l'agressivité de *S. aureus*. Cette étude aurait montré une réduction significative des infections à *S. aureus* et des CCI chez les vaches immunisées pendant la lactation. Les vaccins polysaccharidiques par contre ne semblent permettre le développement d'une réponse immunitaire significative que s'ils sont conjugués à une protéine porteuse (Tollersrud *et al.*, 2001).

2.3 L'échec de la prévention vaccinale

Selon les conclusions de Middleton et collaborateurs en 2008 et 2013, sur l'ensemble des essais cliniques réalisés chez le bovin, certains vaccins montrent une réduction incontestable des signes cliniques et induisent une augmentation de la réponse immunitaire, cependant la réduction du taux de nouvelles infections n'a pas pu être démontrée. En effet, les exemples de protection efficace n'ont pas pu être reproduits de manière systématique avec les vaccins « bactérines » et les 2 vaccins sous unitaires prometteurs n'ont probablement pas été testés avec suffisamment de rigueur. La conséquence de cette conclusion est importante. En effet, dans le cadre de mammites bovines à *S. aureus*, le problème majeur n'est pas la sévérité des signes cliniques car ils sont le plus souvent modérés. En revanche, l'impact économique est dû à l'élévation du CCI et à la chute de production sur une longue période, voir de manière définitive, en raison du très faible taux de guérison. Le but principal d'un vaccin contre les mammites à *S. aureus* est donc au moins la réduction du CCI et si possible la protection contre les nouvelles infections, 2 objectifs qui ne sont malheureusement jamais atteints. En 2013, Middleton et collaborateurs déconseillent même l'utilisation des vaccins actuels, sauf dans des cas de très forte pression d'infection et en réalisant des immunisations beaucoup plus fréquentes. En 2015, Landin et collaborateurs testent le dernier vaccin commercial (Startvac) sur 2 troupeaux suédois (environ 400 vaches vaccinées et 400 contrôles) et concluent à une absence d'effets significatifs sur le CCI, la production de lait, le nombre de mammites cliniques et subcliniques ou le pourcentage de réforme.

3 Comparaison avec la situation chez l'homme

Il est intéressant de remarquer qu'il n'existe pas chez l'homme de vaccin contre *S. aureus*, pourtant responsable de la majorité des infections nosocomiales.

En réalité, 10 vaccins et 6 stratégies d'immunisation passive ont déjà atteint la phase I des essais cliniques et 5 d'entre eux ont terminé la phase III (Jansen *et al.*, 2013). Ces tentatives vaccinales sont également commentées dans plusieurs autres revues récentes (Verkaik *et al.*, 2011 ; Proctor, 2012 ; Salgado-Pabón et Schlievert, 2014 ; Fowler et Proctor, 2014). Finalement, l'absence de vaccin commercial s'explique facilement : les 5 essais de phase III ont échoué ; les autres se sont également montrés inefficaces, ou, sont encore en cours d'évaluation.

4 Les raisons biologiques de l'échec thérapeutique

4.1 Rappels sur la pathogénèse des infections à *S. aureus*

Staphylococcus aureus dispose d'une multitude de facteurs de virulence. Nombre de ceux-ci sont des protéines de surface ou sécrétées permettant d'adhérer aux tissus de l'hôte et d'échapper au système immunitaire, notamment aux neutrophiles et à la réponse innée. Les molécules d'adhésion les plus importantes dans la pathogénie des mammites sont les *fibronectin binding protein* (fnbp), mais au moins une vingtaine sont impliquées (Zecconi et Scali, 2013 ; Foster *et al.*, 2014). L'efficacité des phagocytes est inhibée grâce aux facteurs empêchant leur migration (notamment les *staphylococcal superantigen like* et les *chemotaxis inhibitory protein*), induisant leur lyse (toxines γ , δ , leucocidines), ou permettant la résistance à la flambée oxydative (Zecconi et scali, 2013). D'autres éléments de l'immunité innée tels les peptides antimicrobiens ou le complément sont également pris pour cible. Les facteurs et mécanismes responsables de la résistance de *S. aureus* à l'immunité innée ont été présentés dans de nombreuses revues chez l'homme, la souris et le bovin (Sutra et Poutrel, 1994 ; Kerro Dego *et al.*, 2002 ; Jin *et al.*, 2004 ; Foster, 2005 ; Kampen *et al.*, 2005 ; Zecconi *et al.*, 2006 ; Kraus et Peschel, 2008 ; DeLeo et Otto, 2008 ; Berends *et al.*, 2010 ; Rigby et DeLeo, 2012; Zecconi et scali, 2013 ; Foster *et al.* 2014 ; Van Kessel *et al.*, 2014) et ne seront pas détaillés dans ce travail. Une nucléase récemment découverte permettant à *S. aureus* de se défendre contre la Nettose, sera cependant traitée dans la discussion, dans la mesure où son rôle semble aujourd'hui de première importance.

4.2 Résistance de *S. aureus* à la réponse immune adaptative

Staphylococcus aureus est également capable de mettre à mal la réponse adaptative, celle qui est induite par les vaccins et qui nous intéresse donc particulièrement (Broker *et al.*, 2014).

Ainsi, *S. aureus* échappe aux anticorps vaccinaux grâce à diverses protéines de liaison à la région constante (Fc) des Immunoglobulines G (IgG). Parmi elles, la protéine A de *S. aureus* (SpA) est une protéine principalement membranaire, elle permet notamment à *S. aureus* de s'entourer d'un bouclier d'IgG (DeDent *et al.*, 2007 ; Broker *et al.*, 2014). Une autre de ces protéines, la *Staphylococcal binder of immunoglobulin* (Sbi), est généralement sécrétée et neutralise les IgG du milieu, mais peut aussi être membranaire (Smith *et al.*, 2012 ; Burman *et al.*, 2008). La staphylokinase clive la fraction constante (Fc) des IgGs et augmente la production de plasmine qui dégrade les IgGs (Rooijackers *et al.*, 2005).

S. aureus est de plus capable de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en induisant une forme de tolérance. Il a en effet été montré que les lymphocytes B stimulés par la protéine A et des ligands de TLRs de *S. aureus* devenaient des « B régulateurs » capables de limiter ou d'empêcher les réponses T envers les antigènes de staphylocoques (Shen *et al.*, 2013; Fillatreau, 2011). Les superantigènes de *S. aureus* permettent également cette modulation immunitaire en stimulant exagérément et aspécifiquement les lymphocytes T (Fraser *et al.*, 2000 ; Xu et McCormick., 2012 ; Broker *et al.*, 2014). Il semble qu'une anergie progressive des lymphocytes T se développe plus particulièrement lors d'infection chronique à *S. aureus* chez la souris (Ziegler *et al.*, 2011). De même, les lymphocytes issus des glandes bovines chroniquement infectées par *S. aureus* prolifèrent moins lors des restimulations *in vitro* (Nagahata *et al.*, 2011).

La toxine alpha, enfin, détruit directement les lymphocytes T (Nygaard *et al.*, 2012 ; Berube et Bubeck Wardenburg, 2013).

Nous remarquerons que la protéine A est présente chez 60% des souches responsables de mammites (Sutra et Poutrel, 1994 ; Kerro Deگو *et al.*, 2002). Les toxines superantigéniques sont par ailleurs retrouvées sur 46 à 69 % d'entre elles (Haveri *et al.*, 2007 ; Gunaydin *et al.*, 2011). La toxine alpha serait retrouvée sur la quasi-totalité des souches mais la staphylokinase est peu fréquente (Monecke *et al.*, 2007 ; Haveri *et al.*, 2007).

4.3 Survie intracellulaire de *S. aureus*

Les infections staphylococciques chroniques ou réfractaires aux traitements ont largement été associées à un phénotype particulier de *S. aureus* : le *small colony variant* (SCV ; Proctor *et al.*, 1995). Leur culture sur agar forme généralement de petites colonies à la croissance lente et au métabolisme réduit qui peuvent expliquer une sensibilité diminuée aux antibiotiques (von Eiff, 2008). L'expression des facteurs de virulence est également modifiée : moins de toxines et plus d'adhésines notamment la *fibronectin binding protein* (fnbp). Ils sont enfin souvent auxotrophes pour la menadione et l'haemine (Proctor *et al.*, 2006). Il est de plus en plus évident que ce phénotype est réversible et sous le contrôle de mécanismes régulateurs tel l'agr (kahl *et al.*, 2005).

Les SCVs apparaissent très adaptés à la vie intracellulaire (Sendi et Proctor, 2009). Lors du procédé d'internalisation, les fnbp de *S. aureus* lient les intégrines alpha5beta1 de la cellule hôte par l'intermédiaire d'un pont de fibronectine (Sinha *et al.*, 1999 ; Fowler *et al.*, 2000). Cette liaison induit des modifications du cytosquelette des cellules hôtes aboutissant à l'internalisation dans des phagosomes. Les cellules hôtes internalisent activement les *S. aureus* avec une intensité proportionnelle à l'efficacité de leurs intégrines (Ridley *et al.*, 2012). Les cellules épithéliales et

INTRODUCTION

endothéliales internalisent de manière particulièrement efficace mais d'autres cellules tels les ostéoblastes en sont également capables (Hudson *et al.*, 1995 ; Loffler *et al.*, 2014). L'étape suivante, l'inhibition de la digestion par le phagosome semble contrôlée par l'agr et favorisée par la toxine alpha (Mestre et Colombo, 2013). Cette localisation intracellulaire protège logiquement la bactérie des anticorps (Sendi et Proctor, 2009).

En 2011, Tuchscher et collaborateurs apportent enfin la preuve que ce phénotype est induit par le milieu intracellulaire (déjà évoqué par Vesga et collaborateurs en 1996) et est totalement réversible en 24 h vers le phénotype normal lorsque cultivé dans un milieu classique. Lors d'une infection chronique, il y a donc alternance de phases intracellulaires avec les SCVs et de phases extracellulaires plus aigües.

La présence de SCVs dans la glande mammaire bovine est remarquée en 1962 par Learnau et Sompolinsky qui isolent des colonies naines de *S. aureus* à partir de lait de mammites bovines et les identifient comme agents responsables. En 1969, Sompolinsky et collaborateurs mettent en évidence quelques caractères métaboliques particuliers de souches naines de *S. aureus* isolées d'échantillons de mammites chroniques. En 1974, cette même équipe remarque des résistances importantes à la pénicilline et à la streptomycine. Cette implication dans les mammites chroniques, déjà évoquée par Sompolinsky en 1969, et cette résistance aux antibiotiques a été confirmée *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Brouillette *et al.*, 2004). En 2008, Atalla et collaborateurs apportent des nouvelles preuves *in vitro* de la présence de ces 2 caractéristiques chez le bovin. En 2009, une étude capitale d'Atalla et collaborateurs prouve que l'infection expérimentale de la mamelle par le phénotype SCV induit des mammites plus modérées que l'infection par le phénotype sauvage. Enfin, en 2010, la même équipe démontre que la capacité des SCVs à pénétrer et à persister dans les cellules épithéliales bovines *in vitro* est très supérieure à celle des souches classiques. Ils renforcent ainsi l'hypothèse de la chronicité de la mammite à *S. aureus* favorisée par la survie intracellulaire.

5 Réussites partielles chez les animaux de laboratoire

Chez les animaux de laboratoire, beaucoup d'essais vaccinaux se sont révélés efficaces. Ainsi, les 16 vaccins évoqués plus haut qui ont été testés chez l'homme avaient au préalable montré leur efficacité chez la souris. Historiquement, les premiers essais concernent des immunisations contre les toxines de *S. aureus*. En 1977, Adlam et collaborateurs testent, sur des lapines, un vaccin à base de toxines α ou β purifiées depuis des lysats de *S. aureus* sur base de leurs points isoélectriques et poids moléculaires. L'immunisation avec la toxine β est inefficace et celle avec la toxine α s'avère efficace contre les manifestations suraigües tel l'œdème hémorragique de la mamelle.

De manière générale, des immunisations contre les polysaccharides de capsule, les *Iron regulated surface determinants* (Irsd) et les *Serine-aspartate (D)- Reapeats* (Sdr) , les Clf-A et Clf-B, la *collagen adhésin A* (Cna), la fnbp, La protéine A, la toxine TSST, les enterotoxines A, ou C, le Poly-N-acetyl β -1–6-glucosamine (PNAG) responsable du biofilm, ou encore l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre les *autoinducing peptides* (impliqués dans l'activation de l'agr) ont montré des protections importantes, voir totales chez la souris (Hu *et al.*, 2003 ; Verkaik *et al.*, 2011). De nouvelles cibles sont régulièrement validées dans les modèles murins, tel l'*immunodominant staphylococcal antigen A* (Lorenz *et al.*, 2011) ou encore l'*ESAT-6 like protein* (Zhang *et al.*, 2015).

Enfin, notre laboratoire a montré que la vaccination avec des bactérines de *S. aureus* combinées à des anticorps agonistes du récepteur CD40 induisait une protection partielle contre l'infection expérimentale de la glande mammaire avec *S. aureus* chez la souris (Wallemacq *et al.*, 2012).

6 Evaluation d'une nouvelle stratégie vaccinale: la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs)

6.1 Importance des CTLs dans l'immunité bovine

6.1.1 Lors d'infection par des pathogènes intracellulaires

Chez le bovin, la nécessité d'une réponse CTL a été rapportée dans la lutte contre plusieurs pathogènes. Ainsi, le *bovine herpes virus-1* (BHV-1) persiste même en présence d'une forte immunité humorale (Fuller et Lee, 1992) et il est capable de diminuer la réponse CTL par perturbation de la présentation sur le MHC I (Hariharan *et al.*, 1993). Dès 1995, Tikoo et collaborateurs ont montré que le développement d'une réponse CTL était indispensable pour stopper l'infection. Le protozoaire apicomplexa *Theileria parva*, responsable de la terrible « fièvre de la côte Est » chez les bovins d'Afrique vit également à l'intérieur des cellules et la réponse CTL est l'élément protecteur majeur contre ce pathogène (McKeever *et al.*, 1994 ; Graham *et al.*, 2006). De plus, jusqu'à présent, les seuls vaccins ayant montré une protection contre la maladie étaient ceux ciblant les antigènes restreints au CMH-1 (McKeever *et al.*, 1994 ; Taracha *et al.*, 1995 ; Graham *et al.*, 2006 et 2008 ; Seitzer et Ahmed, 2008). Une implication non négligeable des lymphocytes auxiliaires TCD4⁺ sécréteurs d'IFN- γ , donc de la réponse Th1, a cependant également été démontrée (Mwangi *et al.*, 2011). Le contrôle des infections par le *respiratory syncytial virus* ou *Mycobactérium bovis* dépend également des CTLs (Sacco *et al.*, 2014; Skinner *et al.*, 2003).

6.1.2 Lors des mammites à *S. aureus*

Le phénotype lymphocytaire dominant dans la glande bovine saine est le LTCD8⁺. Lorsqu'une infection par *S. aureus* survient, une augmentation des LTCD4⁺ principalement, est souvent rapportée, surtout pendant la phase aiguë (Soltys et Quinn, 1999 ; Rivas *et al.*, 2000 ; Gronlund *et al.*, 2006). D'autres études montrent au contraire une augmentation des LTCD8⁺ au détriment des LTCD4⁺, mais cela se ferait lors d'une phase plus tardive de l'infection et caractériserait les mammites chroniques (Riollet *et al.*, 2001 ; Leitner *et al.*, 2000a ; Nagahata *et al.*, 2011). De plus, dans ce cas, les LTCD8⁺ présenteraient un phénotype régulateur suppresseur (Park *et al.*, 1993, Riollet *et al.*, 2001). Ce phénotype est déterminé sur base des cytokines qu'ils produisent (Kemeny *et al.*, 1994 ; Noble *et al.*, 1995). Les lymphocytes TCD8⁺ semblent donc soit sous-représentés soit de phénotype régulateur inhibiteur lors des infections mammaires persistantes à *S. aureus*. Il

a été postulé que cela pourrait être la conséquence d'une inhibition de la réponse cytotoxique, orchestrée par le pathogène, afin d'y échapper. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de l'inefficacité de la réponse immune de la mamelle contre *S. aureus*. Cette hypothèse gagne en crédit lorsqu'en 1998, Noble et collaborateurs montrent que les superantigènes, telles les entérotoxines de *S. aureus* peuvent induire la production de LTCD8⁺ suppresseurs. Elle est démontrée pour la première fois lorsque ce mécanisme est observé chez le bovin pour l'entérotoxine C (Ferens *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2001). La sensibilité des LTCD8⁺ aux superantigènes avait de plus déjà été démontrée en 1993 par Herrmann et McDonnald. En 2006, Park et collaborateurs confirment l'hypothèse. Enfin, en 2007, Seo et collaborateurs montrent que cette entérotoxine C induit le phénotype suppresseur à la fois des LTCD8⁺ et des LTCD4⁺ dès 6 jours d'exposition. Ainsi, à la survie intracellulaire de la bactérie, s'ajoute la faible prolifération des LTCD8⁺ et l'inactivation de la réponse CTL *via* les toxines superantigéniques par un grand nombre de souches mammaires de *S. aureus*. La présence de ces 2 phénomènes laisse penser qu'un rétablissement ou une stimulation préventive de la réponse CTL pourrait être une aide considérable dans la défense contre les mammites à *S. aureus*. Nous remarquerons à ce propos que des LTCD8⁺ mémoires spécifiques de *S. aureus* ont récemment été isolés chez les vaches ayant eu une mammite (Mullarky *et al.*, 2010).

6.2 Efficacité de la stimulation thérapeutique des CTLs spécifiques de *S. aureus*

Aucune immunisation n'a à ce jour réussi à induire une forte réponse CTL dirigée contre *S. aureus* chez le bovin. De manière générale, même chez les animaux de laboratoire, l'induction de cette réponse n'a pas été formellement démontrée bien que plusieurs études soient parvenues à induire une réponse Th1 et parfois une prolifération de LTCD8⁺ producteurs d'interféron-gamma (IFN γ) spécifiques de *S. aureus*. Certaines de ces études en ont également montré l'effet protecteur. En 2002, Gomez et collaborateurs induisent une réponse Th1 et montrent l'induction probable de CTLs contre les mammites à *S. aureus* chez la souris. Ils immunisent des souris avec une souche atténuée thermosensible de *S. aureus* par injection intra-mammaire et constatent une augmentation des LTCD4⁺ et LTCD8⁺ producteurs d'IFN- γ . L'induction de LTCD4⁺ et LTCD8⁺ producteurs d'IFN- γ et protégeant spécifiquement contre *S. aureus* a été démontrée en 2007 par Gaudreau et collaborateurs. Ils testent un vaccin ADN codant pour le ClfA, la FnBPA et la sortase A et multiplient le taux de survie suite au challenge infectieux par 3. D'autres études ont montré une protection dépendante de la réponse T avec implication de l'IFN γ (Buzzola *et al.*, 2006). De même Spellberg et collaborateurs en 2008 transfèrent des cellules immunitaires de souris

immunisées à des souris non immunisées et remarquent que seuls les lymphocytes T ont un effet protecteur contrairement aux lymphocytes B. Le rôle crucial de l'IFN γ est confirmé par la même équipe en 2009 (Lin *et al.*, 2009). Enfin, dans l'expérience réalisée dans notre laboratoire par Wallemacq et collaborateurs en 2012, une augmentation de la réponse cytotoxique spécifique de *S. aureus* a été observée.

7 Conclusion

La prévalence des mammites à *S. aureus* est élevée et ce pathogène est difficile à éliminer avec les traitements actuels. Les pertes économiques associées sont lourdes et la vaccination est encore peu efficace. Diverses études confirment d'ailleurs une absence de corrélation entre la réponse humorale induite par les vaccins et la protection contre *S. aureus*. Elles montrent, de plus, l'avantage conféré par les traitements stimulant les réponses cellulaires. Il paraît dès lors raisonnable de penser que favoriser artificiellement ces réponses pourrait représenter un moyen de lutte efficace. Nous avons plus précisément ciblé la réponse CTL spécifique de *S. aureus* car elle paraissait la plus adaptée. Nous avons alors orienté nos recherches vers une voie de signalisation cellulaire potentiellement capable de l'induire: la voie du CD40.

CHAPITRE 2 : LE RECEPTEUR CD40 ET SON LIGAND

Les descriptions du CD40 et du CD40L présentées dans cette partie sont, autant que possible, relatives aux protéines bovines. Cependant, lorsque des informations importantes n'ont encore été publiées que pour des molécules humaines ou chez la souris, elles seront utilisées en précisant l'espèce. Nous remarquerons une homologie de séquence peptidique entre l'homme et le bovin de 67% pour CD40 et 88% pour CD40L (figures 1A et 5A respectivement).

1 Le récepteur CD40

Le récepteur CD40 bovin est une protéine de la membrane cellulaire appartenant à la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose des tumeurs (TNFRs). Il porte également les noms de *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (TNFRSF5)* et *B-cell surface antigen CD40*.

1.1 Découverte

En 1984, Paulie et collaborateurs produisent un anticorps dirigé contre l'antigène « Bp50 » présent sur les cellules du carcinome de la vessie et contre les lymphocytes B de lymphome en immunisant des souris avec les cellules de carcinome vésical. L'année suivante, ils montrent que cet antigène Bp50 est présent sur toute la lignée B et qu'il est différent des récepteurs membranaires connus. En 1986, Clark et collaborateurs montrent que son activation induit la co-stimulation des lymphocytes B : tout comme le *B cell growth factor*, il augmente la multiplication cellulaire des lymphocytes B préalablement activés par un anti IgM ou un anti-CD20. Ce rôle est confirmé par Ledbetter et collaborateurs en 1987 qui utilisent également le tetradecanoyl phorbol acetate et l'IL-4 pour l'activation préalable des lymphocytes B. Entre temps, comme plusieurs anticorps monoclonaux produits de manière indépendante semblent activer cette protéine bp50, le cluster de différenciation provisoire CDw40 puis définitif CD40 lui est octroyé. En 1989, on ne lui connaît toujours pas de ligand mais Paulie et collaborateurs suggèrent qu'il est naturellement activé par un facteur de croissance produit de manière autocrine.

1.2 Séquence du CD40 bovin

Le gène CD40 bovin est situé sur le chromosome 13 entre les paires de base 75563477 et 75574221. Il est composé de 10 exons. Il a été séquencé pour la première fois par Hirano et collaborateurs en 1997, mais la séquence définitive n'a été déposée qu'en 2007 par Moore et collaborateurs et publiée en 2008 dans Genbank sous le numéro d'accès BC134765. L'ARNm mature comprend 1309 nucléotides et la séquence protéique 280 acides aminés (aas) (Figure 1 A)

1.3 Structure

1.3.1 Monomère

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I. La figure 1 B détaille la structure primaire du CD40 bovin. La partie extracellulaire de la protéine commence par une séquence de 174 aas (le peptide signal de 20 aas a été clivé avant l'expression membranaire). Vient ensuite la partie transmembranaire, longue de 21 aas puis la queue cytoplasmique C-terminale de 65 aas. La séquence d'acides aminés 21 à 194 est caractérisée par la présence de 8 ponts disulfures (Uniprot, 2015). Ces ponts disulfures sont répartis de manière régulière dans la séquence extracellulaire et interviennent dans la structure tridimensionnelle de 4 unités semblables : les domaines riches en cystéines (CRD). Ces domaines se retrouvent dans tous les récepteurs de la famille du TNF et leurs donnent une structure commune (figure 2).

Le CD40 bovin comprend 2 sites de glycosylation sur les aas 153 et 180 (Uniprot 2015). Cette glycosylation ne semble pas effective chez le bovin (Hirano *et al.*, 1997). En 2010, Vaitaitis et collaborateurs démontrent que les variations de poids moléculaire du CD40 de souris (une forme de 43 kDa et une forme de 48 kDa) ne sont dues qu'à des glycosylations différentes de la même isoforme I du CD40. Ils observent également que la forme 48 kDa semble prédominante lorsque la voie du CD40 n'est pas activée et qu'elle est progressivement remplacée par la forme de 43 kDa lorsque les cellules sont stimulées avec un activateur du CD40. La stimulation semble donc diminuer la glycosylation.

1.3.2 Multimérisation

1.3.2.1 Evidences

En 1989, Eck et collaborateurs émettent l'hypothèse que les récepteurs du TNF-alpha pourraient se trimériser sous l'effet de la liaison avec leur ligand. Cette hypothèse a été confirmée depuis, et la multimérisation, de manière plus générale que la trimérisation, s'est avérée nécessaire à l'activité de tous les récepteurs des TNFs (Banner *et al.*, 1993 ; Hymowitz *et al.*, 1999 ; Bodmer *et al.*, 2002 ; Holler *et al.*, 2003)

En ce qui concerne le CD40, Paulie et collaborateurs montrent en 1989 que le récepteur doit préférentiellement être agrégé pour être actif. En effet, si les anticorps monoclonaux entiers ou la fraction F(ab)2 sont capables d'induire une très forte prolifération des lymphocytes B, l'effet des fragments Fab est quasi nul. Cette agrégation est confirmée en 1995 avec l'étude de Karpussas et collaborateurs. La plupart des auteurs s'accordent à dire que la multimérisation augmente la réponse de la cellule. Ainsi, l'utilisation de ligands artificiels montre que les multimères sont toujours plus efficaces que les ligands monomériques, ce qui ne peut s'expliquer que s'ils se lient à un multimère de récepteurs (Morris *et al.*, 1999 ; Haswell *et al.*, 2001). Il faut cependant signaler qu'au-delà du trimère, les conclusions des études divergent et si beaucoup d'études affichent une corrélation positive entre le niveau de multimérisation et l'effet (Morris *et al.*, 1999 ; Stone *et al.*, 2006), certaines ne remarquent la supériorité du multi-trimère que dans des conditions particulières (Pullen *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Mécanisme

Certains points, tel le rôle du CD40L dans l'induction de la multimérisation restent incompris. Ainsi, on observe bien une augmentation de la dimérisation du récepteur membranaire suite à la stimulation par du CD40L (Reyes-Moreno *et al.*, 2004), mais des études montrent que cette stimulation pourrait ne pas être nécessaire.

Mécanisme dépendant du CD40L

Les céramides sont des molécules lipidiques composées d'une sphingosine et d'un acide gras, présentes dans la membrane cellulaire et jouant un rôle dans l'activation de molécules de signalisation intracellulaire (Gulbin *et al.*, 2002). Les céramides sont issues de l'hydrolyse de la sphingomyéline, un lipide membranaire, par la sphingomyélinase acide (ASM). L'ASM est une enzyme stockée dans des vésicules cytoplasmiques (Grassmé *et al.*, 2001). En 2002, Grassmé et collaborateurs ont montré que l'engagement du CD40 entraînait la translocation de l'enzyme

cytoplasmique ASM dans la membrane cellulaire avec comme conséquence l'augmentation de la production de céramides membranaires. Or, les céramides sont connus pour regrouper les radeaux lipidiques et induire le rapprochement de récepteurs membranaires inclus dans ces radeaux (Grassmé *et al.*, 2001 ; London, 2004). En conséquence, l'activation de l'ASM par la stimulation du CD40 entraîne le regroupement et la multimérisation du CD40, ce qui facilite sa propre activation.

Mécanisme indépendant du CD40L

En 1995, Naismith et collaborateurs observent par cristallographie la formation de dimères et trimères de TNFRs recombinants non exposés au TNF. De plus, en 1999, Papoff et collaborateurs apportent la preuve d'un mécanisme d'assemblage des récepteurs de la famille des TNFs indépendant du ligand. Il s'agit du *pre-ligand assembly domain* (PLAD) situé sur le CRD1 dont la capacité à provoquer la trimérisation a été démontrée pour le Fas et le récepteur du TNF- α et qui se retrouve dans l'ensemble de la famille des TNFs. Ce mécanisme est confirmé par Chan et collaborateurs en 2000 (figure 3). En 2013, Smulski et collaborateurs vérifient ce phénomène sur le CD40 grâce à une protéine de fusion CD40-CRD1.

Enfin, en 2004, un nouveau mécanisme d'agrégation des récepteurs des TNFs, indépendant du ligand, apparaît à Muddipi et collaborateurs : la stimulation du TCR induit la translocation et le regroupement des récepteurs Fas sur les radeaux lipidiques, et, les met dans un état de pré activation. Les radeaux lipidiques sont des domaines de 50 nm de diamètre, riches en sphingolipides et cholestérol, présents sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Ils s'y déplacent et entraînent avec eux des protéines membranaires qu'ils peuvent ainsi regrouper (Simon et Ikonen, 1997). L'observation quelques années plus tôt de CD40 regroupés sur des radeaux lipidiques de lymphocytes B non activés (Hostager *et al.*, 2000) associée au fait que la stimulation *via* CD40L induit aussi le regroupement du CD40 sur ces radeaux (Vidalain *et al.*, 2000) est en faveur d'une voie de multimérisation du CD40 indépendante du ligand.

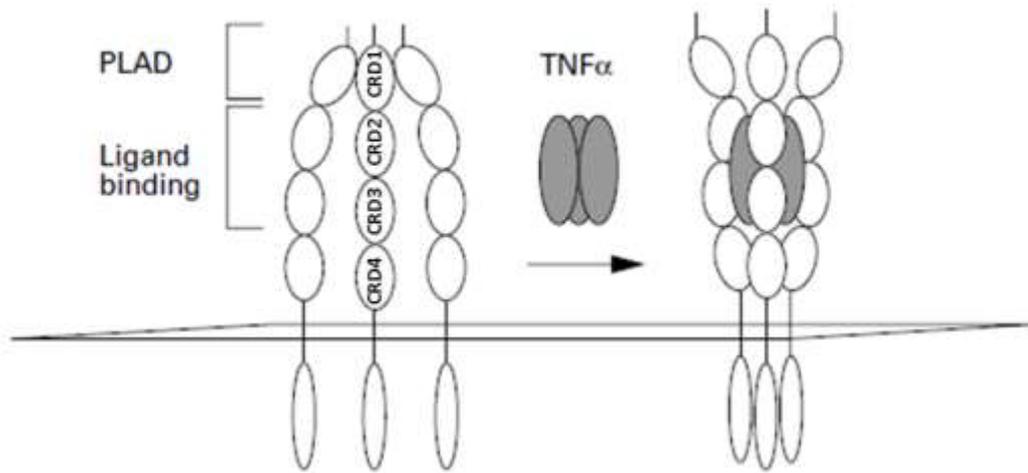


Figure 3. Pré-assemblage des récepteurs du TNF- α par le PLAD (D'après Chan, 2000). Le PLAD, contenu dans le CRD1 de l'extrémité cytoplasmique N-term d'un TNFR interagit avec les CRD1 d'autres TNFRs et rapproche ainsi les TNFRs. Le trimère de TNF se lie alors aux TNFRs pré-associés.

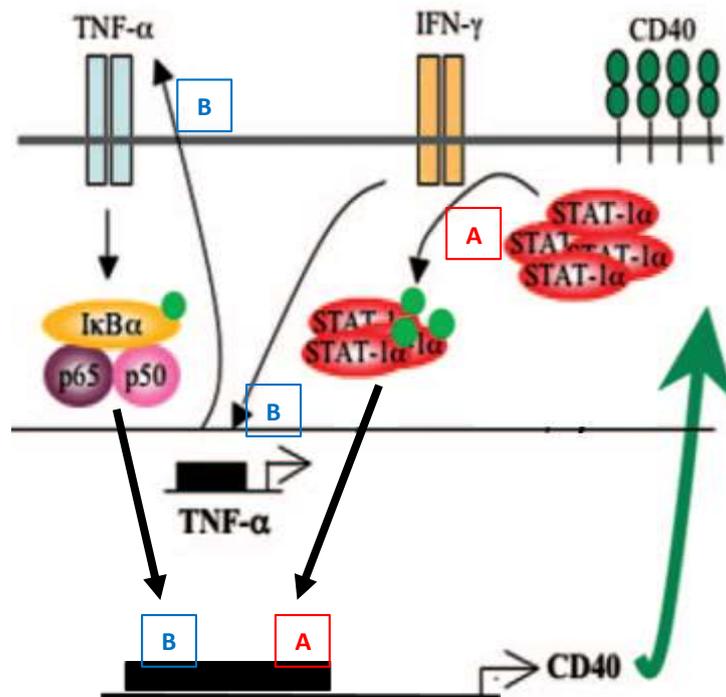


Figure 4. Stimulation de l'expression de CD40 par l'IFN- γ selon 2 voies (adapté de Lee et collaborateurs en 2007). A. l'IFN- γ phosphoryle (disques verts) STAT1 qui active ensuite le promoteur du CD40. B. l'IFN- γ stimule l'expression du TNF- α qui active par voie autocrine NF- κ B qui induit alors la transcription du CD40.

1.4 Expression

Le CD40 est exprimé sur la membrane de nombreux types cellulaires issus des 3 feuillets embryonnaires. Il est présent sur les cellules hématopoïétiques telles les lymphocytes B, monocytes, macrophages, plaquettes, cellules dendritiques et cellules dendritiques folliculaires, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes TCD8⁺ activés. On le retrouve également sur des cellules non hématopoïétiques telles les cellules épithéliales du thymus et du rein, les kératinocytes, les fibroblastes de la membrane synoviale et du derme et les cellules endothéliales (Banchereau *et al.*, 1994). Son expression constitutive a également été confirmée sur les cellules épithéliales des voies respiratoires (Propst *et al.*, 2000).

L'expression du CD40 sur ces cellules est contrôlée par de nombreux facteurs intervenant dès la transcription. Le niveau basal de transcription du gène dans les cellules au repos est majoritairement contrôlé par le facteur de transcription SP1 (Tone *et al.*, 2002). Dans les macrophages et cellules de la microglie, les facteurs de transcription NF- κ B et STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) augmentent l'expression de CD40 suite à la stimulation par l'IFN- γ (Nguyen et Benveniste, 2000b). L'IFN- γ est l'activateur majeur de l'expression du CD40 pour de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules de la microglie. Comme le montre la figure 4, adaptée de Lee et collaborateurs en 2007, la fixation de l'IFN- γ sur son récepteur induit 2 mécanismes aboutissant à la transcription du récepteur CD40. Le premier est la phosphorylation de STAT1 α qui active la transcription de CD40 *via* l'activation de la séquence *Gamma interferon activated sequence* présente dans le promoteur. Le second est l'activation de la transcription du TNF- α qui agit par voie autocrine pour activer NF- κ B. L'IL-4 par contre est antagoniste (Nguyen et Benveniste, 2000a). Sur les cellules dendritiques, la plupart des agonistes des TLRs induisent l'expression du CD40 *via* NF- κ B. Parmi eux, le LPS est l'activateur le plus fort, suivi par les CpG (Dowling *et al.*, 2008 ; Hua *et al.*, 2013). Le LPS joue également ce rôle dans les macrophages et cellules de la microglie (Qin *et al.*, 2005).

Des régulations post transcriptionnelles interviennent aussi : l'épissage produit plusieurs autres formes de CD40 qui exercent un effet répresseur sur l'expression du récepteur (Tone *et al.*, 2001 ; Vaitaitis *et al.*, 2010) et certaines enzymes telle l'élastase des granulocytes, produites lors d'inflammation peuvent cliver le CD40 membranaire (Nemoto *et al.*, 2002).

2 Le CD40 ligand

Le ligand du CD40 (CD40L) appartient à la famille des *Tumor necrosis factors* (TNF). Comme les autres membres de cette famille, il peut être ancré dans la membrane cellulaire ou libre. On le trouve également sous les appellations : *Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5* (TNFSF5), *TNF-related activation protein* (TRAP), *T-cell antigen* gp39, CD154, CD40LG.

2.1 Découverte

Lorsqu'en 1989, Paulie et collaborateurs commencent à décortiquer le mécanisme d'activation du CD40, ils pensent que sa molécule activatrice est un facteur de croissance fonctionnant de manière autocrine. En 1992, Armitage et collaborateurs identifient, clonent et testent une molécule de 39 kDa activant le récepteur CD40 des souris: le gp39. La même année, Hollenbaugh et collaborateurs utilisent des *primers* basés sur la séquence décrite par Armitage pour cloner le gp39 humain, puis l'expriment dans des cellules Cos-7. Ils clonent de plus une protéine de fusion gp39-CD8. Ils observent la liaison à la fois de protéines de fusion Ig-CD40 solubles sur les cellules Cos transfectées avec gp39 et de protéines de fusion gp39-CD8 sur les cellules Cos transfectées avec CD40. Ils évaluent par analyse western blot la taille du gp39 produit par les cellules Cos-7. Ils vérifient enfin la prolifération des lymphocytes B induite par le gp39 : pour eux, le gp39 soluble n'est efficace qu'utilisé en présence d'un co-stimulant tel la PMA. Seul le gp39 membranaire semble posséder un léger pouvoir mitogénique lorsqu'on n'utilise aucun co-stimulant. Ils concluent que le gp39 est un co-stimulateur de la prolifération des lymphocytes B.

2.2 Séquence du CD40L bovin

Le gène CD40L bovin est situé sur le chromosome X entre les paires de bases 20249086 et 20260907. Il est composé de 5 exons. Sa séquence définitive a été publiée en 1995 par Mertens et collaborateurs et déposée dans Genbank en 1996 sous le numéro d'accèsion Z48469. L'ARNm mature comprend 864 paires de bases et la principale séquence protéique naturelle du CD40L est composée de 261 acides aminés (Figure 5 A).

A

```

88.5% identity in 261 residues overlap; Score: 1176.0; Gap frequency: 0.0%

CD40Lh      1 MIETYNTQTSFSAATGLPISMRIEMYLTLVFLITQMGISALFAYVYLRRLDKIEDERNLH
CD40Lbv     1 MIETYSQPSRPSVATGPPVSMKIFMYLLTVFLITQMGISALFAYVYLRRLDKIEDERNLH
          *****

CD40Lh     61 EDFVFMRTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQRGDQNP
CD40Lbv    61 EDFVFMRTIQRCNKGEGSLNCEEIIRSRFEDLVHDIMQNKREVKKERNFEMHRGDQEP
          *****

CD40Lh    121 QIAAHVISEASSETTSVLQWAERGGYITMNNLVTLNKGQLTVERQGLYYIYAQVTFCSN
CD40Lbv   121 QIAAHVISEASSETTSVLQWAFRGGYITLNNLVTLNKGQLAVERQGFYYIYIYQVTFCSN
          *****

CD40Lh    181 REASSQAPFFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIIHLGGVFELQPGASVFPV
CD40Lbv   181 RETLSQAPFFIASLCLKSPGSRERILLRAANTHSSSKPCGQQSIIHLGGVFELQSGASVFPV
          **

CD40Lh    241 VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL
CD40Lbv   241 VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL
          *****
    
```

B

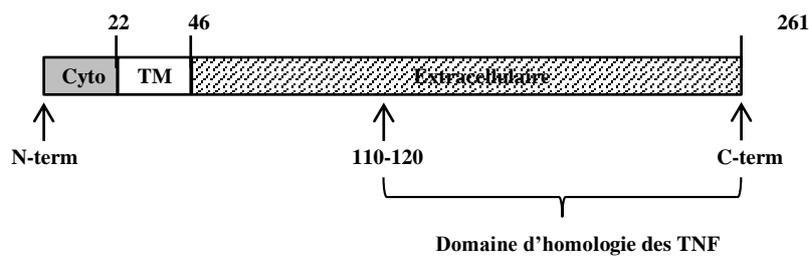
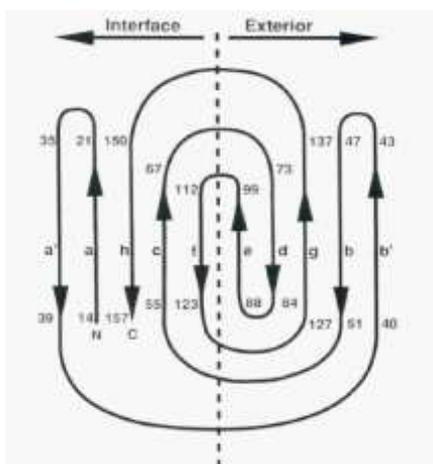


Figure 5. Structure primaire du CD40L. La figure 5 A expose la séquence d'acides aminés du CD40L bovin (CD40Lbv) comparée à la séquence du CD40L humain (CD40Lh) de la base de données Uniprot et ExPasy. La figure 5 B montre la localisation de chaque tronçon de cette séquence par rapport à la membrane plasmique. De gauche à droite, portion cytoplasmique (Cyto), transmembranaire (TM) et extracellulaire. La position du domaine d'homologie des TNFs est également représentée.

A



B

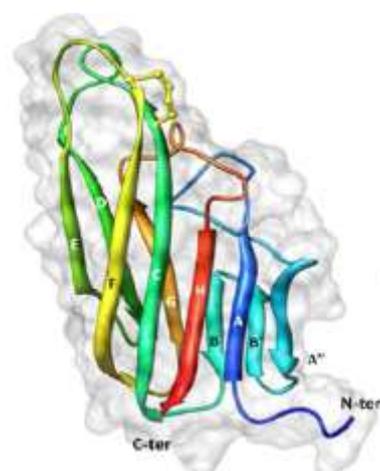


Figure 6. Structure tridimensionnelle du domaine d'homologie des TNFs (THD) du CD40L. La figure 6 A issue d'Eck et collaborateurs en 1989 représente la vue « à plat » de la structure en « gâteau roulé » du THD. De gauche à droite, le feuillet interne composé des 5 brins β a', a, h, c et f et le feuillet externe composé des 5 brins β e, d, g, b et b'. La figure 6 B, réalisée par Wieckowski en 2007 est la vue en 3 dimensions du THD du CD40L dans sa conformation naturelle, c'est-à-dire lorsque le feuillet interne est replié contre le feuillet externe. Sur cette figure, le feuillet interne est face à nous.

2.3 Structure

2.3.1 Monomère

2.3.1.1 Conformation générale du CD40L bovin

Le CD40L transmembranaire est une glycoprotéine de type II. Comme le montre la figure 5 B, il est composé de 3 régions. Les acides aminés 1 à 22 constituent la queue cytoplasmique N-terminale. La séquence se prolonge par la portion transmembranaire : une hélice alpha de 24 acides aminés. Tout le reste de la protéine, soit 215 acides aminés restants est extracellulaire. Cette partie, qui est en majorité composée du domaine d'homologie des TNFs, présente un pont disulfure entre les acides aminés 178 et 218 et un site de glycosylation sur l'asparagine en position 240 (non représentés sur la figure). Le poids moléculaire de 33 kDa généralement observé pour le CD40L montre que la glycosylation est effective (Graf *et al.*, 1995 ; Pietravalle *et al.*, 1996). En effet, le poids théorique total des 261 acides aminés présents n'est que de 29 kDa (Expasy).

2.3.1.2 Domaine d'homologie des TNFs

Le domaine d'homologie des TNFs est une structure commune à tous les TNFs permettant leur association en trimère ainsi que la liaison avec les domaines riches en cystéines communs à tous les TNFRs. Il a été pleinement détaillé dans un article d'Eck et collaborateurs dès 1989. Comme modélisé par la figure 6 A issue de cet article, il s'agit d'une séquence d'environ 150 acides aminés organisés en 10 brins β reliés par des boucles et formant une structure en « gâteau roulé ». Les 10 brins β sont étiquetés de A à l'extrémité N-terminale à H à l'extrémité C-terminale et regroupés en 2 feuillets β antiparallèles. Lors du repliement naturel montré par la figure 6 B, les 2 feuillets sont disposés presque parallèlement l'un à l'autre. Le feuillet « interne » composé des brins A, A', H, C et F est plat et intervient dans le contact entre monomères de TNF. Le feuillet « externe » composé des brins B, B', D, E et G est bombé vers l'extérieur et est impliqué dans la liaison au récepteur. Le feuillet interne est globalement très hydrophobe contrairement au feuillet externe (Eck *et al.*, 1989 ; Bodmer *et al.*, 2002).

En 1998, Bajorath vérifie par cristallographie que ce modèle tridimensionnel du domaine d'homologie des TNFs est valable pour le CD40L humain.

2.3.2 Multimères

Les données présentées ici ont été obtenues pour le CD40L humain, il est cependant probable qu'elles soient également représentatives de la molécule bovine. Le CD40L s'associe en trimères ou en plus gros complexes. Ce phénomène est fortement suspecté dès 1993 par Bajorath et collaborateurs, et confirmé par Karpussas en 1995. Cette multimérisation est commune à l'ensemble des TNFs (Eck *et al.*, 1989 ; Karpussas *et al.*, 1995; Banner *et al.*, 1993; Pietravalle *et al.*, 1996 ; Hsu *et al.*, 1997 ; Bajorath, 1998).

L'association en trimères, typique des membres de la famille des TNFs, a été bien étudiée. Les recherches ont montré qu'elle était le fait du domaine d'homologie des TNFs et basée principalement sur des interactions aromatiques ou hydrophobes (Eck *et al.*, 1989 ; Karpussas *et al.*, 1995 ; Bodmer *et al.*, 2002). Le mécanisme général de l'association est identique pour tous les TNFs, avec des particularités concernant le type d'acides aminés aromatiques ou la position exacte des structures hydrophobes. La figure 7 A montre, d'après l'étude de Karpussas et collaborateurs en 1995, les 2 acides aminés responsables d'interactions aromatiques, soit la Tyr 170 et l'His 224, impliqués dans la liaison. On y voit également le détail, d'après *Protein Data Bank* (code 1ALY), des surfaces hydrophobes du domaine d'homologie du CD40L. La figure 7 B montre que la zone de contact à l'intérieur du trimère a lieu entre le bord du premier monomère, constitué par les brins β E et F du pli reliant les feuillettes internes et externes de la structure en gâteaux roulés, et le milieu du feuillet interne du monomère suivant (Eck *et al.*, 1989; Bodmer *et al.*, 2002). Enfin, comme le montre la figure 7 C, si l'interaction entre les Tyr et His est le principal stabilisateur de l'association, la forte hydrophobicité du feuillet interne et des brins E et F contribue à son renforcement (Karpussas *et al.*, 1995 ; Bodmer *et al.*, 2002).

On remarquera que chez les autres membres des TNFs, si la trimérisation est très souvent le fait d'interactions aromatiques, les acides aminés qui en sont responsables interviennent généralement en plus grand nombre que dans le trimère de CD40L. Les tyrosines des positions 59, 119 et 153 et la phénylalanine 124 étaient ainsi décrits pour cette fonction dans le TNF-alpha (Eck *et al.*, 1989). De plus, l'histidine, qui n'est pas un acide aminé aromatique mais qui est cependant capable de créer des interactions aromatiques est rarement impliquée (Karpussas *et al.*, 1995). Il convient également de signaler que, la multimérisation n'impliquant que le domaine d'homologie, son mécanisme est identique pour les formes solubles et transmembranaires.

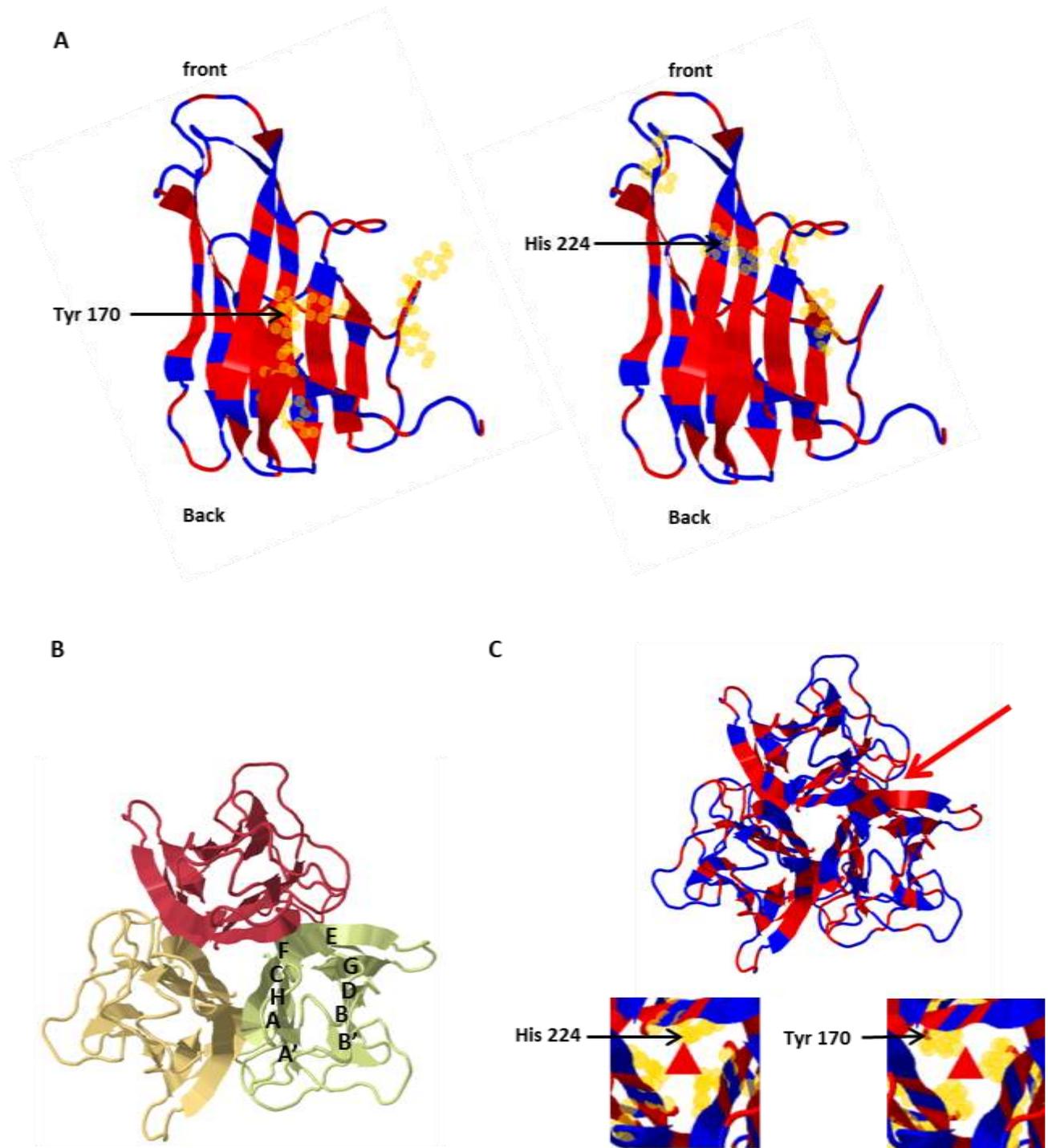


Figure 7. Interactions entre monomères de CD40L. La figure 7 A montre la vue latérale du feuillet interne du domaine d'homologie. Les structures hydrophobes sont colorées en rouge. Les points jaunes représentent les atomes des chaînes latérales des tyrosines sur la figure de gauche et des histidines sur celle de droite. Les flèches noires indiquent la Tyr 170 et l'His 224. La figure 7 B représente la vue de dessus, c'est-à-dire distale à la membrane cellulaire, du trimère de CD40L. Les lettres A' A B' B C D E F G H représentent les 10 brins β . La figure 7 C montre la position des structures hydrophobes et des Tyr 170 et His 224 dans le trimère. La flèche rouge indique la principale zone d'interaction hydrophobe entre 2 monomères de CD40L.

2.4 CD40L soluble naturel

En 1992, peu de temps après la découverte du ligand du CD40, Hollenbaugh et collaborateurs remarquent une potentielle zone de clivage à côté de la partie transmembranaire, mais il n'y a pas encore d'évidences qu'une forme soluble existe. En 1995, Graf et collaborateurs montrent que les lymphocytes T humains activés n'expriment pas seulement la forme membranaire mais sécrètent du CD40L soluble. Une protéine de 18 kDa, dont la séquence d'acides aminés débute par la méthionine 113 du CD40L et comprend la totalité du domaine d'homologie des TNFs, est ainsi isolée. Ils démontrent qu'elle est issue du clivage protéolytique du CD40L membranaire dans un compartiment intracellulaire. Ils supposent, d'après sa séquence et les informations disponibles sur les autres membres des TNFs qu'elle est capable de lier le CD40 et de l'activer. En 1996, Pietravalle et collaborateurs confirment la découverte de l'équipe de Graf, montrent que le CD40L membranaire est clivé dans les microsomes suite à la stimulation des lymphocytes T et qu'il est présent sous forme trimérisée. Ils purifient ces CD40L solubles naturels et montrent qu'ils induisent, de la même manière que les anti-CD40, la prolifération des lymphocytes B en présence d'IL-4. Une nouvelle source de CD40L soluble (sCD40L) est découverte en 1999 par Aukrust et collaborateurs. Ils stimulent en effet du plasma riche en plaquettes avec le peptide agoniste du récepteur à la thrombine. Ils observent l'augmentation significative de la concentration en sCD40L dans le surnageant suite à cette stimulation des plaquettes. Ils montrent également que la concentration en sCD40L est naturellement augmentée dans le sérum des patients atteints de syndrome coronarien aigu. Il est maintenant établi que les plaquettes activées représentent la source principale de sCD40L (Andre *et al.*, 2002a ; Danese *et al.*, 2003). Enfin, les lymphocytes B dont le CD40 a été stimulé produisent également une forme soluble de ligand capable de stimuler leur propre prolifération (Wykes *et al.*, 1998).

2.5 Expression

Le CD40L est exprimé par les lymphocytes TCD4⁺, TCD8⁺, T γ δ , NKT et B activés, par les plaquettes et les cellules NK activées, par les monocytes, cellules épithéliales, endothéliales, dendritiques et par les cellules des muscles lisses. Chez l'homme et la souris, le promoteur du CD40L est régulé par NF-AT (Schubert *et al.*, 1995) lui-même activé par l'engagement du TCR (Durand *et al.*, 1988), les ionophores du calcium et la voie de la calcineurine (Lobo *et al.*, 1999). La stimulation du TCR par des anti-CD3 induit l'augmentation de l'expression membranaire 4 h plus tard. L'IFN- γ par contre, réprime son expression sur les LTCD4⁺ dont le TCR a été stimulé (Roy *et al.*, 1993). De nombreux autres éléments régulateurs importants ont été découverts chez l'homme, tel l'élément de réponse au CD28 (Parra *et al.*, 2001) et NF- κ B (Schubert *et al.*, 2002).

INTRODUCTION

Sur les lymphocytes B, l'expression du CD40L membranaire est stimulée par l'activation des IgM membranaires (Wykes *et al.*, 1998).

Remarques :

En plus du CD40 ligand membranaire et de la forme soluble débutant par l'acide aminé 113 précédemment présentés, une forme membranaire dépourvue de l'extrémité cytoplasmique a été décrite (Hsu *et al.*, 1997). Si, comme nous l'avons vu, la forme soluble est due à la protéolyse (Graf *et al.*, 1995 ; Pietravalle *et al.*, 1996), la présence d'un autre site d'initiation de la traduction au niveau de la paire de base 61 (Met 21) pourrait expliquer les formes transmembranaires dépourvues d'extrémité cytoplasmique décrites par Hsu et collaborateurs en 1997. Nous remarquerons qu'une forme plus courte débutant par l'acide aminé 149 a également été décrite dans les surnageants de lymphocytes T ainsi que lors de la production du CD40L en *E. coli* (Mazzei *et al.*, 1995 ; Pietravalle *et al.*, 1996). Cependant, cette forme reste anecdotique dans la mesure où la production en bactéries ne constitue pas une voie naturelle et que celle issue des lymphocytes T n'a pas pu être séquencée dans cette étude.

3 La liaison CD40-CD40L

3.1 Structures impliquées

Cette partie est une synthèse des études historiques et actuelles sur la structure biochimique de l'interface CD40-CD40L. Elle concerne uniquement les molécules humaines car aucune recherche n'a encore été menée chez le bovin dans ce domaine. La grande homologie de structures entre les membres de la famille des TNFs laisse cependant penser que ces travaux réalisés chez l'homme constituent une base utilisable pour le bovin.

3.1.1 A l'échelle des trimères

Il est communément établi que la liaison CD40-CD40L met en jeu un couple de trimères. Dans ce couple, chaque monomère de CD40 interagit avec 2 monomères de CD40L. Comme le montre la figure 8 A, le trimère de CD40L est logé au centre d'un trimère de récepteurs. Le contact a lieu entre les CRD 1, 2 et 3 du monomère de CD40 et le domaine d'homologie des TNFs du trimère de CD40L, plus précisément la zone du sillon extérieur reliant 2 monomères de CD40L comme

INTRODUCTION

le montre la figure 8 B (D'après An *et al.*, 2011). Cette figure révèle que la surface de contact est en fait composée de 2 zones distinctes. La zone A, proximale par rapport à la partie transmembranaire du récepteur, est formée par les brins D, E et G et les boucles C-D, E-F, et G-H du CD40L. Elle entre en contact avec la seconde moitié de CRD2 et avec CRD3. La zone B, plus distale, a pour base les brins A', B' et E et les boucles A'-B' et D-E et interagit avec CRD1 et la première moitié de CRD2. Il faut signaler que la surface d'interaction entre CD40 et chaque monomère de ligand est inégale, l'un d'eux accaparant entièrement CRD3 et la moitié de CRD2 alors que ce qui reste est équitablement partagé. Selon An et collaborateurs, cette asymétrie est causée par un pont S-S sur CRD3 qui rend l'interaction inégale entre les 2 sous unités de CD40L.

Nous remarquerons enfin que l'étude d'An et collaborateurs, la seule qui soit basée entièrement sur une étude cristallographique de la liaison CD40-CD40L, n'a observé que 2 CD40 liés au trimère de CD40L (figure 8 C). Les auteurs ont d'abord vérifié que ce ratio anormal n'était pas un artefact de cristallisation puis ont évoqué d'éventuelles répulsions électrostatiques que les 2 premiers monomères de CD40 fixés exerceraient sur le 3^e. Il se pourrait que la dimérisation du CD40 soit, au même titre que la structure pentamérique du *Fas dead domain*, une exception dans la famille des TNFRs, ou qu'elle soit la conséquence du biais expérimental inhérent à l'utilisation d'une forme tronquée soluble de récepteur.

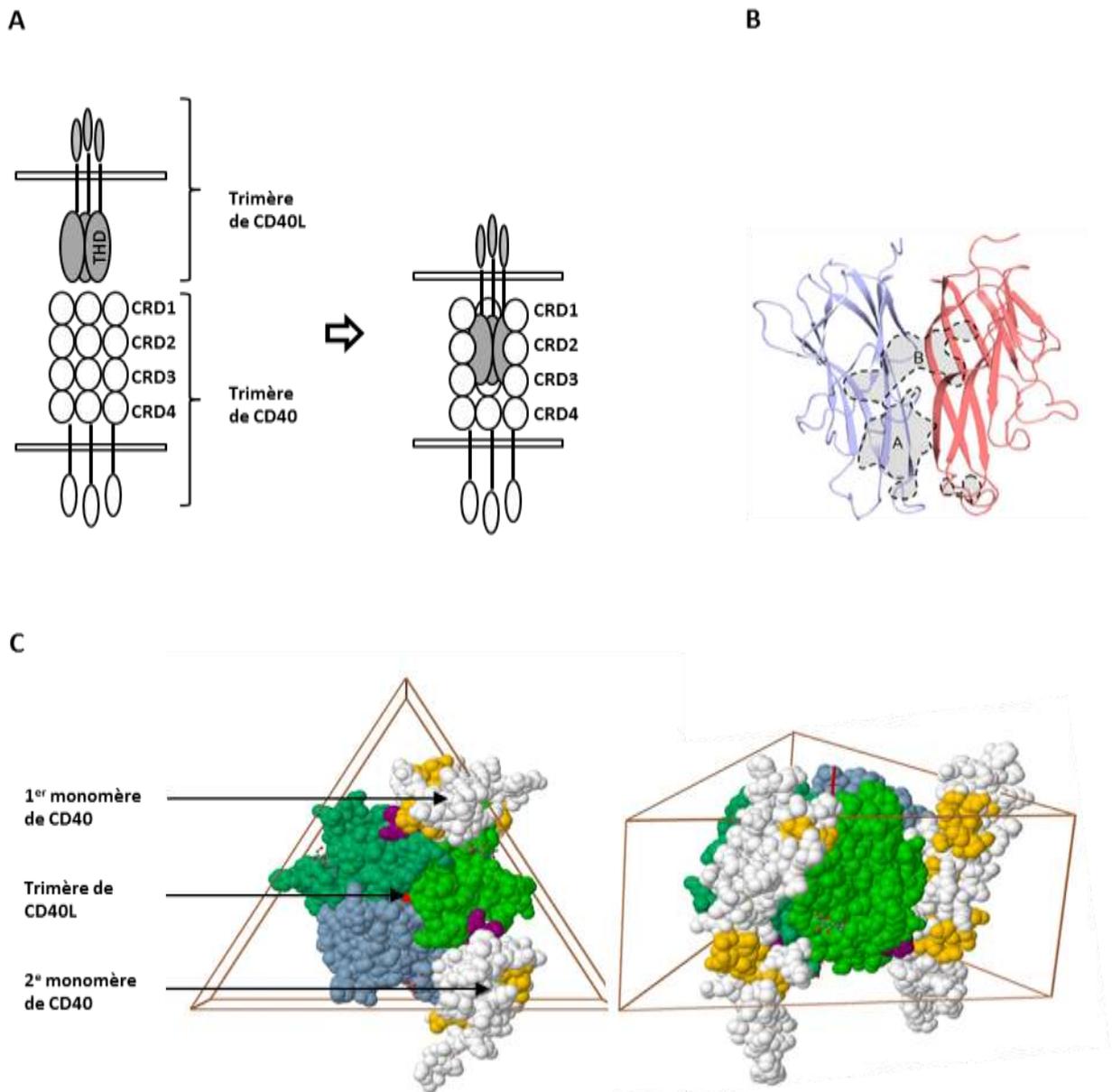


Figure 8. Liaison CD40-CD40L à l'échelle des trimères. La figure 8 A montre à gauche le CD40 trimérique transmembranaire avec ses 4 domaines riches en cystéines (CDRD 1 à 4) et le CD40L trimérisé via le domaine d'homologie des TNFs (THD). A droite, les 2 trimères sont assemblés. La figure 8 B schématise la position, sur les monomères de CD40L, des zones de contact A et B entre un monomère de CD40 et 2 monomères de CD40L. La figure 8 C, issue de *Protein data bank* (code 3QD6) montre l'image obtenue par cristallographie du couple CD40L-CD40. Les CD40L sont en vert et bleu et les CD40 sont en blanc et orange. A gauche, vue de la face cellulaire du THD du trimère de CD40L. A droite, vue latérale du couple CD40-CD40L.

3.1.2 Au niveau des acides aminés

Si l'étude physique réelle du couple CD40-CD40L n'a été réalisée avec succès qu'en 2011 par An et collaborateurs, sa modélisation a cependant débuté dans les années 1990 (annexe n°3).

3.1.2.1 Ensemble des résidus impliqués dans liaison CD40-CD40L

Les résidus du CD40 impliqués dans la liaison sont les acides aminés K46, E64, S65, R73, T75, H76, C77, Q79, Y82, D84, P85, N86, L87, W109, T112, E117, V120, L121 (Figure 9 B d'après An *et al.*, 2011). Les acides aminés du CD40L impliqués sont E129, A130, K143, G144, Y145, Y146, C178, P217, C218, Q220, S245, Q247, S248, G250, T251, G252, F253 pour le premier monomère et I190, G199, R200, R203 et Q232 pour le second (figure 9 A d'après An *et al.*, 2011).

3.1.2.2 Résidus dont la mutation perturbe la liaison

Pour observer l'effet des mutations présentes chez les patients atteints du syndrome d'hyper IgM lié à l'X sur la fonctionnalité, c'est-à-dire la capacité de liaison, du site de liaison du ligand ou du récepteur, les chercheurs ont utilisé 2 méthodes. La première est la modélisation de la mutation pour comprendre à quel endroit elle perturbe la structure protéique, ce qui permet également de comprendre quelles sont les zones importantes, notamment pour la liaison récepteur-ligand. La seconde est la production de protéines recombinantes mutées et le test physique de leur reconnaissance par le ligand ou le récepteur recombinant sauvage ou par un anticorps monoclonal spécifique du site actif.

Résidus du CD40

En 1995, Bajorath et collaborateurs identifient les aas Y82, D84 et N86 du site de liaison du CD40 comme indispensables à la fixation d'anti-CD40 monoclonaux. De manière similaire, mais en utilisant des CD40L recombinants à la place des anti-CD40, en 1998, Singh et collaborateurs testent l'importance des aas chargés du site de liaison du CD40. Ils montrent alors que le remplacement des résidus acides E74, D84, E114 et E117 chargés négativement par des résidus basiques ou neutres hydrophobes (Alanine) abolissent la liaison. Par contre, la substitution par un aa neutre hydrophile préserve l'interaction.

Résidus du CD40L

Résidus directement impliqués dans liaison :

La méthode utilisant les anticorps monoclonaux pour observer l'effet des mutations sur la liaison du ligand est utilisée dès 1995 par Bajorath et collaborateurs. Ils identifient, par la génération de mutations ciblées suivies de tests de liaison, 2 acides aminés du CD40 ligand indispensables à la liaison. Il s'agit respectivement des K143 et Y145. En 1998, Singh et collaborateurs montrent l'implication des acides aminés chargés et hydrophiles dans la liaison CD40-CD40L grâce à un CD40 soluble couplé à une Ig. Ils mettent en évidence une importance prépondérante des acides aminés basiques K143, R203, R207 du CD40L.

Résidus indirectement impliqués dans la liaison :

En 1996, Bajorath et collaborateurs élargissent le répertoire des mutations étudiées : ils choisissent 20 mutations naturellement retrouvées chez les patients atteints du syndrome d'hyper IgM lié à X et dont l'acide aminé touché est proche d'un des 5 acides aminés répertoriés comme impliqués dans la liaison par Bajorath et collaborateurs en 1995. Le syndrome d'hyper IgM a pour cause un ligand incapable d'activer le récepteur CD40. Ils modélisent alors chaque protéine mutée et observent les coordonnées tridimensionnelles de chaque mutation. Ils réalisent ainsi un classement en 3 groupes. Le groupe 1 comprend les mutations perturbant probablement la structure des monomères de ligand. Le groupe 2, celles dont la situation peut perturber l'association des monomères de ligand entre eux. Le groupe 3 est composé des mutations capables de gêner la liaison CD40-CD40L. Ce dernier groupe ne représente que 7 des 20 perturbations répertoriées et, parmi elles, seules 4, soit 1/5 du total sont exposées à la surface du site ce qui montre que la plupart des mutations perturbant le fonctionnement du ligand ne sont pas situées sur le site de liaison.

Résidus non impliqués dans la liaison :

En 2011, An et collaborateurs montrent que la mutation de la Sérine 132 du CD40L, un acide aminé très éloigné du site de liaison, ne diminue absolument pas l'affinité du CD40 pour le ligand ni la di ou trimérisation du récepteur mais empêche sa pleine activation. L'explication pourrait être une implication de la sérine 132 dans une éventuelle multimérisation du CD40L au-delà du trimère, la multi-multimérisation ayant de manière générale montré une efficacité accrue.

3.1.3 Interactions électroniques

En 1998, Singh et collaborateurs montrent que le couple CD40-CD40L est soumis aux mêmes interactions de charges que les couples TNFR-TNF- α ou $-\beta$. Cependant, à l'inverse de ceux-ci, les charges sont négatives sur le CD40 et positives sur le CD40L. Ils remarquent aussi que les acides aminés très chargés du site de liaison sont entourés d'acides aminés hydrophobes, ce qui augmente la force de la liaison. Comme déjà signalé, la substitution d'acides aminés chargés du site de liaison par des acides aminés hydrophobes ou de charges opposées avorte la liaison. La substitution par un aa hydrophile non chargé maintient au contraire la liaison. La stabilisation des interfaces protéiques par les interactions ioniques est en réalité un principe général bien établi (Xu *et al.*, 1997). Cette importance prépondérante des interactions ioniques et hydrophiles dans la liaison CD40-CD40L est confirmée par l'étude majeure d'An et collaborateurs en 2011. La figure 9 C donne par ailleurs un excellent aperçu des charges du site de liaison. Enfin, l'exemple biologique du syndrome d'hyper IgM achève de convaincre de l'importance des charges, et notamment des charges positives du CD40L. En effet, 2 des 4 mutations du site de liaison impliquées dans la maladie touchent l'arginine et la lysine qui sont les plus basiques des 3 acides aminés basiques existant.

3.1.4 Résumé

La liaison CD40-CD40L a lieu entre un trimère de CD40L et un di-ou-trimère de CD40. Un monomère de CD40 lie, par ses domaines riches en cystéine 1, 2 et 3, la zone de jonction de 2 monomères de ligand avec une surface de contact inégalement partagée. La liaison s'appuie principalement sur des interactions entre acides aminés chargés ou polaires et les acides aminés Glu 74, Tyr 82, Asp 84, Asn 86, Glu 117 du CD40 et Lys 143, Tyr 145, Tyr 146, Arg 203, Arg 207, Gln 220 du ligand répertoriés pour leur importance majeure appartiennent tous à cette catégorie. Nous ferons enfin une remarque concernant la glycosylation de l'Asn 240 du CD40L : malgré la proximité immédiate de la zone de contact, elle ne semble jamais intervenir dans la liaison (Bajorath *et al.*, 1995).

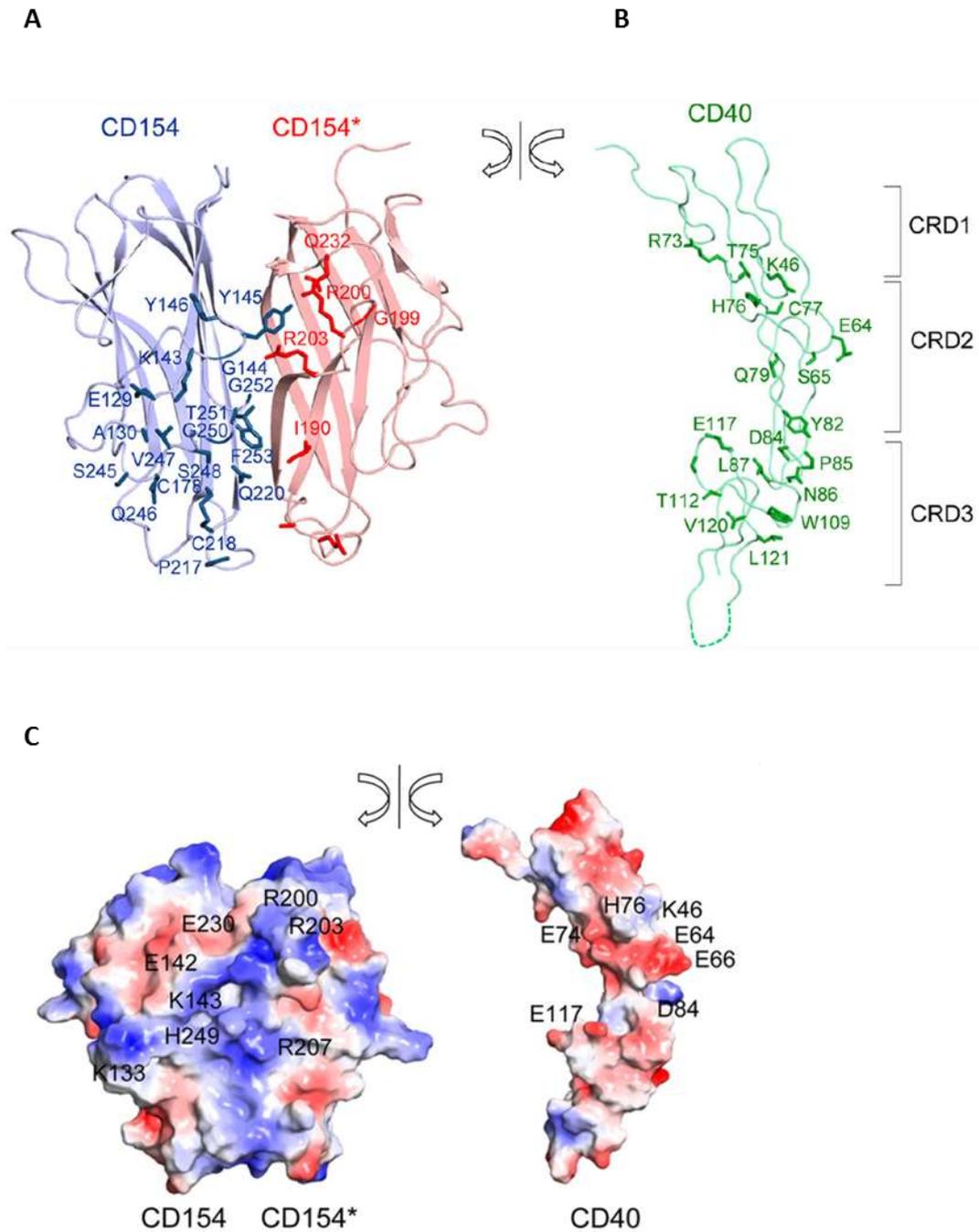


Figure 9. Détail des résidus impliqués dans la liaison CD40-CD40L (d'après An *et al.*, 2011). La figure 9 A montre les 17 aas du premier monomère de CD40L (en bleu) et les 5 aas du second (en rouge) impliqués dans la liaison avec un monomère de CD40. La figure 9 B montre les résidus du CD40 impliqués dans cette liaison. La figure 9 C expose les résidus chargés négativement, en rouge, et positivement, en bleu, au niveau et autour des surfaces de liaison. A gauche, la surface des 2 monomères de CD40L et à droite celle d'un monomère de CD40.

3.2 Transduction du signal

Peu de temps après sa découverte, l'aspect fonctionnel du CD40 fait l'objet de nombreuses recherches (voir annexe n°4 pour un aperçu historique). La cascade de signalisation induite par l'activation de CD40 est vaste, complexe et incomplètement comprise. Une vision simplifiée mais fidèle à la plupart des études réalisées est proposée dans la revue d'Elgueta et collaborateurs de 2009. La figure 10 tirée de cette revue en fournit un résumé, en évoquant quelques caractères distinctifs de chaque voie.

La queue cytoplasmique du CD40 est dépourvue d'activité kinase (Ren *et al.*, 1994), le récepteur doit donc s'associer avec d'autres protéines cytoplasmiques pour initier la cascade de signalisation. En se basant sur le type de protéine associée, nous distinguons actuellement 2 types de voies : les voies dépendantes des *TNF receptor associated factor* (TRAFs) et la voie de la Janus kinase 3 (JAK3). Leur détail se trouve dans l'annexe n° 5.

INTRODUCTION

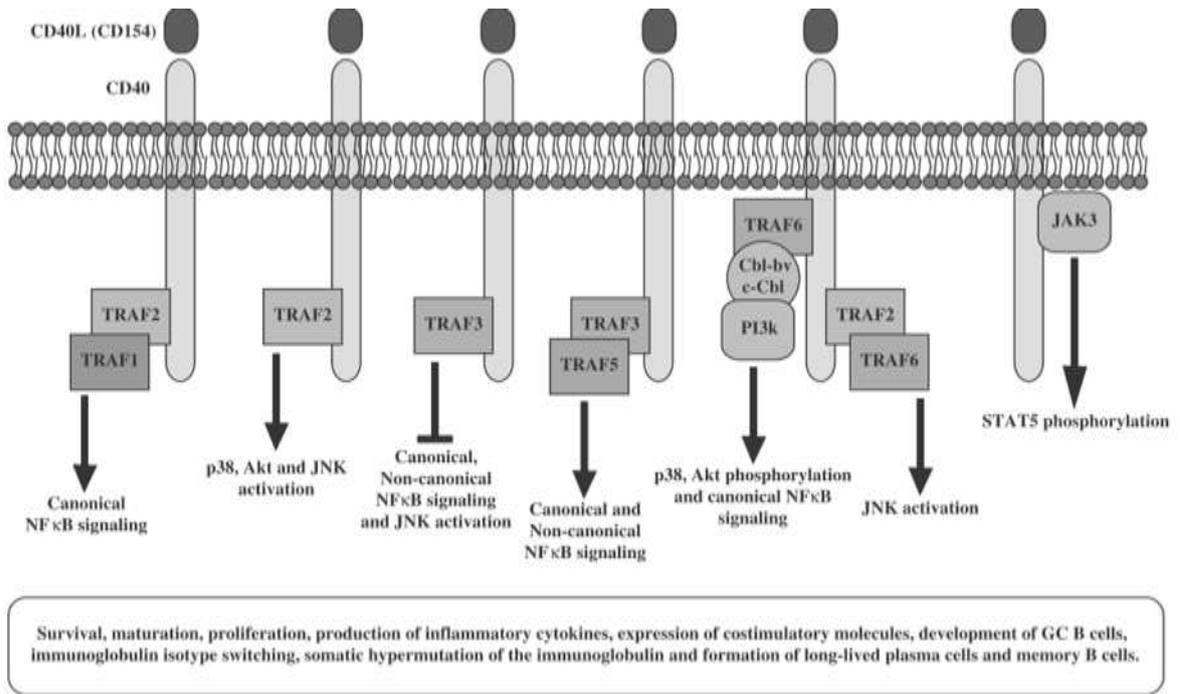


Figure 10. Résumé des voies de signalisation du CD40 sur les lymphocytes B (D'après Elgueta *et al.*, 2009). De gauche à droite, revue des différents TRAFs impliqués et principales voies activées par chacun d'entre eux suite à l'interaction avec CD40. A l'extrémité droite, la voie indépendante des TRAFs via la Janus kinase 3.

3.3 Rôle immunitaire

Les protéines exprimées après l'engagement du CD40 trahissent déjà son implication dans la réponse immunitaire. On retrouve en effet les cytokines (IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IFN- γ , TNF- β et - α) ainsi que de nombreuses molécules membranaires impliquées dans les signaux de co-stimulation (CD80, CD86, et MHCII) et d'adhésion (CD23, CD30, CD54, Fas, ICAM, et LFA-1) (Graham *et al.*, 2010).

3.3.1 Modulation de l'immunité humorale

Le CD40 des lymphocytes B interagit avec le CD40L des lymphocytes T, il est donc normal qu'il ne soit impliqué que dans l'immunité humorale T-dépendante. Nous remarquerons cependant, que, jusqu'à la découverte du CD40L, la stimulation du CD40 sera logiquement considérée T-indépendante. Le rôle du CD40 dans le développement de la réponse humorale a été compris au début des années 1990 comme nous pouvons le voir dans l'annexe n°6.

Dans un organe lymphoïde secondaire, les lymphocytes sont regroupés par chimiotaxie dans des zones B, les follicules, et dans des zones T plus vastes. Cela dépend majoritairement des récepteurs membranaires CXCR5 sensibles aux chimiokines des zones B et CCR7 sensibles aux chimiokines des zones T. La figure 11 montre les étapes de la maturation des lymphocytes B dans un organe lymphoïde secondaire, depuis l'arrivée d'un antigène étranger jusqu'à la formation de plasmocytes. Nous traiterons ici le cas d'un nœud lymphatique mais le procédé est semblable dans les follicules lymphoïdes de la rate (Cerutti *et al.*, 2012).

Activation des lymphocytes B et T :

Lorsque, comme le montre la figure 11 A, un antigène arrive dans le follicule primaire, il peut être reconnu et fixé par un lymphocyte B naïf puis phagocyté grâce au BCR. Cela peut également se produire par interaction avec une cellule dendritique présentant l'antigène (Wykes *et al.*, 1998). Le lymphocyte B augmente alors l'expression du récepteur CCR7 et présente des fragments d'antigènes sur son MHC II. Il migre jusqu'en périphérie du follicule. Parallèlement, dans la zone T du nœud lymphatique (hors des follicules primaires), un lymphocyte TCD4⁺ auxiliaire naïf peut reconnaître, par son TCR, le couple CMH II –antigène que lui présente une cellule dendritique (11 A 1). Il reconnaît aussi par son CD28, le CD86 (ou B7) de la cellule dendritique ce qui lui fournit le signal de co-stimulation. Il s'active alors, exprime le CD40L et produit des cytokines (11 A 2).

INTRODUCTION

L'expression du CD40L suivant l'instruction par la DC est un phénomène rapide et transitoire, visible après 2 à 4 h avec pic en 6 -8 h puis diminution entre 24 et 96 h (Roy *et al.*, 1993). Le lymphocyte T auxiliaire ainsi activé devient alors sensible à un gradient chimiokinique qui le fait migrer vers la périphérie du follicule primaire. Lorsque ce lymphocyte rencontre un lymphocyte B ayant phagocyté le même antigène, il interagit avec lui (11 A 3). Il co-stimule et active alors le lymphocyte B *via* son CD40L et les cytokines qu'il produit. Mais cette liaison stimule également le LTCD4⁺ et c'est l'engagement CD40-CD40L qui fournit le signal crucial. Le LT évolue alors (11 A 4) vers le phénotype T helper folliculaire (Tfh) et migre vers le centre du follicule grâce à l'expression de CXCR5 (Fazilleau *et al.*, 2009).

Mise en place du centre germinatif :

Le lymphocyte B activé prolifère rapidement et peut évoluer selon 3 voies (Figure 11 B). La première (11 B 5A) est la différenciation en plasmoblaste, c'est-à-dire un lymphocyte B sécréteur d'Ig de la lignée germinale, avec une basse affinité. Il migre alors rapidement en dehors du follicule. La seconde (11 B 5B) est l'acquisition d'un phénotype B mémoire 'early' et l'entrée dans la circulation (Blink *et al.*, 2005). La dernière (11 B 5C) est la migration au centre du follicule suivie d'une prolifération rapide pour former le *germinal center* (GC). Ce GC est également composé des LTfh et des cellules dendritiques folliculaires (FDCs). Les premiers signes de formation du GC apparaissent au 2-3e jour suivant l'immunisation (McLennan 1994 ; Garside *et al.*, 1998). Ces cellules B du GC (LBGC) en prolifération sont appelées centroblastes. Elles expriment l'enzyme *Activation-induced cytidine deaminase* (AID) ce qui induit la commutation isotypique et l'hypermutation somatique (SHM).

Commutation isotypique :

La commutation isotypique est dépendante de l'AID (Muramatsu *et al.*, 2000) qui est normalement exprimée chez les lymphocytes B activés (Chaudhuri *et al.*, 2003 Basu *et al.*, 2009). Elle commence dans la zone sombre du GC en même temps que la SHM, là où l'AID est activée, mais peut également être déclenchée par l'interaction avec le LTfh dans la zone claire (Keim *et al.*, 2013). La transcription de l'AID est directement activée par la stimulation du CD40, des TLRs ou du BCR des lymphocytes B (Keim *et al.*, 2013). CD40 est ainsi un activateur de la commutation isotypique pour la plupart des classes d'anticorps. Il fonctionne généralement en synergie avec la plupart des cytokines (Moens *et al.*, 2014). La stimulation de CD40 nécessaire à la commutation n'influence pas la classe de l'isotype produit. En revanche, les cytokines ont un fort effet sur ce choix. Ainsi, l'IL-4 et l'IL-13 le dirigent vers la production d'IgG4 et d'IgE chez l'homme et l'IL-4 induit celle d'IgE et d'IgG1 chez la souris (Armitage *et al.*, 1993). IL-13 agirait également

INTRODUCTION

synergiquement avec IL-4 chez la souris (Lai et Mosmann, 1999). A l'inverse, l'IL-12, l'IFN- γ et α inhibent la production d'IgE induite par IL-4 (Gauchat *et al.*, 1992). Enfin, l'IL-10 induit la différenciation vers les isotypes IgG1, IgG3 et IgA chez l'homme (Brière *et al.*, 1994). Il a récemment été montré que l'IL-21 jouait un rôle majeur dans la commutation de classe lorsque combiné à CD40L (Ozaki *et al.*, 2004 ; Bryant *et al.*, 2007).

Hypermutation somatique :

La SHM a plus précisément lieu dans la zone sombre du GC. Elle est suivie par une phase de sélection, pendant laquelle les centroblastes cessent de proliférer et migrent dans la zone claire pour interagir avec les FDCs et les Tfh. L'interaction avec les FDCs met en jeu la reconnaissance *via* le BCR d'antigènes présentés par la FDC. L'interaction avec le LTfh met en jeu la reconnaissance de l'antigène et du TCR ainsi que diverses co stimulations dont celle fournie par le CD40L. Les LBGCs sont alors sélectionnés à la fois sur base de leur affinité pour l'antigène présenté par la FDC et sur leur capacité à interagir avec le LTfh (Allen *et al.*, 2007).

Différenciation en plasmocytes :

A la fin de la phase de sélection, les LBGCs qui n'ont pas interagi assez fortement et n'ont pas reçu un signal assez important du LTfh restent dans le centre germinatif et subissent un nouveau cycle de prolifération et d'hypermuation (Victoria *et al.*, 2012). Cependant, comme le montre la figure 11 B, il y a 2 autres voies que les LBGCs peuvent emprunter après cette sélection : ils peuvent se différencier en plasmocytes à longue durée de vie (11 B 6A) ou en cellules B mémoires (11 B 6B) (Nut *et al.*, 2011 ; Victoria *et al.*, 2012 ; Ding *et al.*, 2013). Le signal permettant la différenciation en lymphocytes B mémoires n'est pas connu et est difficilement différenciable du signal induisant un nouveau cycle dans le GC (Victoria *et al.*, 2012). Par contre, l'évènement majeur permettant la différenciation en plasmocytes des LBGCs est bien caractérisé : c'est la stimulation du récepteur CD40 induite par le CD40L du LTfh et ce signal est indispensable. En effet, le CD40L agit synergiquement avec IL-21 pour réprimer le facteur de transcription BCL-6 et permettre la différenciation des lymphocytes B du GC en plasmocytes (Pene *et al.*, 2004 ; Karnel *et al.*, 2012 ; Ding *et al.*, 2013 ; Moens *et al.*, 2014). Le mécanisme est aujourd'hui partiellement compris. Tout d'abord, il a été montré que BCL-6 est indispensable à la formation des centres germinatifs (Fukuda *et al.*, 1997). Il réprime en effet les gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN qui empêcheraient l'hypermuation somatique, puisqu'elle fonctionne *via* l'AID. Il favorise également une rapide prolifération cellulaire. Cependant, s'il est indispensable à la formation et au fonctionnement du GC, il oblige également le LBGC à rester dans le cycle prolifération-hypermuation. BCL-6 réprime en effet plusieurs facteurs de

transcription dont IRF4 et la *B-lymphocyte-induced maturation protein* (BLIMP-1) nécessaires à la différenciation en plasmocytes (Tunyaplin *et al.*, 2004). Le signal induit par l'activation de CD40 stimule l'expression du facteur de transcription IRF4. Or, IRF4 diminue l'expression de BCL-6 (Aldinucci *et al.*, 2010) et l'expression de BLIMP-1 augmente. La différenciation en plasmocytes est alors possible. Les premiers plasmocytes producteurs d'anticorps de grande affinité issus de l'hypermutation somatique quittent le follicule et migrent dans le sang dès le 9^e jour suivant l'immunisation (Elgueta *et al.*, 2009). Par la suite, ce processus continu produira des plasmocytes d'affinité de plus en plus grande (Tarlinton *et al.*, 2000).

Remarques

Le schéma précédemment décrit ne tient compte que des interactions DC, LTh et lymphocyte B. Il a récemment été montré que les CD40L exprimés par les lymphocytes NKT jouaient également un rôle dans l'activation des lymphocytes B (Cerutti *et al.*, 2012). Ils sont capables d'induire la commutation de classe vers les IgG et la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B en l'absence de Thelper lorsqu'on utilise un antigène restreint au CD1d (Galli *et al.*, 2007). Ils peuvent également activer les lymphocytes B *via* la stimulation des LTh (Shah *et al.*, 2011). Cette stimulation des LTh se fait très probablement *via* l'activation des DCs par les NKT.

En ce qui concerne l'importance de CD40 dans la transformation en plasmocytes, il a été remarqué que sa stimulation excessive par les lymphocytes T trop nombreux ou par des anti-CD40 agonistes peut induire la différenciation immédiate en plasmocytes et empêcher la formation du centre germinatif et de lymphocytes B mémoires (Erickson *et al.*, 2002). A l'inverse, des études ont montré que la stimulation du CD40 ne serait pas toujours indispensable pour obtenir la commutation de classe. Ainsi, l'IL -21 permettrait également cet effet (Ozaki *et al.*, 2004). De plus, l'effet du CD40L combiné à l'IL-4 peut être remplacé par le *B-cell activating factor belonging to the TNF family* (BAFF) combiné à des anti-IgM pour induire la commutation isotypique (Mackay *et al.*, 2003). La production d'IgA sans stimulation du CD40 a été confirmée par la suite *in vitro* (Castigli *et al.*, 2005) et *in vivo* avec des souris KO pour CD40 (Bergqvist *et al.*, 2006). D'autres éléments en faveur d'une commutation isotypique indépendante des LT existent. Ainsi, bien qu'utilisant la voie de l'AID et se déroulant généralement dans le GC comme l'hypermutation somatique, la commutation peut se produire avant la formation de celui-ci. Elle a en effet été caractérisée 2 jours après la stimulation antigénique et avec un pic au bout de 3 jours (Pape *et al.*, 2003).

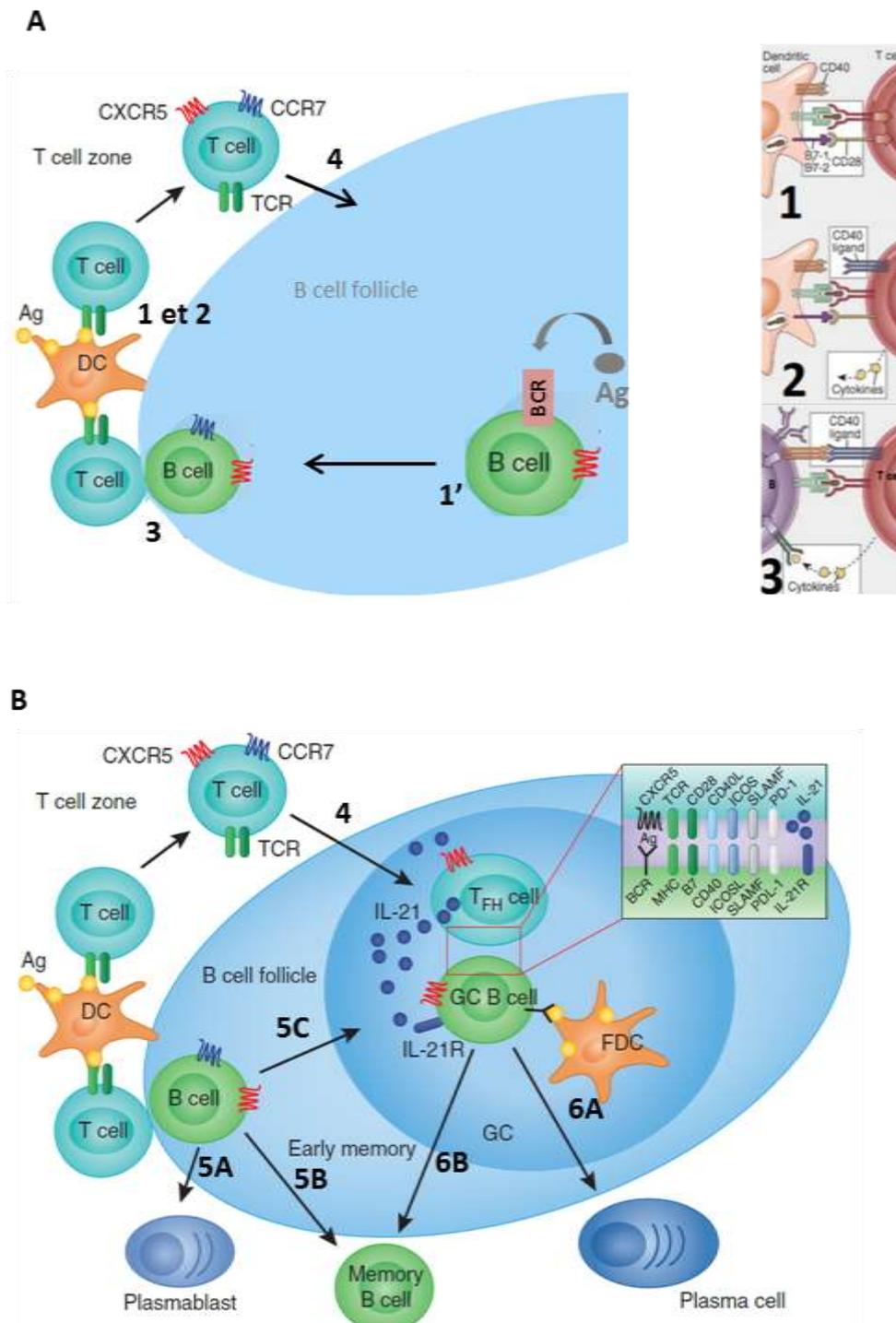


Figure 11. Maturation des lymphocytes B dans le ganglion lymphatique. La Figure 11 A, adaptée de Nutt et collaborateurs en 2011 (à gauche) et de *Cellular and molecular immunology* 6th (à droite), montre les premières étapes de l'activation des lymphocytes B et LTh. (1') Reconnaissance de l'antigène par le LB naïf et migration vers la zone T en périphérie du follicule primaire. (1) et (2) Activation d'un LTh par une cellule dendritique. (3) Interaction MHC II- TCR et CD40-CD40L entre le lymphocyte B ayant reconnu l'antigène et le LT activé spécifique de cet antigène. (4) Migration du LTh dans le follicule et différenciation en LT_{fh}. La figure 11 B de Nutt et collaborateurs en 2011, montre le mécanisme de production des plasmocytes sécréteurs depuis la formation du centre germinatif (GC). A gauche, le lymphocyte activé par le LTh peut devenir un plasmoblaste (5A), un B mémoire précoce (5B) ou un GC B cell (5C). Après la maturation dans le GC supportée par les LT_{fh} et les DCs folliculaires, il devient un plasmocyte (6A) ou un B mémoire de longue durée (6B).

De plus, des signes d'expression de l'AID et des séquences transcrites issues de la commutation isotypique ont été trouvés dans les lymphocytes pré B de la moelle (Han *et al.*, 2007).

3.3.2 Régulation de l'immunité cellulaire cytotoxique

Bien que le lymphocyte T cytotoxique activé puisse induire la lyse d'une cellule cible par la simple reconnaissance d'un complexe peptide-CMH I à la surface de celle-ci, l'initiation de cette réponse repose sur un mécanisme plus complexe dont la compréhension a pris près de 30 ans (annexe n° 7).

3.3.2.1 La présentation croisée

Découverte

Lors de leur présentation sur le CMH I, les antigènes empruntent une voie distincte de ceux issus de l'endocytose (Morrison *et al.*, 1986). Cependant, des études ont montré la présence d'antigènes issus de pathogènes extracellulaires ou de cellules tumorales sur le CMH I (Bevan, 1976 ; Gooding et Edward, 1980 ; Huang *et al.*, 1994). Ce phénomène a été nommé présentation croisée et aurait pour rôle de présenter sur le CMH I les antigènes de virus n'infectant pas les APCs professionnels et contre lesquels une réponse CTL est utile (Bevan, 1976 et 1989). Un signal supplémentaire est requis pour induire la présentation sur le CMH I des APCs. L'implication des LTCD4⁺ dans l'induction de la présentation croisée a été démontrée pour la première fois en 1997 par Bennett et collaborateurs dans l'étude d'une réponse CTL contre des cellules présentant un peptide d'ovalbumine. Sachant que la présentation croisée était nécessaire pour induire la réponse CTL, ils l'ont évaluée en mesurant cette dernière par la technique de libération du chrome 51. Lorsqu'ils réalisent l'expérience en éliminant les LTCD4⁺ des souris receveuses, ils observent la disparition de la réponse CTL. L'année suivante, ils montrent que l'injection d'anticorps anti-CD40 rétablit l'induction de cette réponse. Ils démontrent ainsi que l'aide fournie par les LTCD4⁺ dans l'induction de CTL par la présentation croisée sur la cellule présentatrice d'antigènes repose entièrement sur la stimulation du CD40. La même année, Schoenberger et collaborateurs confirment ce résultat tout en vérifiant que les lymphocytes B ne sont pas impliqués dans ce mécanisme. Ces 2 expériences éliminent l'hypothèse d'une présentation croisée supportée uniquement par les cytokines sécrétées par les LTCD4⁺ sans pour autant réussir à déterminer le type d'APC impliqué. En 2000, Den Haan et collaborateurs démontrent enfin qu'il s'agit des cellules dendritiques. Nous pouvons remarquer l'apparition à cette époque, de théories marginales

telles l'activation directe du CD40 des LTCD8⁺ par le CD40 ligand du LTCD4⁺ (Bourgeois *et al.*, 2002).

Mécanisme

Comme le montre la figure 12, les LTCD4⁺ activés instruisent les DCs pour la présentation croisée *via* la stimulation de leur CD40. Elles augmentent alors l'expression des molécules de co-stimulation CD70, CD80 et CD86 tout en diminuant celle des molécules inhibitrices tel le *programmed cell death-ligand 1*(PDL1). Cette activation dirige les antigènes phagocytés sur la voie de présentation par le CMH I, à l'intention du LTCD8⁺. La stimulation des TLRs par les *PAMPs* augmente l'intensité de la présentation croisée (Hamilton *et al.*, 2001). La sécrétion d'IL-2 par le LTCD4⁺ stimule également le LTCD8⁺. Trois voies menant à la présentation des antigènes phagocytés sur le CMH I ont été caractérisées (Figure 13). Les 2 premières sont qualifiées de cytoplasmiques car l'antigène doit être dégradé par le protéasome. Le peptide issu de cette dégradation retourne *via* le *transporter associated with antigen processing* (TAP) dans le phagosome ou le réticulum endoplasmique (ER) puis est associé au CMH I. La dernière est dite vacuolaire car l'antigène est dégradé directement par protéolyse dans le phagosome. Nous remarquerons que le mécanisme exact de ces différentes voies est encore incomplètement compris. Des endosomes contenant à la fois des peptides endogènes et des protéines issues de pathogènes constituent une origine possible du phénomène (Vyas *et al.*, 2008). Il en va de même des voies de signalisation reliant l'engagement de CD40 à ce mécanisme. En 2002, Mintern et collaborateurs concluaient que l'activation de Rel (membre de NF-κB) dans la DC induisait la production d'un signal à l'intention du Thelper pour qu'il surexprime le CD40L afin de pouvoir stimuler la DC. Une étude récente moins ambiguë, concernant le lien CD40-présentation croisée, montre que la voie empruntée serait dépendante de NIK (Katakam *et al.*, 2014). Le recrutement des LTCD8⁺ se fait *via* les chimiokines produites par la DC suite à la liaison du T helper et à la stimulation des TLRs. Suite à la stimulation du CD40, la DC sécrète également d'autres cytokines, telles l'IL-12, IL-8, MIP-1α et MIP-1β (Caux *et al.*, 1994 ; Cella *et al.*, 1996). Nous rappellerons ici que l'IL-12 augmente la fonction cytotoxique des CTLs et des cellules NK. Le LTCD4⁺ peut également fournir des signaux supplémentaires d'activation, telle l'IL-2, directement au LTCD8⁺. Après l'interaction avec la DC, les CTLs cessent la production du *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). A l'inverse, les LTCD8⁺ non stimulés par la DC meurent lors de la rencontre avec l'antigène (Kurts *et al.*, 2010 ; Kurts, 2010). Suite à l'interaction avec la DC, les LTCD8⁺ acquièrent un phénotype cytotoxique ou mémoire.

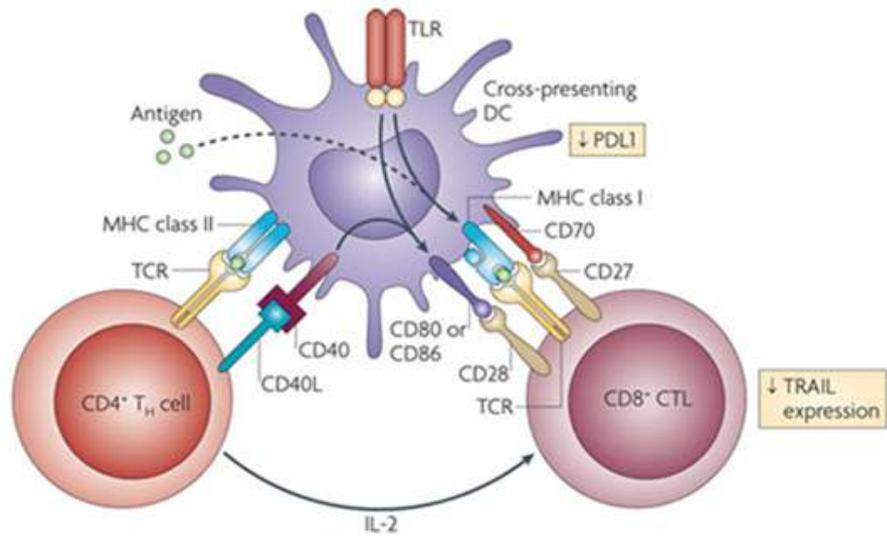


Figure 12. La présentation croisée sur les DCs (d’après Kurts *et al.*, 2010). A gauche, la stimulation du CD40 de la DC par le CD40L du LTCD4⁺. Cela permet l’activation du LTCD8⁺, à droite.

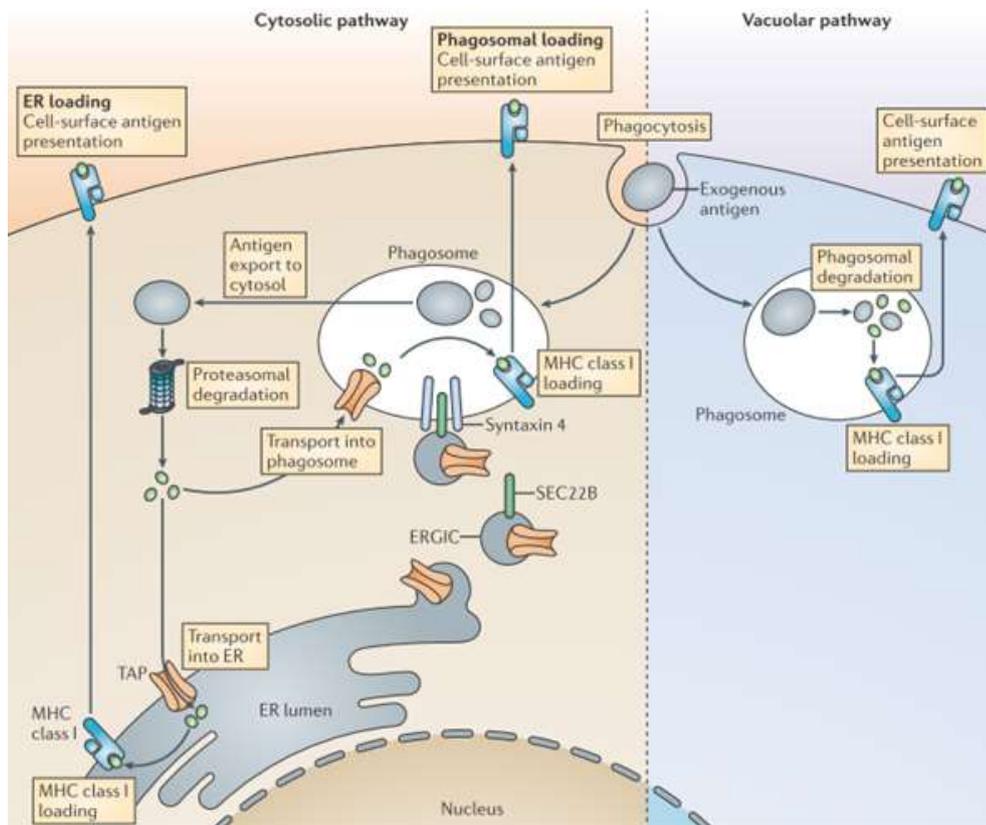


Figure 13. Voies intracellulaires de la présentation croisée dans les cellules dendritiques (d’après Joffre *et al.*, 2012). A gauche, la voie cytoplasmique. A droite, la voie vacuolaire.

Remarques

Il existe 2 populations de cellules dendritiques : les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les premières, cellules dendritiques "classiques", dérivent de précurseurs de la moelle osseuse et sont les plus nombreuses. Les précurseurs des secondes sont dans le sang. Si toutes les cellules dendritiques sont capables de réaliser la présentation croisée, une population présente chez la souris est particulièrement spécialisée dans cette fonction : la cellule dendritique myéloïde exprimant le CD8. Ces dernières ont un rôle crucial dans l'induction de la réponse CTL (Hildner *et al.*, 2008). Des cellules aux fonctions identiques mais dépourvues du marqueur CD8 sont retrouvées chez l'homme (Villadangos et Shortman, 2010).

Nous signalerons que l'activation des CTLs par la présentation croisée n'est pas l'apanage des DCs : les cellules endothéliales hépatiques et pancréatiques sont également capables de recruter des lymphocytes TCD8⁺ spécifiques d'antigènes microbiens issus des tissus périvasculaires infectés (Limmer *et al.*, 2000 ; Savinov *et al.*, 2003 ; Von oppen *et al.*, 2009).

Nous remarquerons également qu'un autre mode de présentation d'antigènes exogènes sur les DCs existe : le *cross-dressing*. Il a été proposé en 2005 par Yewdell et Haeryfar et consiste en la présentation au LTCD8⁺ de complexes antigènes-CMH I issus de cellules mortes ou de leurs membranes exprimant ce complexe. Ce mécanisme est démontré en 2006 par Dolan et collaborateurs. Il est également répertorié pour d'autres APCs (Nakayama, 2014).

Il faut enfin préciser que les CTLs ne sont pas systématiquement activés par la présentation croisée. Ainsi, les macrophages, les neutrophiles et les mastocytes présentent communément des antigènes exogènes sur le CMH I sans induire de réponse CTL (Carbone *et al.*, 1998). De manière similaire, si les lymphocytes B peuvent réaliser la présentation croisée pour tout antigène endocyté via leurs Ig membranaires, l'activation de leurs TLRs doit également avoir lieu pour stimuler efficacement les lymphocytes T cytotoxiques (Heit *et al.*, 2004). Enfin, la présentation croisée par les cellules dendritiques peut induire à la fois l'activation et la tolérance des LTCD8⁺ (van Stipdonk *et al.*, 2001 ; Kaesh et Ahmed, 2001). Plusieurs cytokines et protéines membranaires (IL-2, IL-12, PDL1, TRAIL, CD70 et CD27) sont impliquées dans ce phénomène de régulation des CTLs mais aucun mécanisme complet ne permet encore d'expliquer comment le Thelper et la DC les utilisent (Kurts *et al.*, 2010).

3.3.2.2 La répression des Treg

La nécessité d'activer le CD40 des cellules dendritiques pour développer une réponse CTL contre des antigènes extracellulaires est incontestable. Par contre, il existe bon nombre de réponses CTL antivirales indépendantes des LTCD4⁺ et dans certains cas, comme pour influenza, la réponse est juste moins forte sans les LTCD4⁺ (Tripp *et al.*, 1995). Ce phénomène restait inexpliqué jusqu'à ce que Ballesteros et collaborateurs montrent en 2013 que ce pouvait être lié à la réponse T régulatrice. On sait en effet que l'activité suppressive des LTCD4⁺ foxp3⁺ (Treg) est normalement neutralisée au début d'une infection puis réapparaît pour résoudre l'inflammation une fois l'infection éliminée (Suvas *et al.*, 2003, McNally *et al.*, 2011). Ils mesurent alors la présence des CD40 et CD40L ainsi que leur activation sur les cellules immunitaires lors d'un modèle d'infection à influenza. Ils résument les résultats obtenus dans la réponse CTL développée contre influenza en 2 points. Premièrement, les LTCD4⁺ sont les seules cellules possédant un CD40L fonctionnel et les DCs sont les seules cellules pour qui l'activation du CD40 est requise. Deuxièmement, l'activation du CD40 est requise pour éviter la contraction prématurée de la réponse CTL plutôt que pour l'initier : en effet, la déplétion conjointe des LTCD4⁺ et des Treg restaure le niveau de réponse naturel. La stimulation du CD40 des DCs par le CD40L des LTh ne sert donc qu'à réprimer le développement des Treg, et, sans Treg, CD40L est inutile. Il est intéressant de remarquer que des études antérieures sur la relation entre CD40 et les Treg corroborent l'hypothèse de Ballestero-Tatos. En effet, l'augmentation des Treg suite au blocage du CD40L avait déjà été constatée (Waid *et al.*, 2004) et l'inhibition des Treg *via* la stimulation du CD40 des DCs avait déjà été montrée par Martin et collaborateurs en 2010(a) dans un modèle d'infection à *Leishmania donovani*. Nous remarquerons que dans ce modèle, les DCs exprimant un haut niveau de CD40 induisent les LT effecteurs mais que celles exprimant un niveau bas induisent les Treg. Un faible niveau d'expression de CD40 est tout de même nécessaire au développement des Treg (Martin *et al.*, 2010b). Enfin, dans ce modèle, les LTCD8⁺ cytotoxiques détruisent directement les Treg.

3.3.2.3 Le CD40L des LTCD8⁺

En 2002, Belz et collaborateurs montrent que la réponse CTL contre influenza n'est complète qu'en présence de CD40 sur les DCs mais peut se passer de T helper ou de CD40L iatrogène. Il est donc probable que dans ce cas, les DCs soient stimulées par d'autres cellules possédant le CD40L, tel certains LTCD8⁺ et des NKT (Hernandez, 2007; Wong *et al.*, 2008).

3.3.3 Activation des macrophages et de la réponse Th1

Les lymphocytes Th1 activent les macrophages ayant phagocyté un pathogène en stimulant leurs récepteurs CD40 et en sécrétant de l'IFN- γ . Ainsi activés, les macrophages détruisent les pathogènes internalisés en produisant des ROS, du NO et des enzymes lysosomales. Ils stimulent également l'inflammation *via* la sécrétion des cytokines IL-1, TNF et IL-12 et améliorent leur capacité à activer les lymphocytes T en augmentant l'expression à leur surface du CMH et des molécules de co-stimulation. Il a été montré que l'interaction CD40L-CD40 était nécessaire au développement de la réponse Th1 (Soong *et al.*, 1996 ; Stout *et al.*, 1996 ; Kelsall *et al.*, 1996 ; Howland *et al.*, 2000). De manière plus générale, les cellules dendritiques et les macrophages sécrètent de l'IL-12 suite à la stimulation de leur CD40 par les lymphocytes TCD4⁺ activés. L'IL-12 favorise en retour la différenciation de LTCD4⁺ en lymphocytes Th1.

3.3.4 Activation de l'endothélium et recrutement des leucocytes

Bien que d'abord considéré comme intervenant exclusivement dans les relations entre leucocytes, le couple CD40-CD40L s'est rapidement révélé important dans la communication entre de nombreux types cellulaires. L'expression constitutive de CD40 sur les cellules endothéliales est démontrée en 1995 (Hollenbaugh *et al.*, 1995 ; Yellin *et al.*, 1995). La même année, Karmman et collaborateurs montrent que la stimulation du CD40 joue un rôle prépondérant dans l'activation des cellules endothéliales. Elle induit, comme l'illustre la figure 14 A, l'expression de nombreuses molécules d'adhésion telles la *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), l'E-selectin, l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et la sécrétion des chimiokines IL-8, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) et *macrophage inflammatory protein 1 α* (MIP1 α) (Stout et Suttle, 1996 ; Thienel *et al.*, 1999 ; Wagner *et al.*, 2004). L'expression du facteur tissulaire a également été observée (Bavendiek *et al.*, 2002). L'IL-8 attire principalement les neutrophiles (Yoshimura *et al.*, 1987) alors que RANTES, MIP-1 et MCP-1 recrutent les cellules mononuclées (Carr *et al.*, 1994). Les plaquettes représentent la principale source de CD40L utilisée pour cette stimulation. Elles produisent en effet plus de 95% du CD40L circulant (André *et al.*, 2002). CD40L n'est pas détectable à la surface des plaquettes au repos, mais son expression devient maximale une minute après stimulation par la thrombine ou l'ADP (Henn *et al.*, 1998). Les plaquettes sont connues comme source de CD40L soluble depuis l'étude d'Aukrust et collaborateurs en 1999, mais le mécanisme exact de la libération du ligand, c'est-à-dire l'expression membranaire suivie d'un clivage est démontré en 2002 par André et collaborateurs (Figure 14 B). On remarquera que le CD40L peut poursuivre l'activation des différents leucocytes recrutés en stimulant directement

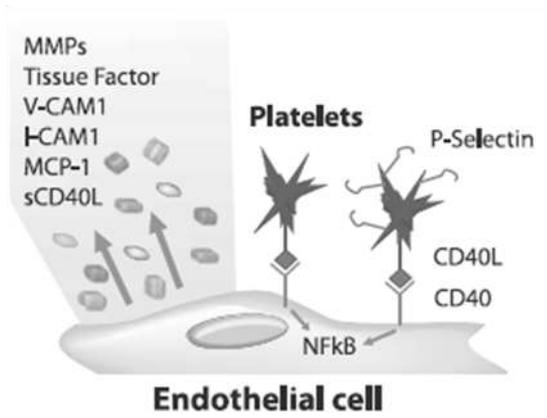
leur CD40 membranaire (Caux *et al.*, 1994 ; Lievens *et al.*, 2009). Le recrutement et l'activation des leucocytes n'est cependant pas le seul effet de la stimulation du CD40 des cellules endothéliales. Ainsi, elle active la voie PI3K/Akt qui permet la survie, prolifération, migration et l'agencement en vaisseaux des cellules endothéliales, c'est-à-dire les étapes critiques de l'angiogenèse. L'association du complexe TRAF2- TRAF6- c-Cbl- PI3k, caractéristique de cette voie a en effet été confirmée dans les extraits de cellules endothéliales stimulées avec CD40L (Deregibus *et al.*, 2003).

3.4 Réciprocité de la stimulation

3.4.1 La stimulation du ligand par CD40

La liaison CD40-CD40L est de plus en plus considérée comme bidirectionnelle, c'est-à-dire avec un effet sur la cellule portant le CD40L également. Ainsi, pour le LTCD4⁺ liant la DC, la stimulation du CD40L induit la production d'IL-2, d'IFN- γ et de cytokines Th2 telles L'Il-4, l'IL-5 et l'IL-10 (Peng *et al.*, 1996 ; Blotta *et al.*, 1996 ; Mackey *et al.*, 1998). En conséquence, aucune prolifération de LTCD4⁺ CD40L^{-/-} n'est observée après le transfert adoptif de ces LTCD4⁺ CD40L^{-/-} spécifiques d'un antigène à des souris sauvages et après la stimulation de celles-ci avec le même antigène (Grewal *et al.*, 1995). En revanche cet effet est inconnu pour les autres types cellulaires (Ma et Clarke, 2009).

A



B

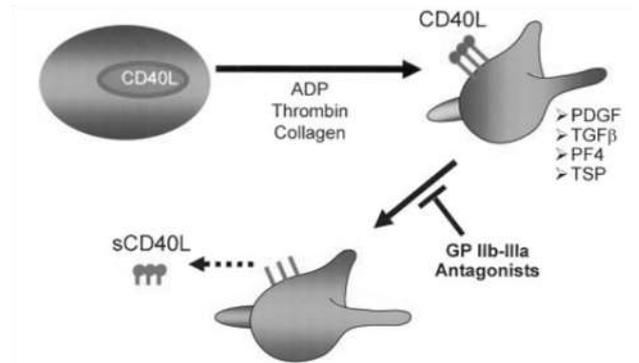


Figure 14. A (Lievens *et al.*, 2009). La stimulation du CD40 des cellules endothéliales par le CD40L des plaquettes induit la synthèse de protéines d'adhésion et de médiateurs inflammatoires. B (André *et al.*, 2002). Mécanismes de l'expression membranaire et de la sécrétion de la forme soluble du CD40L par les plaquettes.

3.4.2 Le CD40 des lymphocytes T

Dans l'année qui suivit la découverte du CD40L et de son premier rôle de stimulation des lymphocytes B, des études ont testé son effet sur d'autres cellules telles les lymphocytes T costimulés avec des anti-CD3 et ont observé qu'il induisait une forte prolifération des LTCD4⁺ comme des LTCD8⁺ (Armitage *et al.*, 1993). Ce résultat a été confirmé l'année suivante par Fanslow et collaborateurs et semble prouver la présence d'un CD40 fonctionnel sur les lymphocytes T. En 1999, Wagner et collaborateurs montrent que les lymphocytes T exprimant CD40 représentent une faible proportion de la population de T chez les souris normales mais plus de 50% de cette population chez les souches de souris sujettes aux maladies auto-immunes. En 2007, Munroe et Bishop confirment l'augmentation de l'expression du CD40 sur les lymphocytes T d'un modèle d'arthrite auto-immune et démontrent qu'il représente un signal de costimulation pour le lymphocyte T aussi important que le CD28.

3.4.2.1 Rôle de CD40 sur les LTCD4⁺

Dès 1999, Wagner et collaborateurs montrent une proportion plus forte de LTCD4⁺CD40⁺ dans les souches de souris sujettes aux maladies auto-immunes. En 2002, cette équipe montre que les clones LTCD4⁺CD40⁺ sont plus nombreux chez les souris *non-obese diabetic* (NOD) sujettes au diabète de type I et que le transfert adoptif de ces cellules induit le diabète contrairement au transfert des LTCD4⁺CD40⁻. L'année suivante, Vaitaitis et collaborateurs montrent que l'activation du CD40 des LTCD4⁺ périphériques induit l'expression des *recombination-activating gene* (RAG) 1 et 2 qui activent la recombinaison du TCR, ce qui peut induire un phénotype auto agressif chez les souris NOD. De plus, le blocage du CD40L, déjà connu pour stopper le diabète chez les souris NOD (Balasa *et al.*, 1997) stoppe l'expansion de la population de LTCD4⁺CD40⁺ tout en augmentant la population de Treg (Waid *et al.*, 2004). Cet effet bloquant sur les cellules effectrices diabétogènes LTCD4⁺ CD40⁺ et stimulant sur les Treg laisse penser que les LTCD4⁺CD40⁺ résisteraient, *via* l'activation du CD40, à l'apoptose induite par les Treg. Cela expliquerait l'expansion rapide des LTCD4⁺CD40⁺ diabétogènes lors du développement de l'insulinitis (Munroe *et al.*, 2009).

L'implication du CD40 des lymphocytes T dans la lutte entre les Treg et LT effecteurs fait ensuite l'objet d'autres études. Dans le cadre du diabète, Vaitaitis et collaborateurs montrent en 2013 qu'une partie des LTCD4⁺CD40⁺ capables de transférer le diabète expriment FoxP3. De plus, plus la proportion de ces lymphocytes T est importante dans la population de LTCD4⁺CD40⁺, moins le diabète se développe vite. Mais plus tard, quand la maladie est déclarée, l'expression de FoxP3

est perdue sur ces cellules. Au contraire, les LTCD4⁺ FoxP3⁺ transférés depuis des souris déficientes en CD40 ne perdent jamais FoxP3 et n'induisent pas le diabète.

3.4.2.2 Rôle du CD40 sur les LTCD8⁺

Le CD40 des LTCD8⁺ a intéressé les scientifiques lorsque Bourgeois et collaborateurs en 2002 puis Tanchot et collaborateurs l'année suivante semblent démontrer la nécessité d'un contact direct entre le CD40L du LTCD4⁺ et le CD40 du LTCD8⁺. Ce contact permettrait l'activation des CTLs et la production de LTCD8⁺ mémoires avec un mécanisme commun pour le LTCD8⁺ et le lymphocyte B. Mais leur théorie semble infirmée par les études de Lee et collaborateurs en 2003 et de Sun et Bevan en 2004 qui utilisent des LTCD8⁺CD40^{-/-} et observent bien la réponse CTL et des LTCD8⁺ mémoires tant que des APC portant le CD40 sont présentes. Cependant, en 2009, Johnson et collaborateurs fournissent une nouvelle preuve de l'activation du CD40 des LTCD8⁺ tout en conciliant la théorie classique avec quelques-unes des observations de Bourgeois et Tanchot. Ils n'observent ainsi aucune réponse CTL lorsqu'ils injectent des cellules présentant l'ovalbumine (antigène Thelper-dépendant donc CD40L dépendant) à des souris dépourvues de LTCD4⁺ ou à des souris contrôles ayant reçu des anti-CD40L. Ils rétablissent néanmoins cette réponse grâce à des anti-CD40-agonistes. Ils réitèrent l'expérience avec des DCs dépourvues de CD40L, au lieu d'utiliser des anti-CD40L, et montrent l'absence d'induction de CTL, malgré l'ajout d'anti-CD40 agonistes capables de stimuler les DCs. Il faut signaler que les souris utilisées possédaient également des DCs CD40L⁺ mais sans CMH I. Cela montre que l'activation des CTL passe forcément par une stimulation du LTCD8⁺ *via* le CD40L de la cellule dendritique lors de la présentation de l'antigène Thelper-dépendant sur le CMH I. La nécessité de stimulation directe du CD40 du LTCD8⁺ par les CD40L de la DC semble même démontrée lorsqu'aucune réponse CTL ne se produit suite à l'utilisation de LTCD8⁺CD40^{-/-}. Ils prennent enfin le modèle du virus influenza, considéré comme Thelper-indépendant, dans lequel ils bloquent les CD40L avec les anti-CD40L. Ils observent alors une diminution de la réponse CTL montrant que les virus influenza seuls ne stimulent pas suffisamment les DCs pour qu'elles puissent instruire les CTLs quand tous les CD40L sont bloqués. Ils mesurent de plus l'expression du CD40L sur les DCs suite à l'infection par influenza et montrent qu'elle est augmentée: les virus Thelper-indépendants augmentent donc l'expression du CD40L des DCs et la réponse CTL est diminuée si on bloque les CD40L. Ces résultats semblent donc montrer que l'activation des CTLs passe par une stimulation du CD40 du LTCD8⁺ *via* le CD40L de la cellule dendritique lors de la présentation de l'antigène sur le CMH I.

Bien que ces différentes études révèlent des contradictions, il paraît raisonnable d'imaginer que l'interaction entre le CD40L de la DC et le CD40 du LTCD8⁺ soit surtout indispensable dans le cas d'antigènes Thelper-dépendants.

Enfin, en 2010(a) Martin et collaborateurs confirment également l'expression fonctionnelle de CD40 sur les LTCD8⁺ et son rôle dans la répression des Treg. Ils observent en effet que le CD40 sur les LTCD8⁺ est fonctionnel car sa stimulation induit l'expression de granzyme B et de perforine. Ils montrent ainsi l'induction d'une activité cytotoxique directe de ces LTCD8⁺CD40⁺ sur les Treg. De plus, le transfert adoptif de ces LTCD8⁺CD40⁺ issus de souris atteintes de leishmaniose diminue l'infection des souris receveuses.

3.5 Interaction CD40L-intégrines

CD40L peut lier et activer d'autres récepteurs. Il fixe ainsi l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, récepteur plaquettaire au fibrinogène, et stabilise les thrombi (André *et al.*, 2002b). Il active également les monocytes et macrophages *via* l'intégrine Mac-1 (Zirlik *et al.*, 2007) et *via* l'intégrine $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ (Léveillé *et al.*, 2007).

4 Thérapies ciblant la voie du CD40

4.1 Intérêts potentiels

4.1.1 Maladies aggravées par l'activation de CD40

L'intensité des réponses induites par la stimulation du CD40, combinée au large éventail de cellules exprimant ce marqueur impliquent inévitablement son activation dans une série de maladies (Schonbeck et Libby, 2001).

Athérosclérose et rejet de greffes

Dès 1997, Laman et collaborateurs suggèrent que l'activation du CD40 des cellules endothéliales, macrophages et fibroblastes par le CD40L des lymphocytes T joue un rôle dans l'athérosclérose. Il est ensuite démontré que l'interaction CD40-CD40L est le signal pro-athérogénique majeur et que le CD40L des plaquettes est de première importance (André *et al.*, 2002a). En 2007, Lutgens et collaborateurs confirment le rôle prépondérant de l'interaction CD40-CD40L sur les

lymphocytes T, macrophages, cellules endothéliales, muscles lisses vasculaires et plaquettes dans l'athérosclérose. Enfin, l'implication des neutrophiles activés par le CD40L soluble issu des plaquettes a été démontrée (Vanichakarn *et al.*, 2008). CD40 a également été impliqué dans les rejets de greffes (Parker *et al.*, 1995) et la *graft versus host disease* (GVHD) (Blazar *et al.*, 1998).

Auto-immunité

En raison du rôle majeur joué par CD40 dans les principaux types de réponses immunitaires, sa responsabilité est engagée dans plusieurs maladies auto-immunes fréquentes (Peters *et al.*, 2009). Ainsi, comme expliqué plus haut, l'implication du CD40 dans le diabète de type I est connue depuis 1997. Les thyroïdites auto-immunes sont caractérisées par une surexpression du CD40 sur les cellules épithéliales thyroïdiennes (Faure *et al.*, 1997). La thyroïdite de Graves présente également une surexpression du CD40 des lymphocytes B corrélée à une mutation du gène (Jacobson et Tomer, 2007). Ensuite, en 1999, Kybrurtz et collaborateurs rapportent que l'arthrite rhumatoïde est dépendante de la voie du CD40. En 2002, Girvin et collaborateurs montrent que la stimulation du CD40 est l'élément déterminant dans le développement de la sclérose multiple qu'ils parviennent à empêcher chez la souris avec des anti-CD40L. Enfin, l'expression du CD40L est augmentée sur les lymphocytes T et B lors de Lupus érythémateux systémique (LES) et plusieurs évidences semblent impliquer la voie du CD40 dans cette maladie (Peters *et al.*, 2009). L'implication de CD40 dans l'auto-immunité pourrait être liée à l'expression et l'activation du CD40 sur les lymphocytes T. En effet, en 1998, alors que l'on croyait RAG inactivé à la sortie du thymus, McMahan et Fink rapportent son expression sur des lymphocytes T périphériques. Or, l'activation du CD40 sur les lymphocytes T périphériques (spléniques) induit l'expression de RAG et est liée au phénotype auto-agressif (Vaitaitis *et al.*, 2003).

Cancers stimulés par l'activation du CD40

Le CD40 est impliqué dans la pathogénie de nombreux types de cancer. Son expression sur les tissus conjonctifs hématopoïétiques et non hématopoïétiques ainsi que sur les épithélia explique son implication respectivement dans les lymphomes, sarcomes et carcinomes. Il a été montré que la stimulation du CD40 des lymphomes B pouvait inhiber l'apoptose et favoriser la multiplication cellulaire, tout comme le faisait celle du CD40 des cellules B normales. En fait, les grades faibles, telle la leucémie lymphoïde chronique, sont activés par CD40 alors que les grades élevés sont inhibés (Law et Grewal, 2009). Chez les patients atteints de sarcomes des tissus mous, le niveau d'expression du CD40 est corrélé positivement avec un pronostic mauvais (Ottaiano *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que la transfection de fibroblastes de rat par CD40 induisait leur transformation néoplasique (Baxendale *et al.*, 2005). De même l'effet pro angiogénique expliqué

plus haut, favorise la croissance des tumeurs solides. Enfin, l'expression mixte de CD40 et CD40L permet aux tumeurs de manipuler le système immunitaire par une action simultanée sur les lymphocytes T et les APCs (Baxendale *et al.*, 2005). La stimulation du CD40 peut donc favoriser certains cancers.

4.1.2 Maladies améliorées par l'activation de CD40

Dans d'autres maladies, la stimulation du CD40 peut cependant être bénéfique.

Comme évoqué précédemment, les grades élevés de lymphomes B sont souvent inhibés par la stimulation du CD40 (Funakoshi *et al.*, 1994 ; Baker *et al.*, 1998). La stimulation du CD40 des carcinomes induit généralement l'apoptose (Hess *et al.*, 1996 ; Young *et al.*, 1998) même si cela peut dépendre de la souche (Eliopoulos *et al.*, 2000). De plus, l'expression du CD40 sur les carcinomes est très répandue (Young *et al.*, 1998; Eliopoulos et Young, 2004).

Ensuite, de nombreuses maladies infectieuses sont caractérisées par la présence de pathogènes intracellulaires. La guérison nécessite alors l'élimination des cellules infectées et le meilleur moyen d'y parvenir est l'activation des CTLs. Comme nous l'avons vu, l'activation du CD40 des DCs facilite grandement ce phénomène et on comprend alors que l'apport exogène d'activateurs de ce récepteur puisse être bénéfique. Les essais de traitement de ces maladies infectieuses par CD40 seront détaillés à la fin de cette partie.

Enfin, nous remarquerons aussi que l'effet pro-inflammatoire du CD40 n'est pas systématique, notamment sur les cellules non immunitaires. En effet, dans les cellules tubulaires rénales proximales, la fonction anti-apoptotique du CD40 passe par l'activation d'un gène au rôle anti-inflammatoire et protecteur : *l'hème oxygénase* (HO) - 1 (Laxmanan *et al.*, 2005). En effet HO-1, qui permet la dégradation et le recyclage de l'hème, évite que l'excès d'hème libre n'active la voie des ROS délétère pour les cellules rénales (Akagi *et al.*, 2002).

4.2 **Traitement avec des inhibiteurs**

Les inhibiteurs les plus fréquemment utilisés sont les anticorps anti-CD40L ou anti-CD40 bloquant.

4.2.1 Anti-CD40L

La base de la production des anti-CD40L monoclonaux est la technique des hybridomes. Le premier anti-CD40L bloquant, le hu5c8, a été utilisé pour la première fois en 1992 par Lederman et collaborateurs. Les anti-CD40L sont bloquants et parfois déplétants en ce qui concerne les lymphocytes T. Si leur efficacité est avérée, en revanche, le seul blocage de la liaison CD40-CD40L ne semble pas expliquer tout l'effet observé. En effet, *in vitro*, le blocage de la stimulation du CD40L par hu5c8 ne semble exercer qu'une faible inhibition de la réaction mixte lymphocytaire (Kirk *et al.*, 1997) et il semble que la déplétion des lymphocytes T dépende des récepteurs Fc et de l'activation du complément (Sanchez-Fueyo *et al.*, 2002 ; Monk *et al.*, 2003). Le premier anti-CD40L testé chez l'homme est le ruplizumab, nom commercial du hu5c8, il a été utilisé chez des patients atteints de LES et a permis une forte réduction de la sécrétion d'anticorps anti ADN (Huang *et al.*, 2002). D'autres anti-CD40L ont été testés par la suite, mais, bien qu'ayant présenté une certaine efficacité sur plusieurs maladies auto-immunes, un effet secondaire important et récurrent pour ces anticorps chez l'homme a été constaté : le thromboembolisme. Les essais cliniques ont alors été stoppés en phase II (Grewal *et al.*, 2009).

4.2.2 Anti-CD40 bloquants

Des anti-CD40 bloquants monoclonaux ont été développés, notamment pour éviter les effets secondaires des anti-CD40L. L'anti-CD40 bloquant Chir-12.12 a montré une inhibition de la prolifération induite par CD40 du myélome multiple ainsi que le développement d'une cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (Tai *et al.*, 2005), mais rien n'indique qu'il soit efficace pour prévenir les maladies auto-immunes. Par contre, un autre anti-CD40, le ch5D12 a montré des résultats encourageants lors de la phase I des tests contre la maladie de Crohn (Kasran *et al.*, 2005). L'anti-CD40 SGN-40 s'est révélé efficace contre plusieurs types de lymphomes (Advani *et al.*, 2006). Enfin, les anti-CD40 Tenelixumab (Adams *et al.*, 2005) et ASKP1240 (Watanabe *et al.*, 2013) semblent prometteurs contre le rejet de greffes.

4.2.3 Autres inhibiteurs

En 2014, Zhang et collaborateurs ont inhibé le CD40 des DC intestinales de souris par l'administration de shRNA et ont induit une repression de la sécrétion d'IL-12 par ces DCs.

4.3 Traitement avec des activateurs

On utilise généralement du CD40L soluble trimérisé ou des anti-CD40 agonistes.

4.3.1 Structure et fonction des activateurs

4.3.1.1 Les anti-CD40 agonistes

Les anticorps produits peuvent être séquencés pour apporter, par clonage, des modifications spécifiques à leur utilisation. Une des modifications les plus fréquentes est le remplacement de la partie constante par un isotype différent ou une séquence humaine. Les anti-CD40 peuvent induire des effets variés qui vont de la prolifération à l'apoptose en passant par l'adhésion homotypique et la synthèse d'IgE. Il n'existe pas de corrélation directe entre leur capacité à activer ou à bloquer le CD40 et leur affinité. Il est de même difficile de corréler l'activité avec l'épitope ciblé sur le site de liaison naturel du CD40L (Grewal *et al.*, 2009). De plus, les anticorps ciblant des épitopes en dehors de ce site de liaison peuvent également avoir un effet agoniste, même si celui-ci est plus faible (Pound *et al.*, 1999). En plus de l'intervention de la partie variable dans l'affinité du site de liaison, l'extrémité opposée de l'anticorps monoclonal joue un rôle crucial. Ainsi, chez la souris, les IgG2a sont largement moins agonistes que les IgG1, et chez beaucoup d'espèces, ce genre de différence existe avec d'autres isotopes. Si ces différences sont confirmées et représentent un élément clé de l'ingénierie des anticorps agonistes, en revanche, le mécanisme exact reste incompris. Une hypothèse avancée concernant la souris est le comportement opposé de 2 types de récepteurs Fc γ . Ainsi, le Fc γ RI qui lie les IgG2a est activateur de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). La cellule, lymphocyte B ou DC, que l'anti-CD40 agoniste d'isotype IgG2a avait liée, peut donc être détruite au lieu d'être activée. Les IgG1 de souris au contraire sont liés par les FcR γ II qui n'induisent pas d'ADCC, et l'activité agoniste peut donc se dérouler sans entrave. Cependant, cette vision "simpliste" n'est peut-être pas exacte car la suppression expérimentale de l'activité cytotoxique ne rétablit pas le pouvoir agoniste de ces anti-CD40 d'isotype IgG2a. En fait, il se pourrait que les récepteurs Fc γ RI, contrairement aux Fc γ RII ne soient tout simplement pas disposés sur la membrane cellulaire de manière appropriée pour permettre le regroupement des récepteurs CD40 de la cellule à activer (Vonderheide et Glennie, 2013). Il a en effet été montré que l'intervention du récepteur Fc γ RII augmentait fortement le pouvoir agoniste des anti-CD40 (White *et al.*, 2011 ; Li et Ravetch, 2011). Chez l'homme, la liaison préférentielle d'un isotype au Fc γ RII n'est pas établie mais les études actuelles tentent de modifier la partie constante des anti-CD40 agonistes pour augmenter leur affinité envers ce récepteur Fc.

4.3.1.2 Les CD40L solubles

Les premières formes clonées

La figure 15 montre les principales variations parmi les constructions de CD40L solubles utilisés par les différentes études. Le premier CD40L soluble est cloné en 1992 par Hollenbaugh et collaborateurs (figure 15 A). Il s'agit de la partie extracellulaire du CD40L humain, fusionné à la protéine CD8 de souris et de poids total 50 kDa. Le CD8 est utilisé comme Tag. Ils vérifient qu'il est capable de lier le CD40 mais montrent qu'il n'active les lymphocytes B qu'avec une costimulation tel le phorbol myristate acétate. Ils observent la formation de dimères et de trimères. En 1995, Mazzei et collaborateurs clonent un CD40L soluble humain et deux CD40L solubles de souris. La séquence choisie pour la protéine humaine est basée sur un fragment naturellement produit par clivage lors de l'expression en *E. coli* alors que les séquences des ligands de souris sont basées sur des comparaisons avec les TNFs solubles existants (Figure 15 B).

INTRODUCTION

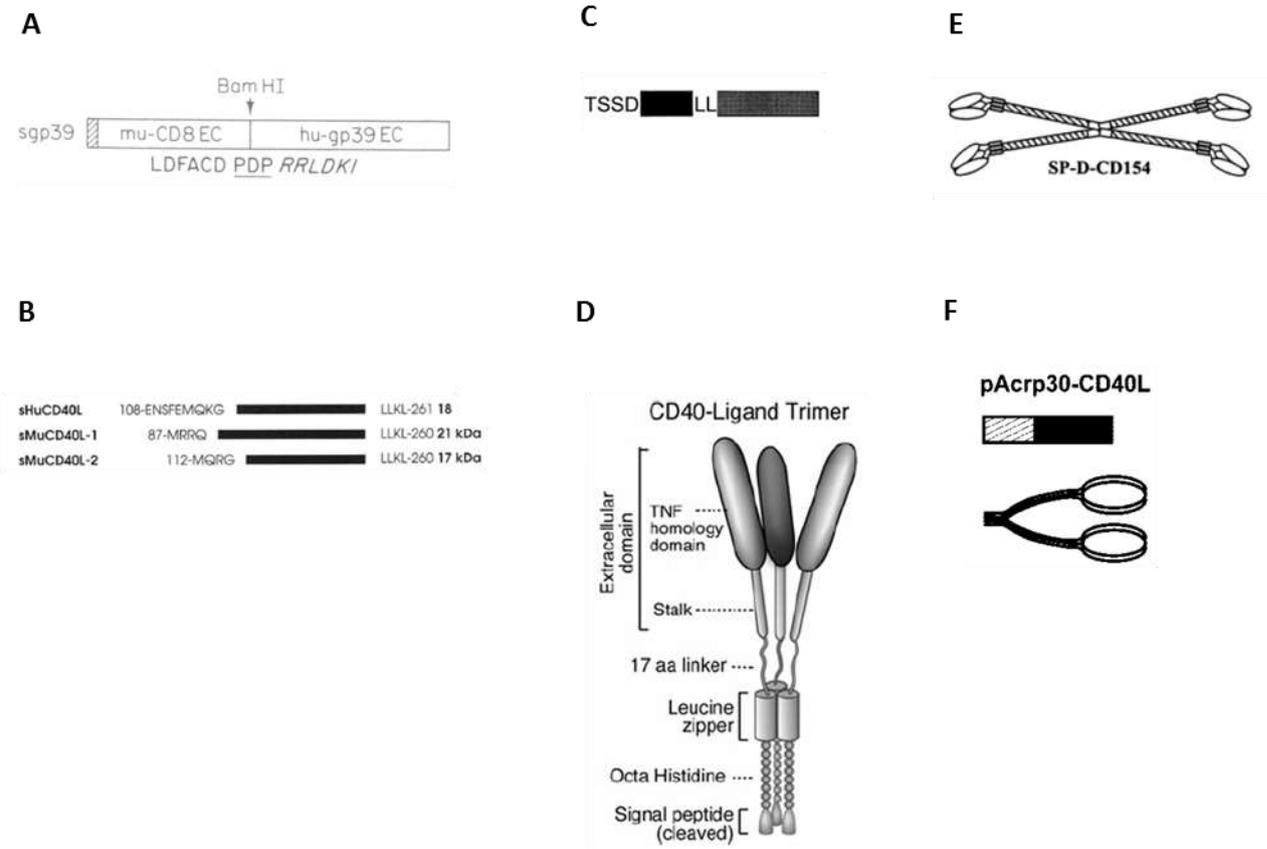


Figure 15. CD40L solubles recombinants. En A, de gauche à droite, les rectangles représentent les séquences du peptide signal du CD8, de la portion extracellulaire du CD8 de souris et de la portion extracellulaire du CD40L humain. En B, de haut en bas, CD40L soluble humain dont la séquence est synthétisée à partir de l'acide glutamique 108, CD40L soluble de souris synthétisé à partir de la méthionine 87 et CD40L soluble de souris synthétisé à partir de la méthionine 112. En C, de gauche à droite, séquence d'isoleucine (rectangle noir) et séquence d'acides aminés 112 à 261 du CD40L humain (rectangle gris). En D, schéma de la structure tertiaire du trimère de CD40L humain recombinant. De haut en bas, la molécule est composée du domaine d'homologie des TNFs, d'une jonction de 17 acides aminés, d'une séquence *isoleucine zipper* et d'un octamère d'histidine. En E, dodécamère de CD40L issu de la fusion du CD40L extracellulaire de souris (acides aminés 50-261) avec la protéine SP-D. Chaque branche de la structure centrale en croix représente la portion d'acides aminés 1 à 257 de la protéine SP-D. Un trimère de CD40L est représenté à chaque extrémité de la croix. F. En haut, CD40L de souris fusionné à la séquence d'acides aminés 1 à 109 de l'adiponectine. En bas, représentation de l'hexamère attendu.

Les séquences modifiées pour favoriser la multimérisation

La figure 15 C, tirée de l'étude de Morris en 1999, montre le premier motif de trimérisation ajouté à la séquence du domaine d'homologie des TNFs du CD40L humain soluble produit en cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO). L'effet du motif de trimérisation est toujours bénéfique sur l'activité, cependant, le mécanisme exact n'est pas connu. Ainsi, selon Morris et collaborateurs en 1999, la trimérisation est une propriété intrinsèque au domaine d'homologie des TNFs et ne nécessite pas la présence du motif d'isoleucine. En revanche, celui-ci pourrait stabiliser la Lys 143 toute proche, qui est importante dans la liaison avec le récepteur. Le ligand non trimérisé ne serait pas capable d'induire la prolifération cellulaire soutenue des lymphocytes B mais donnerait tout de même un signal de survie (Pound *et al.*, 1999). En 2013, un nouveau CD40L trimérique est mis au point par Naito et collaborateurs (figure 15 D). On remarque la présence d'un *linker* de 17 aas qui relie la partie extracellulaire du CD40L au motif de trimérisation. Cette particularité vise à augmenter la stabilité (Robinson et Sauer, 1998) et semble dans cette expérience favoriser la multimérisation. Ils observent une activité agoniste forte et une grande capacité à transformer des lymphocytes B en cellules présentatrices d'antigènes activant très efficacement les lymphocytes T. Des formes favorisant la multimérisation au-delà du trimère ont également été produites. En 2001, Haswell et collaborateurs produisent, en cellules CHO, et comparent, 2 types de CD40L. Le premier est le CD40L soluble trimérique composé d'une séquence *zipper* issue du domaine *coiled coil* de la protéine D du surfactant (SP-D) et de la partie extracellulaire totale du CD40L de souris. Le second (figure 15 E) est une fusion du CD40L soluble avec SP-D. Le SP-D est stabilisé par des liaisons disulfures interchaines en région N-terminale ainsi que par un motif *coiled coil* C-terminal et permet d'obtenir un quadrimère de trimères de CD40L. Ils montrent que le dodécamère active beaucoup plus les lymphocytes B lors de tests de prolifération *in vitro*. Ils remarquent que cette différence d'activation n'est pas due à une affinité plus grande du dodécamère pour le récepteur CD40 mais plutôt à l'induction d'une multimérisation supplémentaire de celui-ci. Ils mesurent également une activation de NF- κ B similaire dans les 2 stimulations et concluent que la multimérisation doit permettre d'activer plus fortement les autres voies de signalisation du CD40. En 2006, Stone et collaborateurs construisent un hexamère de CD40L par fusion de la séquence du domaine d'homologie des TNFs (aas 115 à 260) du CD40L de souris avec l'adiponectine (figure 15 F). Ils le comparent aux formes déjà produites par Haswell et collaborateurs en 2001 dans un test *in vivo* chez la souris en administrant directement le plasmide codant pour cette protéine par voie intra-musculaire. Ils remarquent que l'effet de l'hexamère est intermédiaire entre le trimère et le dodécamère, confirmant *in vivo* les observations réalisées *in vitro* par Haswell en 2001. Ils vérifient également, avec des protéines produites en cellules de mammifères 293T, que les protéines de fusion CD40L-adiponectine et CD40L-SPD

s'assemblent spontanément en multimères. Nous remarquerons que l'exemple F appartient à une catégorie légèrement différente car ce sont les plasmides codant pour les protéines d'intérêt et non les protéines elles-mêmes qui sont injectés.

Remarque sur les CD40L solubles destinés à la vaccination ADN

Une multitude de vecteurs plasmidiques différents ont été utilisés lors des études portant sur la vaccination ADN avec CD40L chez la souris. De très bons résultats ont été obtenus dans la plupart de ces études, quel que soit le vecteur employé. Par contre, la technique s'est révélée inefficace ou de très faible efficacité chez les grands animaux. Actuellement, le problème réside donc plus dans le développement d'une voie d'administration adaptée aux animaux de grande taille que dans le choix du plasmide ou la forme de CD40L à utiliser. Nous ne décrivons donc pas dans le détail les constructions réalisées par les auteurs utilisant cette technique.

4.3.2 Effet sur la réponse immunitaire

Lorsqu'il est administré en même temps qu'un antigène, l'activateur du CD40 agit comme un adjuvant vaccinal. Il peut alors stimuler la réponse humorale en activant les lymphocytes B. Il peut également stimuler les cellules dendritiques pour qu'elles activent les lymphocytes T helper ou les CTLs. Ce mode d'action constitue une défense contre les tumeurs et les infections.

4.3.2.1 Réponse humorale

Bien que l'on connaisse l'importance cruciale de CD40 dans le développement de l'immunité humorale depuis le début des années 1990, l'intérêt d'une stimulation iatrogène de CD40 pour améliorer celle-ci n'a pas été immédiatement évalué. En effet, les études *in vivo* montrant que la stimulation du CD40 était indispensable à l'induction de cette immunité n'utilisaient que des souris déficientes pour CD40 ou des anticorps bloquants. L'augmentation de la réponse humorale chez la souris par injection d'activateurs du CD40 a été démontrée en 1997. Mendoza et collaborateurs montrent alors que l'administration combinée de plasmides codant pour la forme complète transmembranaire de CD40L et d'un antigène vaccinal augmente la production d'anticorps spécifiques de l'antigène par rapport à l'immunisation avec l'antigène seul. L'année suivante, l'injection répétée de CD40L recombinants après l'inoculation de l'herpès virus simplex -1 dans un modèle murin de GVHD augmentait très nettement la réponse humorale (Beland *et al.*, 1998). Cet effet adjuvant sur la production d'anticorps spécifiques a même été montré chez le canard dans un modèle d'immunisation contre l'hépatite B (Gares *et al.*, 2006) ainsi que chez le poulet (Chen *et al.*, 2012).

4.3.2.2 Réponse des cellules T cytotoxiques

Elle est souvent nécessaire mais est plus difficile à obtenir que la réponse humorale. Le principal intérêt de la stimulation du CD40 réside dans sa capacité à induire cette réponse cellulaire. Ainsi, l'étude précédemment citée (Mendoza *et al.*, 1997) rapporte déjà une forte réponse CTL spécifique chez les souris immunisées. En 1998, Ridge et collaborateurs montrent que la stimulation du CD40 des DCs permet d'induire une forte réponse CTL spécifique. Celle-ci est également observée dans l'immunisation contre un carcinome chez la souris (Gurunathan *et al.*, 1998). De plus, la stimulation du CD40 permet d'obtenir une réponse CTL efficace contre des antigènes peu immunogéniques et après une seule exposition (Wurtzen *et al.*, 2001). En 2002, Van Mierlot et collaborateurs prouvent que l'anti-CD40 agoniste FGK-45 permet l'élimination de tumeur CD40^{-/-} et confirment ainsi la théorie selon laquelle les anti-CD40 peuvent éliminer les cellules tumorales *via* la seule activation de CTLs. La même année, Peter et collaborateurs montrent de plus que l'injection intra-tumorale du CD40L permet la destruction de la tumeur contrairement à l'injection systémique qui est sans effet. Or, cette injection intra-tumorale permet de rassembler CD40L et antigènes tumoraux, comme dans un vaccin adjuvanté par CD40L. Ils remarquent de plus que la tumeur est infiltrée par des LTCD4⁺ et LTCD8⁺ principalement, plus des DCs, ce qui montre le potentiel de l'utilisation de CD40L comme adjuvant vaccinal. En 2006, l'étude de Stone et collaborateurs déjà citée, mesure l'effet adjuvant de CD40L dans un vaccin contre un modèle d'infection à HIV chez la souris. Ils immunisent les souris 3 fois pendant 4 semaines avec une combinaison de CD40L et d'antigènes recombinants de HIV. Ils remarquent que le CD40L permet l'induction d'une forte réponse CTL durable et spécifique des antigènes vaccinaux. Plusieurs études ont alors testé l'immunisation contre HIV et ont toutes observé une augmentation nette des réponses T (Liu *et al.*, 2008 ; Gomez *et al.*, 2009). En 2012, Auten et collaborateurs notent l'augmentation des réponses LTCD4⁺ et LTCD8⁺ spécifiques de mycobactérium lors de l'utilisation de CD40L.

4.3.2.3 Réponse Th1

L'activation du CD40 des DCs permet l'induction de la réponse CTL, mais de manière plus générale, l'activation du CD40 des APC stimule la réponse Th1. Cette réponse est contrôlée par les lymphocytes du même nom et comprend l'activation des cellules phagocytaires et la production d'anticorps opsonisants ou activant le complément. Le CD40L administré stimule la destruction des pathogènes phagocytés, la présentation antigénique et la production d'IL-12 et de TNF par les macrophages. Ils sont alors capables, notamment grâce à l'IL-12 et le TNF

sécrétés, d'orienter les lymphocytes TCD4⁺ vers le phénotype Th1. Ceux-ci produisent de l'IFN- γ et stimulent ainsi la production d'anticorps osponisants.

L'utilisation de CD40L comme adjuvant vaccinal augmente la production des anticorps et des cytokines Th1 et protège alors contre les virus et autres pathogènes intracellulaires (Gurunathan *et al.*, 1998 ; Ferlin *et al.*, 1998 ; Tripp *et al.*, 2000 ; Sin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; liu *et al.*, 2008 ; Gomez *et al.*, 2009).

La réponse Th1 serait même nécessaire à l'efficacité de l'adjuvant CD40L (Auten *et al.*, 2012). Cette équipe démontre en effet une réduction majeure des LTCD8⁺ spécifiques de l'antigène vaccinal chez les souris déficientes (même partiellement) en LTCD4⁺. Le CD40L administré ne permet pas d'annuler cet effet. Son pouvoir adjuvant dépend donc des lymphocytes Th1.

4.3.3 Efficacité contre les tumeurs

En plus de l'induction de la réponse cellulaire cytotoxique classique contre les cellules tumorales, l'administration d'agonistes du CD40 peut induire directement l'apoptose (Hess *et al.*, 1996). Le mécanisme exact par lequel l'apoptose est induite sur les lymphomes B de haut grade est inconnu (Law et Grewal, 2009). Pour les carcinomes, l'activation du CD40 peut induire la production de TNF- α , de Fas, FasL et de TRAIL et en conséquence l'apoptose, par un mécanisme autocrine (Eliopoulos *et al.*, 2000). Une voie indépendante des autres TNFs, *via* TRAF3/JNK et activant directement les caspases 3 et 9 a aussi été évoquée (Georgeopoulos *et al.*, 2006). Un second mécanisme conséquent à l'activation directe du CD40 des cellules tumorales est également possible : l'induction de l'expression de molécules de costimulation ainsi que de la présentation d'antigènes par ces cellules. Cela facilite leur élimination par les lymphocytes T cytotoxiques activés (Thomas *et al.*, 1996 ; Alexandroff *et al.*, 2000). De fait, la stimulation du CD40 a montré une réelle efficacité dans le traitement de différents cancers.

4.3.3.1 Tumeurs traitées avec les anti-CD40 agonistes

En 1993, du sérum de rats immunisés avec du CD40 de souris permet pour la première fois d'inhiber la croissance d'un lymphome B chez la souris (Heath *et al.*, 1993). L'année suivante, c'est un anticorps monoclonal anti-CD40 humain (m2, IgG1 de chez Immunex) qui joue ce rôle (Funakoshi *et al.*, 1994). En 1999, French et collaborateurs utilisent les anticorps monoclonaux anti-CD40 agonistes FGK-45 et 3/23 et montrent une éradication complète des lymphomes exprimant CD40 chez la souris. En 2002, Tutt et collaborateurs observent l'élimination, médiée par des CTLs spécifiques, de 4 souches de lymphomes de souris suite à l'injection d'anti-CD40

agonistes 3/23. Le premier anti CD40 humain agoniste testé chez l'homme est le CP-870,893, mis au point par Pfizer. Il a fait preuve d'une bonne efficacité lors du premier test clinique réalisé par Vonderheide et collaborateurs en 2007. Cependant, aucun effet bénéfique n'est constaté dans une seconde étude (Ruter *et al.*, 2010). Il agirait pourtant synergiquement avec la chimiothérapie (Vonderheide *et al.*, 2013). Deux autres anti-CD40 agonistes plus récents sont également en phase de test chez l'homme : le Dacetuzumab de *Seattle Genetics* et le Chi lob 7/4 de l'université de Southampton. Ils présentent une activité agoniste plus faible que le CP-870,983 mais cela permet d'en limiter certains effets secondaires comme le syndrome de libération de cytokines.

4.3.3.2 Tumeurs traitées avec CD40L

La première thérapie anti tumorale avec le CD40 ligand soluble remonte à 1994 : du surnageant de cellules transfectées avec CD40L est utilisé pour inhiber la croissance d'un lymphome B chez la souris (Funakoshi *et al.*, 1994). Puis en 1998, Gurunathan et collaborateurs obtiennent, par vaccination avec un plasmide codant pour le CD40L fusionné au motif d'Ile, une protection totale des souris contre le challenge tumoral. Après cette étude, les immunothérapies anticancéreuses efficaces utilisant le CD40L se multiplient chez la souris (Alexandroff *et al.*, 2000 ; Peter *et al.*, 2002). Le premier essai clinique chez l'homme remonte à 2001 lorsque Vonderheide et collaborateurs testent le rhuCD40L d'Avrend. Ils constatent un effet satisfaisant sur plusieurs types de tumeurs solides.

4.3.4 Efficacité contre les maladies infectieuses

L'élimination complète des tumeurs grâce aux agonistes du CD40 est un exemple marquant de leur potentiel thérapeutique, mais certains succès ont également été obtenus dans le cadre de la lutte contre les infections.

4.3.4.1 Protection contre les pathogènes intracellulaires

Virus

En 1998, dans l'expérience de Beland et collaborateurs, la GVHD oriente la réponse immunitaire des souris vers le phénotype Th2 avec un taux d'IgG1 normal et un taux d'IgG2a diminué lors de l'infection par l'*herpès virus simplex-1*. L'injection répétée de CD40L par voie intrapéritonéale rétablit un taux d'IgG2a normal et améliore la survie des souris. Beland et collaborateurs démontrent aussi que les lymphocytes B sont indispensables à cette protection mais ne mesurent pas la réponse CTL. Quelques années plus tard, chez la souris, un vaccin ADN avec des plasmides

INTRODUCTION

codant pour les glycoprotéines F et G du virus syncytial respiratoire et un plasmide codant pour le CD40L a permis d'augmenter significativement la clairance du virus par rapport à la vaccination avec les glycoprotéines seules (Harcourt *et al.*, 2003). Plus récemment, un vaccin porcin composé d'un vecteur adénoviral, contenant le CD40L soluble fusionné aux glycoprotéines (GP) 3 et 5 du *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* PRRSV où le CD40L et les GP 3 et 5 sont non fusionnés, a induit une augmentation significative des réponses humorales et cellulaires et une protection partielle contre cette infection (Cao *et al.*, 2010). Chez la souris, un vaccin ADN contre le virus Ectromelia utilisant le *modified vaccinia Ankara* comme vecteur, a été adjuvanté avec CD40L. Une augmentation très significative de la survie des souris lors du challenge viral a été constatée, de même qu'une forte réponse CTL (Lauterbach *et al.*, 2013). Enfin, en 2014, Gupta et collaborateurs utilisent, à nouveau chez la souris, un plasmide codant pour une protéine de fusion composée du SP-D, du CD40L extracellulaire et de l'antigène GAG du HIV. Ils testent cette protéine en même temps que les formes anciennes décrites par Stone et collaborateurs en 2006, à la fois *via* des vecteurs plasmidiques et *via* des adénovirus. Ils constatent que les lymphocytes des souris immunisées avec la nouvelle protéine produisent plus d'IFN- γ et d'IL-2 que les souris immunisées avec l'ancienne forme. De plus, l'immunisation avec la nouvelle forme dans le vecteur adénoviral fournit une protection totale contre le challenge viral.

Bactéries

En ce qui concerne les infections bactériennes, peu d'expériences de vaccination avec adjuvant stimulant le CD40 et suivies d'un challenge infectieux ont été réalisées. Il y a tout de même Rolph et Kauffman, qui, en 2001, utilisent des anti-CD40 agonistes (clone 3/23 et clone IC10) comme adjuvant dans 2 vaccins avec des bactéries tuées par la chaleur (*Listeria monocytogenes* ou *Salmonella typhimurium*). Ils observent dans les 2 cas plus de LTCD4⁺ et LTCD8⁺ spécifiques et produisant nettement plus d'INF- γ que les contrôles n'ayant reçu que les bactéries tuées. Ils montrent également une réduction d'un facteur 1000 de la charge bactérienne après challenge et une survie de 100% contre une mortalité de 100% dans le groupe contrôle.

Protozoaires

L'élimination de certains parasites intracellulaires est également facilitée par les agonistes du CD40. Ainsi, pour Gurunathan et collaborateurs en 1998, l'administration combinée d'antigènes de *L. major* et de plasmides codant pour CD40L permet la résistance des souris vaccinées au challenge infectieux avec *L. major*. Ils confirment de plus, *via* la déplétion des LTCD8⁺, que ceux-ci sont responsables de cette réponse cytotoxique. Ils montrent également, par l'utilisation d'anticorps anti-IL-12 que cette cytokine n'est pas indispensable à la réponse CTL, en réalité

induite par l'augmentation de B7 *via* la stimulation du CD40. Par contre, la production d'IL-12 induite par la stimulation du CD40 semble indispensable à l'induction de la production d'IFN- γ et en conséquence d'IgG2a. La stimulation du CD40 induit donc la réponse CTL directement et la réponse humorale *via* la production de cytokines Th1. L'ensemble permet une défense efficace contre *L. major*.

4.3.4.2 Le cas du bovin et de *S. aureus*

En 2001, des souris *Severe combined immunodeficiency* (SCID) au système immunitaire bovinisé, traitées avec des anti-CD40 bovins agonistes montrent une résistance accrue à l'infection par *Trypanosoma congolense* (Hass *et al.*, 2001). En 2003, Manoj et collaborateurs construisent un plasmide codant pour une protéine de fusion entre la partie extracellulaire (aas 46 à 261) du CD40L bovin et la Glycoprotéine-D de l'herpèsvirus bovin-1. Leur but est d'évaluer l'effet du CD40L à la fois comme adjuvant et comme antigène vaccinal. Lors de l'expression *in vitro* de la protéine, ils observent la liaison au récepteur, une dimérisation spontanée et l'induction de la prolifération de lymphocytes B. L'injection du plasmide aux moutons induit une augmentation de la réponse humorale contre la glycoprotéine-D. Cependant, cette même expérience n'a pas été reproductible chez le bovin, où on observe des réponses humorales et cellulaires plus faibles après immunisation avec le CD40L fusionné. Une très légère augmentation de la réponse humorale en faveur du CD40L se manifeste après le challenge viral (Manoj *et al.*, 2004). Enfin, un vaccin ADN composé de la partie extracellulaire du CD40L bovin fusionné à la protéine majeure de surface-1 d'*Anaplasma marginale* et à la protéine CD205 est testé chez le veau (Njongmeta *et al.*, 2012). L'effet du CD40L n'est cependant pas précisément évalué dans cette étude focalisée sur CD205.

Nous rappellerons également l'exemple déjà cité de protection contre *S.aureus* conférée par l'utilisation d'anti-CD40 agonistes comme adjuvant vaccinal dans un modèle murin de mammites. Cette expérience réalisée par Wallemacq et collaborateurs en 2012 dans notre laboratoire avait alors montré une augmentation très significative de la réponse spécifique de *S. aureus* ainsi qu'une nette diminution de la charge bactérienne dans les glandes des souris ayant reçu l'anti-CD40.

OBJECTIF

Comme nous l'avons vu dans la partie consacrée aux mammites à *S. aureus*, la vaccination semble être le traitement de choix. Il existe, de plus, plusieurs évidences d'un effet bénéfique de la réponse CTL dans la lutte contre cette bactérie. Enfin, l'activation de la voie de signalisation du CD40 est, dans de nombreuses situations, indispensable au développement de cette réponse et, même quand elle n'est pas nécessaire, elle paraît tout de même la favoriser. En prenant en compte ces 3 éléments, nous avons décidé d'utiliser une protéine recombinante CD40L bovine comme adjuvant vaccinal favorisant la réponse CTL. Nous avons alors tenté de développer le vaccin ainsi adjuvanté pour lutter contre les mammites bovines causées par *S. aureus*.

Deux méthodes d'administration de cet adjuvant ont été envisagées. La première, classique consiste à produire *in vitro* la protéine recombinante, à la purifier puis à l'injecter aux bovins. La seconde, encore largement expérimentale, consiste en l'injection de plasmides codant pour la protéine d'intérêt directement aux animaux, c'est la vaccination ADN expliquée plus haut. L'intérêt de cette dernière technique est surtout économique, la production et la conservation des plasmides étant plus facile. Elle se heurte cependant aux limites des technologies actuelles et n'est pas encore au point chez les grands animaux.

Dans ce projet, en raison de l'absence de CD40L bovin disponible sur le marché, nous produirons nous-même cet adjuvant. Nous devons donc tout d'abord mettre au point notre propre technique de production du CD40L recombinant bovin. Nous nous attacherons ensuite à vérifier son activité dans des tests *in vitro*. Nous tenterons enfin d'évaluer son efficacité en combinaison avec des staphylocoques tués lors de l'immunisation de bovins.

SECTION EXPERIMENTALE

Nous expliquerons dans la partie *matériel et méthodes* les techniques utilisées tout au long de ce travail. Nous détaillerons en premier lieu les étapes menant à la production de CD40L recombinants fonctionnels puis aborderons les tests *in vivo* utilisés pour évaluer leur potentiel adjuvant. Nous montrerons dans la partie suivante les *résultats expérimentaux* obtenus. Nous présenterons dans cette dernière partie les principaux succès et échecs de la production et purification puis certaines caractéristiques structurelles et fonctionnelles de nos CD40L. Les résultats obtenus *in vitro* seront détaillés pour les protéines produites en bactéries dans un premier chapitre et pour celles destinées à la vaccination ADN dans un second. Un 3^e volet exposera l'effet de l'utilisation de l'adjuvant CD40L sur la réponse immunitaire de génisses Holstein. Nous y exposerons également les premiers résultats d'un test évaluant la protection conférée par cet adjuvant contre les mammites à *S. aureus* chez la vache laitière.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 1 : CLONAGE DES DIFFERENTES FORMES DU CD40L BOVIN

1 Génération des séquences

1.1. Séquences naturelles

Deux séquences issues de la partie extracellulaire du CD40L bovin naturel ont été sélectionnées : l'une codant pour les aas 47 à 261 et l'autre pour les aas 113 à 261. Ces séquences isolées de la partie extracellulaire sont également appelées solubles car dépourvues de la partie transmembranaire de la protéine. Chaque clonage décrit dans ce travail contient une de ces 2 séquences.

1.1 Génération de 4 séquences de base

L'acide ribonucléique (ARN) a été extrait, par la méthode du Trizol, à partir de cellules monocytaires périphériques sanguines (PBMCs) bovines isolées par gradient de densité (Histopaque 1077 ; Sigma Aldrich ; St Gall, SUISSE). L'ARN a subi une transcription inverse (*first strand ADNc synthesis kit* ; Roche ; Bâle, SUISSE) et une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée avec l'enzyme *platinum taq dna polymerase high fidelity* d'Invitrogen (Carlsbad, USA). Les *primers forward* ont été spécialement choisis pour l'intégration des amplicons dans un plasmide topoisomérase (TOPO) directionnel p-ENTR du système *Gateway* d'Invitrogen. Quatre *primers forward* différents, commençant aux paires de bases correspondant aux aas 47 ou 113 et incluant ou non une séquence codant pour le motif d'isoleucine favorisant la trimérisation, ont été utilisés (*primers* 1, 2, 3 et 4 du tableau II). Un *primer reverse*, numéro 5 du tableau II, a été utilisé. Une électrophorèse des produits PCR a été réalisée pour vérifier la présence et la taille des 4 séquences amplifiées, c'est-à-dire les 2 séquences longues (47-261) avec ou sans motif de trimérisation, respectivement nommées ZL-CD40L et L-CD40L et les 2 séquences courtes (113-261) avec ou sans motif de trimérisation, respectivement nommées ZC-CD40L et C-CD40L.

Remarque : les variations de la police (italique, majuscules) dans les tableaux de primers permettent simplement de mieux visualiser les différentes séquences correspondant notamment au site de restriction, peptide signal, tag, motif d'Ile, etc.

1.2 Clonage du CD40L soluble en bactéries

1.2.1 Constructions principales

Dans un premier temps, nous avons réalisé un clonage pour une production de notre protéine recombinante en bactéries. A cette fin, les 4 séquences ont été insérées dans un plasmide TOPO. Les TOPO sont des plasmides d'amplification de la séquence d'intérêt (insert). La réaction TOPO a été réalisée en mélangeant à la solution saline du kit Invitrogen les plasmides TOPO et nos inserts dans un rapport équimolaire puis en incubant cette solution 5 min à température ambiante. Ce mélange a été ajouté à des bactéries chimiocompétentes (Top 10, Invitrogen) ; après une incubation de 10 min sur glace, un choc thermique à 42°C pendant 30 sec a été réalisé et la solution a été ensuite incubée pendant 1 h sous agitation à 37°C dans du milieu *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC). Les bactéries ont ensuite été étalées sur milieu de croissance *Lysogeny broth* (LB) agar contenant 100 mg/L d'agent de sélection (kanamycine) et incubées *overnight* dans un incubateur à 37°C. Les colonies ont été repiquées dans du milieu de croissance

LB contenant l'agent de sélection. L'ADN plasmidique a été purifié par la technique de miniprep du kit *nucleospin plasmid* (MN ; Düren, ALLEMAGNE). La vérification des plasmides a été réalisée grâce à une digestion avec l'enzyme de restriction PvuII (Roche). Les bons clones présumés ont été séquencés par la plateforme génomique du Giga (GIGA Genomics Facility, Sequencing platform; Liège, BELGIQUE) en utilisant les *primers* M13 du kit *Gateway*. Les bonnes séquences ont été introduites par recombinaison dans le plasmide d'expression pDEST 17 (*Gateway*, Invitrogen). Le p-DEST17 contient de plus une séquence codant pour 6 histidines (His) en N-terminal de l'insert qui servira de balise ou étiquette (*Tag*) lors de la purification de la protéine. La réaction de recombinaison a été réalisée dans le tampon Tris-EDTA (TE) entre 150 ng de TOPO et 150 ng de p-DEST 17 en présence de *LR clonase II Enzyme Mix* (du kit *Gateway*), le tout incubé à 25 °C pour 1h. Une seconde incubation de 10 mn à 37°C en présence de protéinase K a ensuite été réalisée. Nous avons enfin procédé à la transformation de bactéries DH5 α (Invitrogen) avec ce mélange et, à part l'agent de sélection qui était cette fois l'ampicilline à 100 μ g/ml, avons suivi la même technique de culture, purification, digestion et migration que pour les TOPOs.

Tableau II: détail des primers utilisés pour l'ensemble des clonages en bactéries

PRIMERS		SEQUENCES
1	L-CD40L_F1	CACCCTTCACAGACGATTGGACAAG
2	C-CD40L_F2	CACCATGCACAAGGGTGATCAGGA
3	ZL-CD40L_F1	CACCagaatgaagcagatcgaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctacacatcga gaacgagatcgccagaatcaagaagctgatcggcgagagaaccagcagcCACAGACGA TTGGACAAGATA
4	ZC-CD40L_F2	CACCagaatgaagcagatcgaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctacacatcga gaacgagatcgccagaatcaagaagctgatcggcgagagaaccagcagcATGCACAAG GGTGATCAGGA
5	Bov_CD40L_R	tcagagtttgagtaagccaaat

1.2.2 Constructions supplémentaires

Un vecteur d'expression légèrement différent, le p-DEST 14 (Invitrogen) a aussi été utilisé pour produire la protéine sans le *tag* His au cas où la présence du *tag* empêcherait le repliement correct de la protéine. Un autre vecteur, le plasmide pBAD (Kit pBAD/gIII, Invitrogen) a également été employé pour favoriser la sécrétion des protéines recombinantes dans le périplasme des *E. coli*. En effet, le peptide signal du gène III du bactériophage M13, présent dans ce plasmide, facilite cette sécrétion. Nous avons alors cloné les formes L-CD40L et ZL-CD40L dans le plasmide pBAD selon les recommandations du kit. Tout comme le pDEST 17, le plasmide pBAD insère directement un *tag* His sur les protéines clonées.

1.3 **Clonage de la protéine de fusion GST-CD40L en bactéries**

Nous avons ici cloné les mêmes CD40L solubles (naturels ou avec motif de trimérisation) que ceux détaillés ci-dessus mais nous les avons fusionnés à la protéine glutathion S-transférase (GST) de *Shistosoma japonicum* comme le montre la figure 16. La séquence a été générée comme expliqué ci-dessus pour le CD40L, mais le plasmide d'expression utilisé est dans ce cas, le p-DEST 15 (Invitrogen) qui contient déjà la séquence de la GST et permet de fusionner celle-ci à la partie N-terminale du CD40L. Un plasmide codant seulement pour la GST a également été construit pour obtenir une protéine contrôle négatif. Pour cela, 2 oligonucléotides contenant un codon stop, Stop-1 (TCGAGGAAACTCTAGATGAGAAGG) et Stop-2 (CGCGCCTTCTCATCTAGAGTTTTCC) ont été appariés et insérés dans le p-Dest 15 après excision de la séquence du CD40L par les enzymes de restriction Xho1 et Asc1.

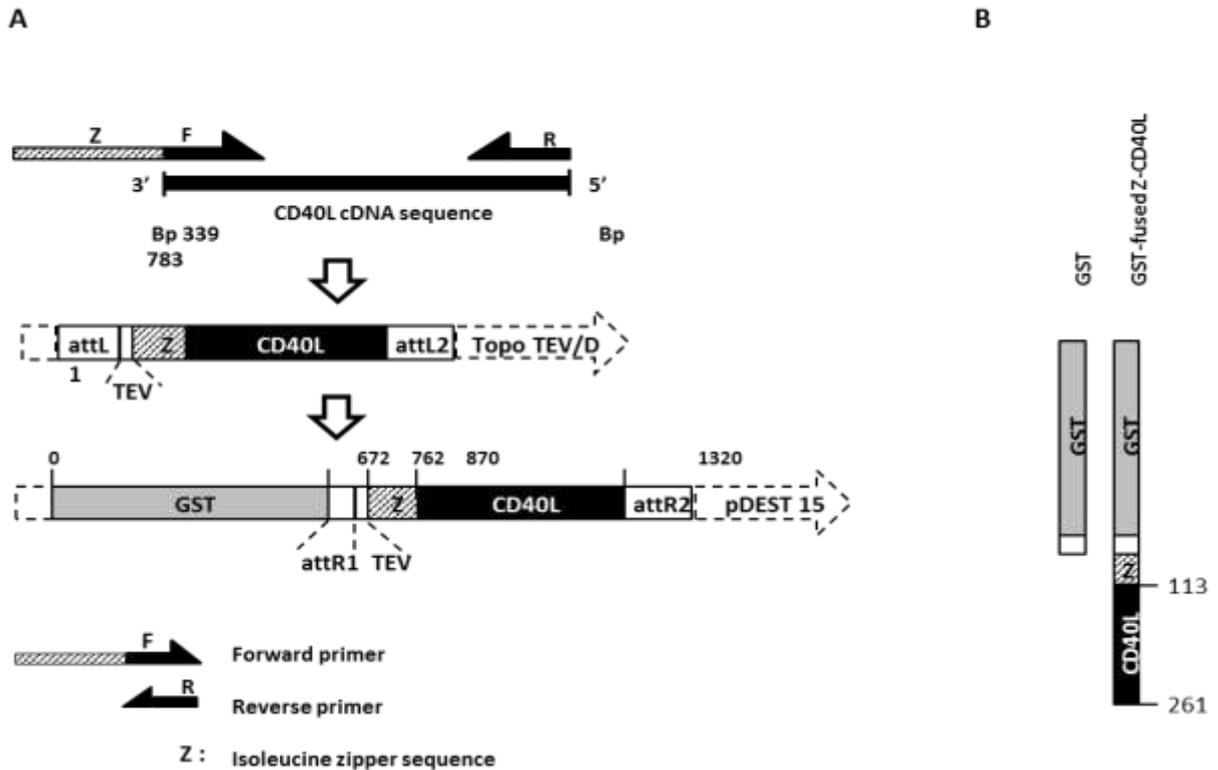


Figure 16: Clonage du GST-CD40L bovin en *E. coli*. A. Le primer forward a été dessiné pour inclure une séquence *isoleucine-zipper* (Z). La séquence Z-CD40L a ensuite été amplifiée et fusionnée au site de reconnaissance par la protéase TEV dans le plasmide TOPO TEV/D. La fusion avec la protéine GST a été réalisée en transférant par recombinaison la séquence Z-CD40L dans le plasmide d'expression pDEST 15. B. Représentation schématique de la protéine de fusion GST-CD40L. GST-CD40L est composé de la séquence codant pour la protéine GST (gris) suivie par les sites de recombinaison et de reconnaissance par TEV (blanc) et par le domaine de trimérisation (Z) (hachuré) fusionné à la partie N-terminale du domaine extracellulaire du CD40L bovin (noir). Cette dernière partie (en noir) correspond au domaine d'homologie des TNFs (aas 113-261). Le contrôle est simplement composé par la séquence de la GST suivie de celle du site de reconnaissance par le TEV.

1.4 Clonage du CD40L soluble en cellules de mammifère

1.4.1 Formes de recombinants CD40L

La figure 17 A illustre la technique de clonage utilisée pour ces formes de ligand. Une PCR a été réalisée à partir des plasmides pDEST 17. Nous avons utilisé 3 *primers forward* différents (n°1, 2 et 3 du tableau III) et 1 *primer reverse* (n°4 du tableau III). L'abréviation GH représente la séquence du peptide signal de l'hormone de croissance bovine. Le *primer 1* a été dessiné pour cloner la séquence longue du CD40L (L-CD40L, pb 135 à 783 du CD40L naturel). Le *primer 2* a été dessiné pour cloner la séquence courte du CD40L (C-CD40L, pb 333 à 783 du CD40L naturel). Le *primer 3*, complémentaire du début de la séquence d'isoleucine a été créé pour le clonage des formes longues et courtes avec motif de trimérisation (Z) respectivement ZL-CD40L et ZC-CD40L. Ces 4 séquences ont ensuite été insérées dans le plasmide TOPO PCR2.1 afin d'être amplifiées. Elles ont finalement été transférées dans le plasmide d'expression pour cellules de mammifères pcDNA3.1⁺ après excision par les enzymes de restriction HindIII et EcoRI. Les *primers 1, 2, 3* ont également été remplacés par des *primers* équivalents mais contenant les peptides signal du plasminogène ou du préprotrypsinogène (PR). Les *primers 5 à 7* du tableau III contiennent le peptide signal du PR.

1.4.2 Formes de recombinants GST-CD40L

Des formes identiques à celles décrites ci-dessus mais fusionnées à la protéine GST ont également été clonées. Une PCR sur les plasmides pDEST 15 utilisant un *primer forward* spécifique de la partie N-terminale de la GST couplé à la séquence du peptide signal PR (*primer 8* du tableau III) a été réalisée. Le *primer reverse* employé était encore le EcoRI_Bov_CD40L_R. Après la PCR, la procédure était identique à celle décrite au point précédent.

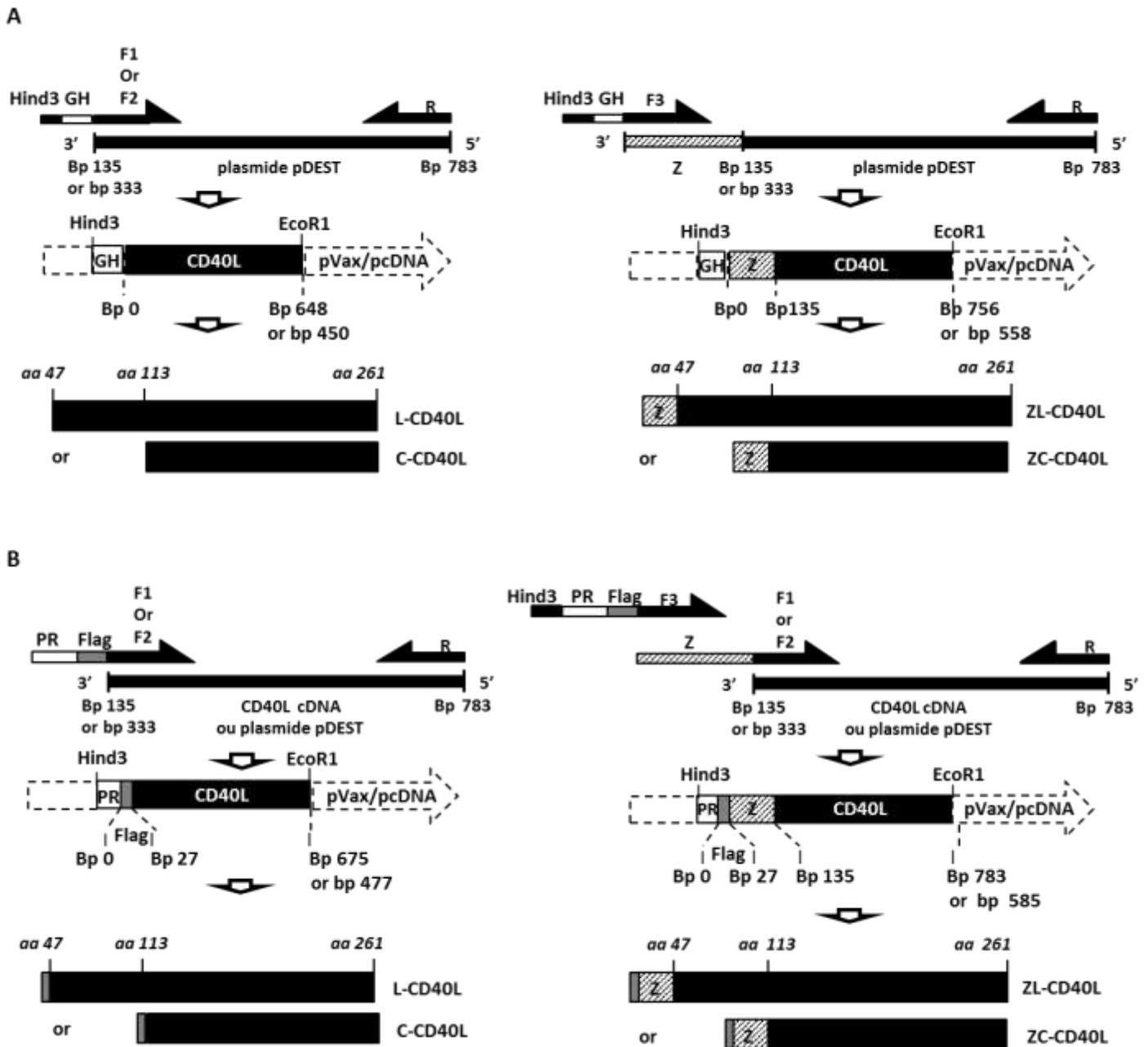


Figure 17: Détail du clonage de 8 formes de CD40L en cellules de mammifères. La figure A montre la technique employée pour les premières formes clonées sans FLAG et avec peptide signal de l’hormone de croissance humaine. A gauche les formes longues et courtes sans motif de trimérisation (z) et à droite ces mêmes formes avec motif de trimérisation. Les primers forward (F) utilisés correspondent aux primers 1, 2 et 3 détaillés dans le tableau III et le primer reverse (R) est le numéro 4 du même tableau. La figure B expose les principales modifications réalisées pour le clonage des formes couplées au FLAG avec le peptide signal du preprotrypsinogène. Le primer forward utilisé est le numéro 11 du tableau III.

Tableau III: détail des primers utilisés pour l'ensemble des clonages en cellules de mammifères

PRIMERS		SEQUENCES
1	HindII_GH_F1	AAGCTTatggctacaggetcccggacgtccctgctcctggctttggcctget ctgcctgccctggcttcaagagggcagtgccCACCCCTTCACAGACG ATTGGACAAG
2	HindII_GH_F2	AAGCTTatggctacaggetcccggacgtccctgctcctggctttggcctgc tctgctgccctggcttcaagagggcagtgccCACCATGCACAAGG GTGATCAGGA
3	HindII_GH_F3	AAGCTTatggctacaggetcccggacgtccctgctcctggctttggcctget ctgcctgccctggcttcaagagggcagtgccAAGCTTAGAATGAAG CAGATCGAGGAC
4	EcoRI_Bov_CD40L_R	GAATTCcagagtttgagtaagccaaat
5	HindII_PR_F1	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctCA CCCTTCACAGACGATTGGACAAG
6	HindII_PR_F2	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctCA CCATGCACAAGGGTGATCAGGA
7	HindII_PR_F3	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctAA GCTTAGAATGAAGCAGATCGAGGAC
8	HindII_PR_GST_F	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctTC CCCTATACTAGGTTATTGG
9	HindII_PR_FLAG_F1	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctGA CTACAAAGACGATGACGACAAGCACCCCTTCACAGAC GATTGGACAAG
10	HindII_PR_FLAG_F2	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctGA CTACAAAGACGATGACGACAAGCACCATGCACAAG GGTGATCAGGA
11	HindII_PR_FLAG_F3	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctGA CTACAAAGACGATGACGACAAGAAGCTTAGAATGAA GCAGATCGAGGAC
12	HindII_PR_FLAG_GST_F	AAGCTTatgcatcccctgcttatccttgcccttggtggagctgctgtggctGA CTACAAAGACGATGACGACAAGTCCCCTATACTAGG TTATTGG
13	EcoRI_GST_R	GAATTCcaacgcggaaccagatccgattt
14	GAPDH_F	ttcaacggcacagtcaagg
15	GAPDH_R	acatactcagcaccagcatcac

1.4.3 Formes de recombinants FLAG-CD40L

La figure 17 B illustre la technique de clonage utilisée pour ces formes de ligand. Comme pour les formes CD40L détaillées précédemment, une PCR a été réalisée à partir des plasmides pDEST 17. Nous avons utilisé 3 *primers forward* différents (n°9, 10 et 11 du tableau III) et 1 *primer reverse* (n°4 du tableau III). Le *primer* 9 a été dessiné pour cloner le L-CD40L, associé à la séquence du peptide signal du PR et de l'octapeptide DYKDDDDK (FLAG). Le *primer* 10 a été dessiné pour cloner le C-CD40L, associée à la séquence du PR et du FLAG. Le *primer* 11, complémentaire du début de la séquence d'isoleucine, a été créé pour le clonage des 2 formes ZL-CD40L et ZC-CD40L. Ces 4 séquences ont ensuite été insérées dans le plasmide topo PCR2.1 pour être amplifiées. Elles ont finalement été transférées dans les plasmides d'expression pcDNA3.1 et pVAX (pour cellules de mammifères) au moyen d'enzymes de restriction HindIII et EcoRI.

1.4.4 Formes de recombinants FLAG-GST-CD40L

Une nouvelle PCR à partir des plasmides pDEST 15 et utilisant des *primers forward* spécifiques de la partie N-terminale de la GST couplés aux séquences du peptide signal PR et du FLAG (*primer* 12 du tableau III), a été réalisée. Le *primer reverse* employé était toujours le numéro 4. Après la PCR, la procédure était identique à celle décrite au point précédent.

2 Production des protéines

2.1 CD40L bovin et GST-CD40L produits en bactéries

Des bactéries BL21-AI (Invitrogen) ont été transformées par choc thermique avec 10 ng de plasmide d'expression pDEST, étalées sur agar contenant 100µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Ensuite, 1 colonie a été repiquée dans 5ml de milieu LB et incubée sous agitation à 37°C jusqu'à obtenir une densité optique (DO) de 0.8 à 600nm déterminée par spectrophotométrie (Genesis 10 UV, Laborimpex, Bruxelles, Belgique). Les bactéries ont ensuite été diluées dans 5l de milieu, incubées jusqu'à une DO de 1. La transcription a été induite par l'ajout de L-arabinose à la concentration de 0,2% et les bactéries ont été agitées à température ambiante pendant 6 heures. Le culot bactérien a été récolté après 5 minutes de centrifugation à 6000 g.

2.2 CD40L bovin produit en cellules de mammifères

2.2.1 Protocole standard de production

Des cellules Cos-7 ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS), 50 UI/ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 90%. Elles ont ensuite été transfectées dans un volume total de 20 ml de milieu par flasque T75 contenant 2 µl/ml de Transfectin™Lipid Reagent (BioRad, Hercules, CA, USA) et 2 µg/ml de plasmide d'expression pcDNA3.1 ou pVAX. Les cellules ont alors été incubées à 37°C, sous atmosphère enrichie avec 5% de CO₂, pendant 8 h puis 50% du milieu a été renouvelé. Les cellules et les surnageants ont été récoltés 16 à 24 h après ce changement de milieu.

2.2.2 Protocole avec inhibiteur du protéasome

La transfection a été réalisée comme dans le protocole standard mais dans ce cas, du MG132 (Sigma) a été ajouté à une concentration de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M lors de l'étape de renouvellement de 50% du milieu décrite au point précédent. La récolte des cellules et des surnageants a eu lieu 24 h après.

2.2.3 Protocole final

Afin d'obtenir un surnageant plus concentré en protéines CD40L, le volume total de milieu par T75 a été abaissé de 20 ml à 10 et 5 ml. L'efficacité de la transfection a été améliorée comme suit : la confluence des cellules avant transfection a été réduite aux alentours de 50% et le milieu de transfection n'a plus été renouvelé après 8 h. Les cellules et les surnageants ont été récoltés 36 h après le début de la transfection.

3 Purification

3.1 Purification du CD40L bovin produit en bactéries

3.1.1 Extraction et purification

Trois techniques, non dénaturantes, dénaturantes et mixtes, d'extraction et purification du CD40L produit en bactéries dans le plasmide pDEST 17 ont été testées.

3.1.1.1 Protocole non dénaturant

Pour l'étape d'extraction, chaque culot bactérien issu d'un litre de culture a été re-suspendu dans 40 ml de tampon de lyse (0,5M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 1,8mg/ml lysozyme, 20 µg/ml DNase, pH 8,0). Après 40 minutes d'incubation à 4°C, la solution a été soniquée 3 fois 30 secondes sur glace et centrifugée à 10000 g pendant 20 minutes. Le surnageant récolté a été filtré sur filtre 0,45 µm. Pour la purification proprement dite, les surnageants d'extraction ont été incubés sur colonne Ni²⁺ retenant le *tag* d'His par liaison de coordination (kit *probound purification system*, Invitrogen). Les colonnes ont ensuite été lavées puis éluées avec les tampons non dénaturants détaillés dans le tableau IV (2^e colonne du tableau). L'éluion a été réalisée avec l'imidazole qui agit par compétition avec le *tag* His et permet de décrocher les protéines tout en gardant un pH physiologique.

3.1.1.2 Protocole dénaturant

Pour l'étape d'extraction, chaque culot bactérien issu d'un litre de culture a été re-suspendu dans 40 ml de tampon de lyse à base de guanidine HCl comme détaillé dans la 3^e colonne du tableau IV. Après 40 minutes d'incubation à 4°C, la solution a été soniquée 3 fois 30 secondes sur glace et centrifugée à 10000 g pendant 20 minutes. Le surnageant récolté a été filtré sur filtre 0,45 µm.

Tableau IV: résumé des tampons utilisés dans les 3 techniques d'extraction-purification des protéines CD40L produites en bactéries. La colonne de gauche spécifie les noms de chaque tampon et les classe par ordre d'utilisation. Les 3 autres colonnes détaillent les tampons employés respectivement dans les techniques non dénaturantes, dénaturantes et mixtes.

Méthodes	Non dénaturante	Dénaturante	Mixte
Tampons			
Tampon de lyse	Lysozyme 1,8 mg/ml, DNAse 20µg/ml	6 M Guanidine HCl	6 M Guanidine HCl
ETAPE 1	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 0.5 M NaCl	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.8 500 mM NaCl	20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.8 500 mM NaCl
Tampon de charge	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 0.5 M NaCl	8 M Urea 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.8 500 mM NaCl	8 M Urea 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.8 500 mM NaCl
ETAPE 2			
Tampon de lavage 1	20 mM imidazole 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 0.5 M NaCl	8 M Urea 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.0 500 mM NaCl	8 M Urea 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.0 500 mM NaCl
ETAPE 3			
Tampon de lavage 2		8 M Urea 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 5.3 500 mM NaCl	20 mM imidazole 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 0.5 M NaCl
ETAPE 3'			
Tampon d'élution	250 mM imidazole 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 0.5 M NaCl	8 M Urea 20 mM NaH ₂ PO ₄ pH 4.0 500 mM NaCl	250 mM imidazole 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0 0.5 M NaCl
ETAPE 4			

Pour la purification proprement dite, les surnageants d'extraction ont été incubés sur colonne Ni²⁺ comme dans le protocole non dénaturant. Les colonnes ont ensuite été lavées puis éluées avec les tampons détaillés dans le tableau IV. Les lavages ont été réalisés avec des tampons de pH décroissant afin de décrocher un maximum de contaminants protéiques retenus de manière aspécifiques avant l'éluion. L'éluion a alors été réalisée à pH 4.

3.1.1.3 Protocole mixte

Dans ce cas, les culots bactériens ont été re-suspendus dans le tampon du protocole dénaturant et extraits de la même façon. Les surnageants ont alors été incubés sur les colonnes Ni²⁺ et après cette étape, le tampon de lavage dénaturant a été progressivement remplacé par le tampon non dénaturant. L'éluion a été faite comme dans le protocole non dénaturant (voir 4^e colonne du tableau IV).

3.1.2 Dialyse

Une dialyse dans des tampons non dénaturants a été mise au point pour renaturer les protéines purifiées avec la technique dénaturante. Les éluats ont été injectés dans des cassettes à dialyse avec membranes de cellulose (*Slide-A-Lyzer Dialysis cassettes 10K MWCO*, Thermo scientific) et des pores de 10 kDa. Les cassettes ont ensuite été plongées pendant 48 à 72 h dans 0,5 litre de tampons de Na Cl 1M ou de glucose 3M à 4 °C.

3.1.3 Induction de la sécrétion dans le périplasme

Nous avons également réalisé l'extraction des protéines produites avec les plasmides pBAD. Pour rappel, ces plasmides favorisent la sécrétion des protéines recombinantes dans le périplasme des bactéries. Nous avons pour cela suivi les indications du kit pBAD/gIII et extrait les protéines CD40L ainsi que des protéines Calmoduline (contrôle positif du kit) par choc osmotique. En effet, le choc osmotique réalisé dans un tampon non dénaturant (voir protocole du kit Invitrogen) permet de faire sortir les protéines présentes dans le périplasme.

3.2 Purification du GST-CD40L bovin produit en bactéries

3.2.1 Extraction

Pour l'étape d'extraction, chaque culot issu d'1 litre de culture a été resuspendu dans 40ml de tampon de lyse (0,5M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 1,8mg/ml lysozyme, 20 µg/ml DNase, pH 8,0). Après 40 minutes d'incubation à 4°C, 0,5% de Triton X-100, 1,6 mg/ml de *cOmpete protease*

inhibitor (Roche, Mannheim, Germany) et 30mM de β -glycerophosphate ont été ajoutés. La solution a ensuite été soniquée 7 fois 30 secondes sur glace et centrifugée à 28000 g pendant 20 minutes. Le surnageant a été récolté et filtré sur filtre 0,45 μ m.

3.2.2 Purification au sens strict

3.2.2.1 Chromatographie échangeuse d'ions

Des colonnes Q HP (HiTrap Q HP, GE Healthcare) échangeuses d'anions ont été utilisées. La matrice de ces colonnes est composée d'agarose liée à des amines quaternaires portant des charges positives dans un large éventail de pH (pH 2 à 12). L'extrait protéique a été dilué 10X dans un tampon borate 20mM et NaCl 0 mM à pH 10,5 afin de diminuer la charge en sels du tampon, puis chargé sur la colonne à 4°C. L'élution a été réalisée à 4°C avec un tampon Borate 20 mM et avec une concentration croissante (0 à 1 M) en NaCl à pH 10,5. Chacune des 30 fractions d'élution a été analysée pour son absorbance dans le spectre UV par l'automate de chromatographie puis dosée par ELISA. Les fractions contenant le maximum de protéines GST-CD40L ont ainsi pu être isolées et la pureté relative de ces fractions a été déterminée par SDS PAGE.

3.2.2.2 Colonnes de détoxification

Les éluats de purification obtenus ont été chargés sur des colonnes retenant le LPS et élués selon les instructions du kit (*Endo Trap Blue endotoxin removal*, Hygloss).

3.2.2.3 Utilisation du détergent Triton

La figure 18 montre que le Triton-X-100 se fixe sur les acides gras du lipide A par liaison hydrophobe. Le LPS fixé est alors solubilisé par le Triton-X-100 puis éliminé en même temps que ce détergent pendant les lavages. Par la suite, une amélioration majeure a été permise par le remplacement progressif du Triton X-100 par le Triton X-114 au cours des étapes de lavage. En effet, le Triton X-114 est insoluble dans les solutions aqueuses au-dessus de 23°C. Cela permet de retirer le Triton pour éviter son effet délétère sur les cellules. Il suffit pour cela de mener tout le processus de purification à 4 °C pour que le Triton X-114 reste soluble puis de réchauffer l'éluat à 37°C pour précipiter le Triton. Celui-ci peut alors être culoté par centrifugation. Le surnageant contenant les protéines débarrassées du Triton est alors récupéré.

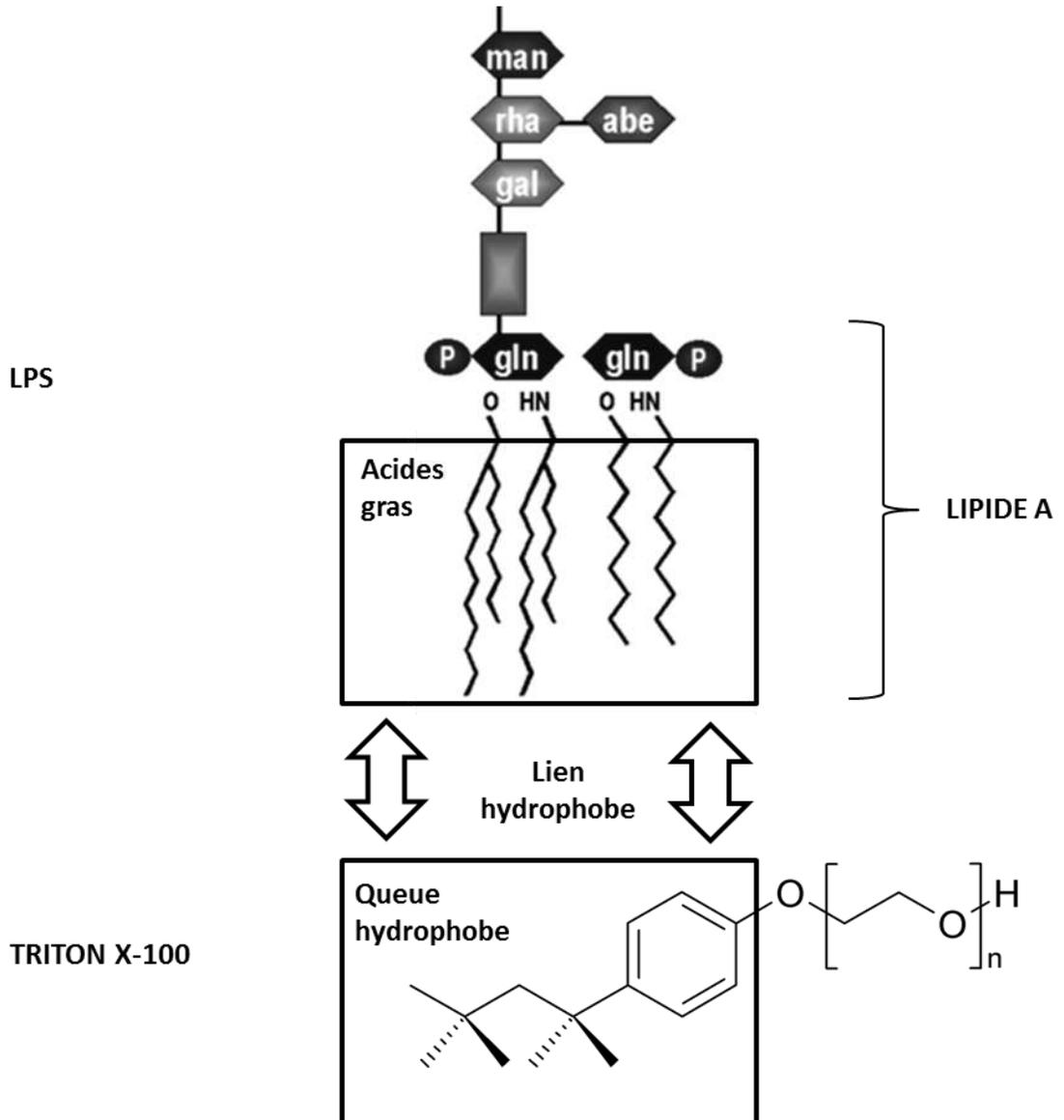


Figure 18: schéma de l'interaction LPS-détergent Triton-X-100. En haut, le LPS et en bas le Triton-X-100. Les cadres représentent les zones impliquées dans la liaison.

3.2.2.4 Technique finale

Le surnageant d'extraction a été purifié sur colonnes glutathion-agarose (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Les colonnes ont été équilibrées à 4°C avec le tampon d'équilibration (150mM de NaCl, 125 mM de Tris pH 8,0). Le surnageant issu de l'extraction a été incubé sur agitateur rotatif dans ces colonnes pendant 4 h à 4°C. Les colonnes ont ensuite été lavées 4 fois avec le tampon d'équilibration auquel 0,5% de Triton X-100 a été ajouté. Trois lavages supplémentaires ont été réalisés avec un tampon stérile dans lequel le Triton X-100 et le Tris 125 mM ont progressivement été remplacés par 0,5% de Triton X-114 et 20 mM de Tris à pH 8,5. Enfin, le tampon d'éluat (150 mM de NaCl, 20 mM de Tris, 0,1% Triton X-114 et 3mg/ml de glutathion à pH 8,6) a été incubé 90 minutes sur agitateur rotatif à 4°C. Le Triton X-114 a été retiré de l'éluat par ultracentrifugation à 37°C.

3.3 Purification du CD40L bovin produit en cellules de mammifères

Les surnageants de culture ont d'abord été centrifugés à 700 g pour éliminer d'éventuelles cellules flottantes. Les surnageants issus de cette première centrifugation ont été centrifugés une seconde fois à 20 000 g pour retirer les débris cellulaires et stockés à -80°C.

4 Tests de vérification de la production et de la conformation

4.1 Vérification de la transcription

Les cellules Cos-7 transfectées avec les pcDNA3.1⁺ codant pour 6 séquences différentes de CD40L ont été mixées dans du Trizol. L'ARNm a ensuite été extrait et de l'ADNc a été produit par transcription inverse (RT). Une PCR a alors été réalisée à partir de ces ADNc avec des *primers* spécifiques de la forme courte de CD40L bovin (*primers* 2 et 4 du tableau III). Une autre PCR utilisant des *primers* spécifiques pour le gène rapporteur GAPDH (voir tableau III) a également été faite pour chaque échantillon d'ADNc afin de s'assurer de l'invariabilité de leur concentration à l'issue des différentes RT. Les produits PCR ont alors été séparés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

4.2 Dosages protéique

4.2.1 Dosage des productions protéiques en bactéries

La concentration protéique dans l'éluat des colonnes de purification a été estimée par la technique de Bradford. Les résultats ont été comparés aux dosages réalisés par ELISA anti-GST (Thermo scientific, Erembodegem, Belgique) et aux colorations en bleu de coomassie des gels d'électrophorèses afin d'évaluer à la fois la pureté et la quantité absolue de GST-CD40L. L'anticorps de détection utilisé était un anti-GST (Voir tableau V pour tous les anticorps utilisés) à la dilution 1/5000. L'anticorps secondaire utilisé était un anti-rabbit-HRP (dilution 1/2000).

4.2.2 Dosage des productions en cellules eucaryotes

4.2.2.1 Protéines couplées au GST

Pour évaluer la concentration de ligand dans les surnageants de cellules Cos transfectées, une solution de GST-CD40L purifié produit en bactéries (et dosé à 100µg/ml par le test de Bradford) a été utilisé comme étalon. Elle a été diluée jusqu'à 2,5 µg/ml pour constituer la solution standard. Une courbe standard diluée de 2 en 2 (max 2500 ng/ml et min 20 ng/ml) a été réalisée, puis des échantillons non dilués de surnageants de cellules Cos-7 transfectées avec les plasmides codant pour la protéine GST-CD40L ont été dosés. Pour vérifier au mieux la fiabilité du dosage, une analyse par western blot anti-GST a également été réalisée. Dans ce western blot, 100 µl de surnageant de cellules Cos transfectées et 3 différentes doses de protéines purifiées ont été analysés en parallèle.

4.2.2.2 Protéines couplées au FLAG

La figure 19 schématise les 2 techniques ELISA utilisées pour détecter les différentes formes de protéines couplées au FLAG. Dans les 2 techniques, on coate la plaque avec un anticorps anti-FLAG (dilution 1/1000) puis on bloque avec du PBS contenant 0,05% de tween et 0,5% de BSA pendant 2 h à température ambiante.

Tableau V : anticorps utilisés

NOM	Hôte, molécule conjuguée	Réactivité	Clone	Firme
Anti-GST	Lapin, polyclonal	GST		Thermo Scientific
Anti-rabbit HRP	Chèvre, polyclonal	Anticorps de lapin		Dako, Everlee, Belgique
Anti-FLAG	Souris, IgG2b	FLAG	FG4R	Thermo Scientific
Anti-His	Souris IgG1	Tag d'histidines	4A12E4	Invitrogen
Anti-CD40L-rm	Lapin, polyclonal	Région médiane du CD40L Humain, porc, cheval, bovin, chien, mouton, lapin, rat, souris		Aviva systems biology, San Diego, CA, USA.
Anti-CD40L N-Terminal	Chèvre, polyclonal IgG	Partie N-Terminale du CD40L Humain, souris, rat		Santa cruz biotechnology
Anti-CD40L C-Terminal	Lapin, polyclonal	Aa 47-261 humain, souris, rat, cheval, bovin, porc		Santa cruz biotechnology
Anti-mouse IgG	Lapin, polyclonal, HRP	IgG de souris		Dako
Anti-goat IgG	Lapin, polyclonal, HRP	IgG de chèvre		Dako
Anti-CD3 bovin	Souris, IgG1	CD3 bovin	MM1A	VMRD, USA
Anti-CD4 bovin	Souris, IgG1	CD4 bovin	CACT138A	VMRD, USA
Anti-CD8 bovin	Souris, IgG1	CD8 bovin	CACT80C	VMRD, USA
Anti-CD14 bovin	Souris, IgG1	CD14 bovin	CAM36A	VMRD, USA
Anti-CD21 bovin	souris IgM	CD21 bovin	BAQ15A	Divbio Science, Hollande
Anti-IgG1	Rat IgG, E-fluor 450	IgG1 de souris	M1-14-D2	eBioscience, USA
Anti-IgGM	Rat IgG2a, APC	IgM de souris	II/41	eBioscience, USA
Isotype IgG1	Souris, IgG1		P3.6.2.8.1	eBioscience, USA
Isotype IgM	Souris, IgM		11E10	eBioscience, USA
Anti-IgG bovin	Souris IgG1, biotine	IgG1 et IgG2 bovins	BG-18	Sigma
Anti-IgG2 bovin	Mouton, polyclonal IgG, biotine	IgG2 bovin		Bethyl laboratories inc
Anti-CD8 bovin A647	Souris, IgG2a	CD8 bovin	CC63	BioRad, Hercules, CA, USA
Anti-CD4 bovin	Souris IgG2a R-Phycoerythrine	CD4 bovin	CC8	

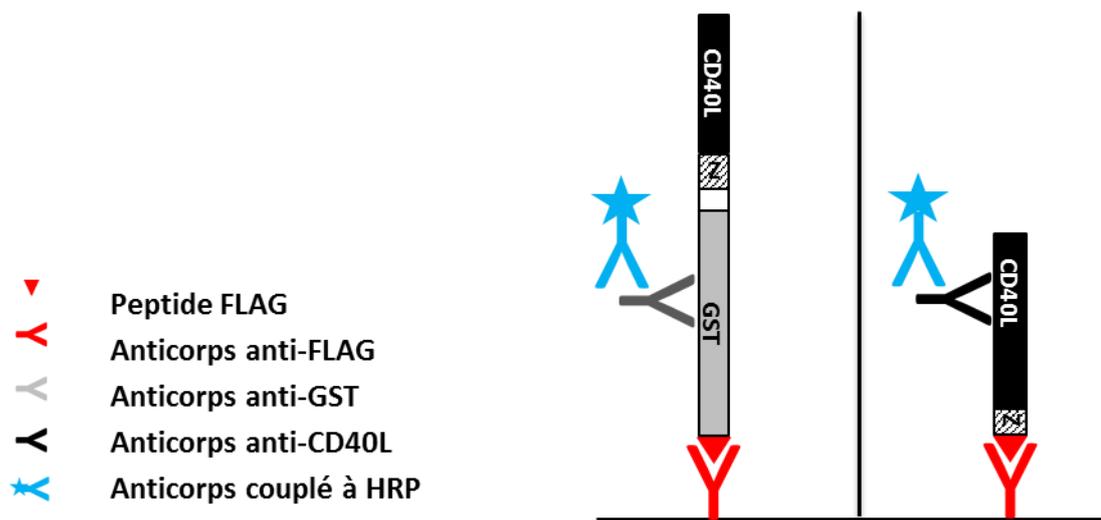


Figure 19: deux variantes de l'ELISA anti-FLAG. Technique pour doser les protéines FLAG-GST-CD40L à gauche et les FLAG-CD40L à droite.

Les plaques sont lavées 5 fois avec du PBS contenant du tween à 0,05% puis les surnageants de Cos-7 transfectées sont incubés pendant 2 h à température ambiante. Les plaques subissent alors un second cycle de lavage puis l'anticorps de détection est incubé pendant 1 h dans du PBS avec du tween à 0,05%. En fonction de la forme protéique censée se trouver dans le surnageant incubé, on utilise un anticorps de détection différent. Soit l'anti-GST comme on peut le voir dans la partie gauche de la figure 19, soit l'anti-CD40L-région médiane (anti-CD40L-rm) si la forme n'est pas couplée au GST, comme cela est montré dans la partie droite de cette figure. L'anti-CD40L-rm est un polyclonal de lapin et a été utilisé à la dilution 1/2000. Les plaques sont lavées 5 fois de plus, incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti rabbit-HRP, lavées à nouveau puis enfin incubées avec le substrat TMB. La lecture de la densité optique se fait à 450 nm juste après avoir stoppé la réaction avec de l'acide sulfurique 2M.

4.3 Electrophorèses

La présence de protéine CD40L, GST ou GST-CD40L dans les échantillons a été vérifiée avec l'analyse par western blot ou la coloration au bleu de coomassie des gels d'électrophorèse. Des doses de 25 à 100 ng de protéines purifiées, 1µg d'extrait protéique total ou 35 à 100 µl de surnageant de cellules Cos-7 ont été utilisées pour les analyses par western blot. Des doses plus grandes (2 à 20 µg de protéines purifiées) ont été utilisées pour les analyses par coloration au bleu de coomassie car la méthode est moins sensible. Deux tampons de charge différents ont été utilisés en fonction des conditions natives (NativePAGE™ Bis-Tris Gel System de Life technologies, Carlsbad, CA, USA) ou dénaturantes de l'électrophorèse réalisée. Le tampon de charge pour l'électrophorèse dénaturante contenait 10 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1% de SDS, 25% de glycérol, 0,1 mM de β-mercapthoethanol et 0,03% de bleu de bromophénol. La composition exacte du tampon de charge pour l'électrophorèse native est gardée secrète par la firme mais contient cependant un tampon tris à pH 7,2, du NaCl, du glycérol et du rouge ponceau. Les gels utilisés étaient soit composés de polyacrylamide à 14% dans l'électrophorèse dénaturante et d'un gradient de 4% à 16% pour la technique native. Les tampons de migration utilisés étaient le classique Tris-Glycine-SDS pour l'électrophorèse dénaturante et les tampons spécifiques du kit *Native PAGE* pour l'électrophorèse native. Après la migration, le procédé est identique pour les 2 techniques : électrotransfert sur membranes polyvinylidene difluoride (GE healthcare), blocage 1 h dans du lait 10% et tween 0,05%, incubation 16 h à 4°C avec les anticorps primaires, lavages avec TBS-tween 0,05% et incubation 2 h à température ambiante avec les anticorps secondaires. Les membranes ont ensuite été lavées dans le TBS-tween 0,05 % puis révélées par chimiluminescence (ECL kit; Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Netherlands) et film auto radiographiques (Fuji x-ray). Les anticorps primaires les plus utilisés au cours du projet étaient l'anti-GST et l'anti-

CD40L-rm. L'anticorps secondaire était alors l'anti-rabbit HRP. Un anticorps primaire anti-His et l'anti-FLAG décrit précédemment ont également été utilisés. Nous devons signaler que 2 autres anticorps anti-CD40L ont parfois été utilisés au cours du travail et ont servi à vérifier la spécificité des résultats obtenus avec l'anti-CD40L-rm de chez Aviva systems. Il s'agit de l'anti-CD40L N-terminal et de l'anti-CD40L C-terminal qui réagissent tous 2 avec les CD40L humains et bovins. Pour ces isotypes, les anticorps de détection utilisés étaient l'anti-mouse IgG et l'anti-goat IgG.

4.4 Test de la capacité de liaison du GST-CD40L à son récepteur

Nous avons voulu vérifier si la protéine de fusion produite en bactérie liait correctement le récepteur CD40 bovin. Pour cela, nous avons transfecté des cellules Cos-7 avec des plasmides pcDNA3.1⁺ codant pour le récepteur CD40 bovin (Wallemacq *et al*, 2012) ou avec un pcDNA3.1⁺ vide. Ces cellules transfectées ont alors été re-suspendues et lavées dans du milieu FACS (PBS pH 7,4 ; 0,5% BSA), puis incubées pendant 90 minutes à 4°C avec soit la protéine contrôle GST purifiée soit la protéine de fusion GST-CD40L purifiée. Les cellules ont été lavées une seconde fois dans le milieu FACS et incubées 75 minutes à 4°C avec les anticorps anti-GST. Après un 3^e lavage, une incubation d'1 h avec l'anticorps secondaire anti rabbit PE (Goat IgG, Imagenex, San Diego, USA) a été réalisée. Les cellules ont été lavées une dernière fois et analysées par cytométrie en flux (FACS Canto II, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgique).

4.5 Tests fonctionnels

Pour évaluer la capacité des CD40L produits à activer les cellules bovines, nous avons réalisé 2 tests différents.

4.5.1 Test d'activation des cellules aortiques bovines

Ce test est basé sur le fait que l'activation du récepteur CD40 à la surface des cellules endothéliales induit la production de la chimiokine MCP-1 (Thienel *et al*, 1999). Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 0,1% glucose et supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 1 ng/ml de facteur de croissance des fibroblastes (*rFGF, basic, human G507* ; Promega, Madison, WI, USA) et 10% de sérum fœtal bovin. Les cellules ont été réparties en plaques 48 puits et cultivées jusqu'à confluence totale. Elles ont alors été stimulées avec de l'interféron (IFN)- γ bovin à la concentration finale de 10 ng/ml pour augmenter l'expression du récepteur CD40. Vingt heures plus tard, les cellules ont été stimulées avec plusieurs doses de protéine GST ou de protéine de fusion GST-CD40L. Les cellules ont également

été stimulées avec les CD40L commerciaux humains (Santa Cruz) ou de souris (Peprotech). D'autres contrôles tels les protéines bouillies ou le LPS ont également été utilisés pour la stimulation. Les surnageants de culture ont enfin été récoltés après 18 à 24 h d'incubation et testés pour la production de MCP-1 par ELISA en suivant les instructions du kit (Kingfisher Biotech, St Paul, USA).

4.5.2 Test d'induction de la prolifération et de l'agrégation des lymphocytes B bovins

Le test est basé sur l'activation par le CD40L de lymphocytes B cultivés en présence d'IL-4 (R&D systems, Abingdon, United Kingdom). Les lymphocytes B ont été isolés à partir de cellules mononucléées périphériques sanguines (PBMC) obtenues par centrifugation de sang bovin complet EDTA sur gradient de densité (Histopaque 1077, Sigma, Diegem, Belgium). Les PBMC ont été marqués avec des anti-CD3 bovins, anti-CD4 bovins, anti-CD8 bovins anti-CD14 bovins et anti-CD21 bovins (tableau V) Les anticorps secondaires utilisés étaient un anti-IgG1 de souris et un anti-IgM de souris. Des isotypes IgG1 de souris et IgM de souris ont été utilisés comme contrôle négatif. Les cellules positives pour CD21 seulement (lymphocytes B) ont été purifiées grâce au trieur de cellules (FACS AriaIII, Becton Dickinson). La population obtenue était composée de plus de 99 % de cellules CD21 positives et CD3 négatives en cytométrie de flux (FACS Canto II, Becton Dickinson). Les cellules B ont ensuite été cultivées dans du milieu RPMI complétementé avec 10% de FBS inactivé par la chaleur, 50 UI /ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine en atmosphère humide à 37 °C avec 5% de CO₂. Chaque puits de plaque 96 puits contenant 200 000 lymphocytes B a été stimulé avec différentes doses de LPS, de protéines GST ou GST-CD40L purifiées ou des surnageants de cellules Cos-7 transfectées avec des plasmides codant pour le CD40L ou des plasmides contrôles, pendant 72 h. Des stimulations avec les CD40L commerciaux précédemment cités ont également été réalisées. Les cellules ont enfin été cultivées 18 h supplémentaires en présence de 0,2 µCi de thymidine tritiée (Perkin Elmer, Zaventem, Belgium), puis récoltées afin de mesurer l'incorporation de tritium avec un compteur β (Topcount, Perkin Elmer). L'agrégation des lymphocytes stimulés a également été observée au microscope optique (grossissement 40X).

CHAPITRE 2 : TEST DE L'ACTIVITE DE LA PROTEINE DE FUSION GST-CD40L *IN VIVO* CHEZ LE BOVIN

1 Génisses

Huit génisses Holstein non gestantes de 15 mois ont été sélectionnées (dans le cheptel de la ferme provinciale de Theux en Belgique) après examen clinique rigoureux et vérification de leur statut immunitaire et inflammatoire. La numération-formule sanguine, l'électrophorèse des protéines sériques, le dosage de l'haptoglobine, de l'albumine, des protéines totales et du fibrinogène ont été réalisés de manière systématique. Les animaux n'avaient pas de passé infectieux et n'avaient reçu aucun traitement durant les 6 mois précédant l'expérience. Après un mois d'acclimatation à la ferme expérimentale de la faculté de médecine vétérinaire de Liège, les animaux ont commencé le protocole expérimental avec l'accord du comité d'éthique de l'université.

2 Composition du vaccin

Le vaccin utilisé était composé d'antigènes de *Staphylococcus aureus* tués et de protéines recombinantes (GST ou GST-CD40L) servant d'adjuvant. La souche Newbould 305 (*American type culture collection 29740*) a été inactivée par la chaleur (75 minutes à 60°C) pour préparer l'antigène HKSA. L'inactivation complète de la bactérie a été vérifiée par incubation de 100µl de culture à 37 °C pendant une nuit. Deux formules vaccinales différentes ont été utilisées. Les descriptions qui suivent correspondent à une dose. La solution mère d'adjuvant était composée de 0,4 mg de GST-CD40L par ml, dans le tampon d'éluion (150 mM de NaCl, 20 mM de Tris, pH 8,6, mais sans Triton X-114). La première formule (F1) comprenait 2.10^{10} CFU de HKSA associé à 25 mg d'adjuvant, le tout re-suspendu dans 62 ml de tampon. L'adjuvant pouvait être soit la protéine de fusion GST-CD40L ce qui donnait la formule F1-CD40L, soit la protéine contrôle GST ce qui donnait la formule F1-GST. La seconde formule (F2) contenait 7.10^9 CFU de HKSA et 1% d'albumine bovine associé à 7 mg de protéine GST-CD40L (= F2-CD40L) ou de GST seule (= F2-GST) dans un volume de 70 ml de PBS (en fait 17 ml de tampon d'éluion et 53 ml de PBS).

3 Modélisation du comportement potentiel du GST-CD40L après injection

Un échantillon du pool de GST-CD40L, de concentration 0,4 mg/ml et de pH 8,6, prêt à être incorporé au mélange vaccinal a été divisé en 3 aliquots (A, B et C) avant de subir plusieurs modifications expérimentales (figure 20). Le premier aliquot (A) a été divisé une nouvelle fois en 3 aliquots (A1, A2 et A3). Le second aliquot (B) a été dilué 4 fois dans du PBS puis divisé en 3 aliquots (B1, B2 et B3). Le 3^e aliquot (C) a été dilué 4 fois dans du PBS contenant 1% de BSA puis divisés en 3 aliquots (C1, C2 et C3). Ensuite, A1, B1 et C1 ont été maintenu à pH 8,6 ; A2, B2 et C2 ont été mis à pH 7,4 et A3, B3 et C3 à pH 5,6. Les aliquots ont ensuite été lavés par 3 centrifugations à 13 000 g pour retirer d'éventuels résidus de BSA ou de GST-CD40L non précipités puis le liquide de lavage résiduel retiré par évaporation. Les culots ont alors été re-suspendu dans un même volume de SDS 2% et dosé par la méthode de Lowry.

4 Protocole d'immunisation

Les animaux ont été divisés en 3 groupes. Le groupe A composé d'une seule génisse est le contrôle négatif général de l'expérience et ne reçoit aucune injection. Dans le groupe B composé de 4 génisses, les animaux reçoivent la formule F1. Deux génisses reçoivent F1-GST dans les 2 flancs (injection sous-cutanée près du nœud lymphatique précrural) et l'autre F1-CD40L, toujours dans les 2 flancs. Dans le groupe C, composé de 3 génisses, F2-GST est injectée dans le flanc droit alors que F2-CD40L est injectée dans le flanc gauche. Une modification importante de la technique et du timing d'injection a eu lieu entre l'expérience menée sur le groupe B et celle menée sur le groupe C. Comme expliqué précédemment, la composition du vaccin a également changé entre le groupe B qui a reçu la formule 1 et le groupe C qui a reçu la formule 2. Nous avons présenté les 2 protocoles sur la figure 21. Ainsi, pour le groupe B, lors de la 1^{ère}, de la 4^e et de la 7^e semaine, 2 génisses ont reçu, à gauche et à droite, une seule injection avec F1-GST. Les 2 autres génisses ont reçu, à gauche et à droite, une seule injection avec F1-CD40L. Pour le groupe C par contre, les génisses n'ont été immunisées que lors de 2 périodes pendant la 1^{ère} et la 4^e semaine mais ont été injectées durant 3 jours consécutifs. Dans ce groupe, à chaque injection, le côté droit recevait F2-GST et le côté gauche recevait F2-CD40L.

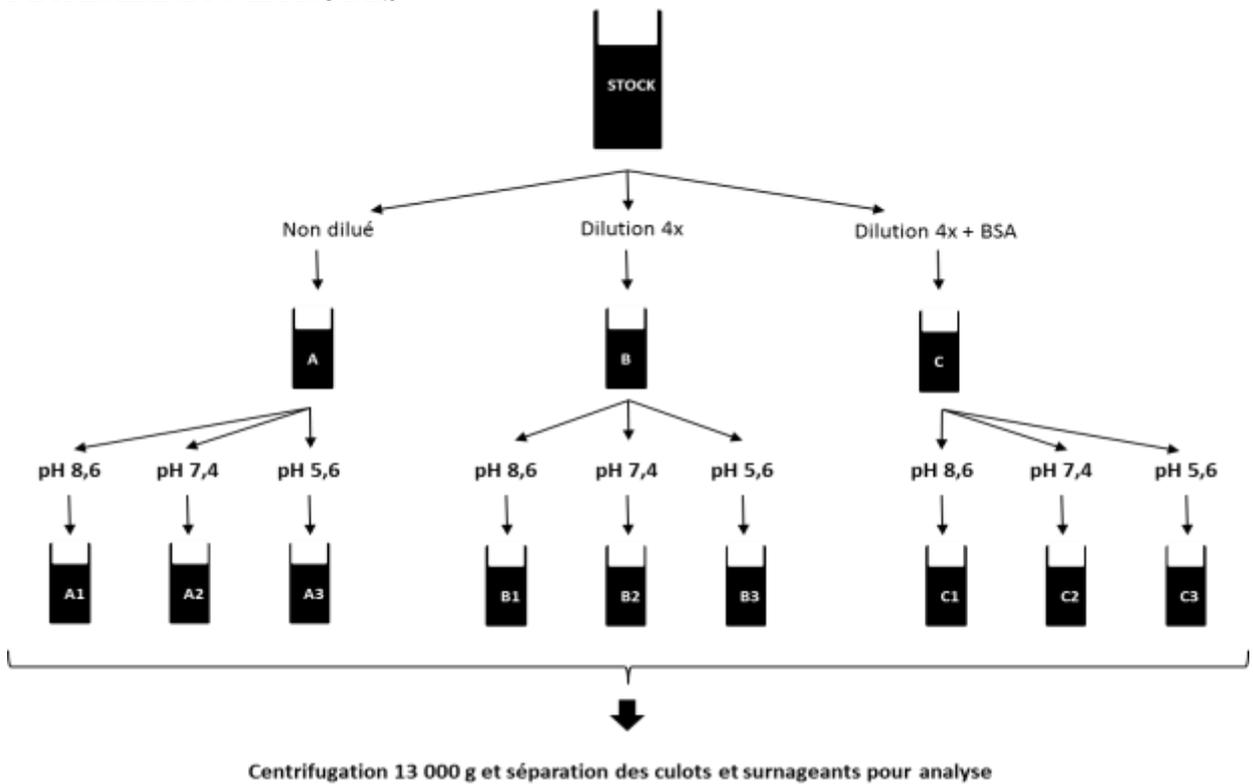
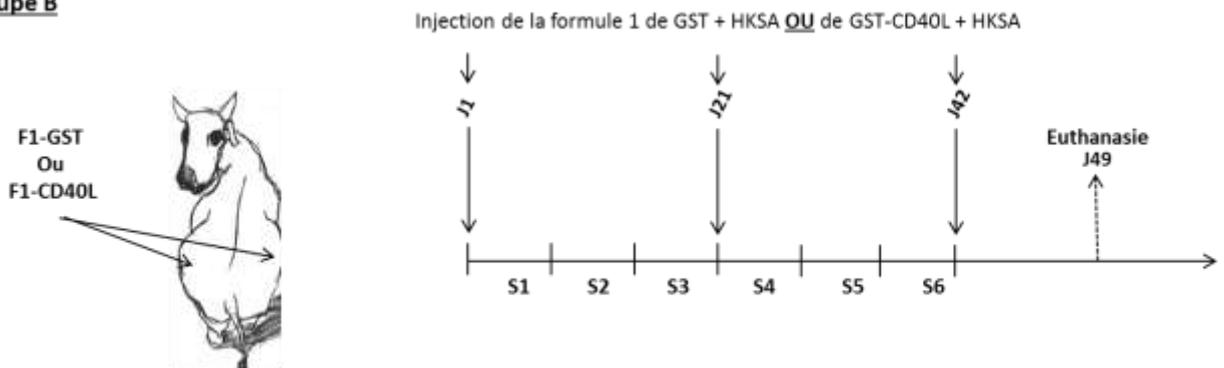


Figure 20: Evaluation de l'effet de la dilution, du pH et de la présence d'albumine bovine sur la solubilité du GST-CD40L après purification.

Groupe B



Groupe C

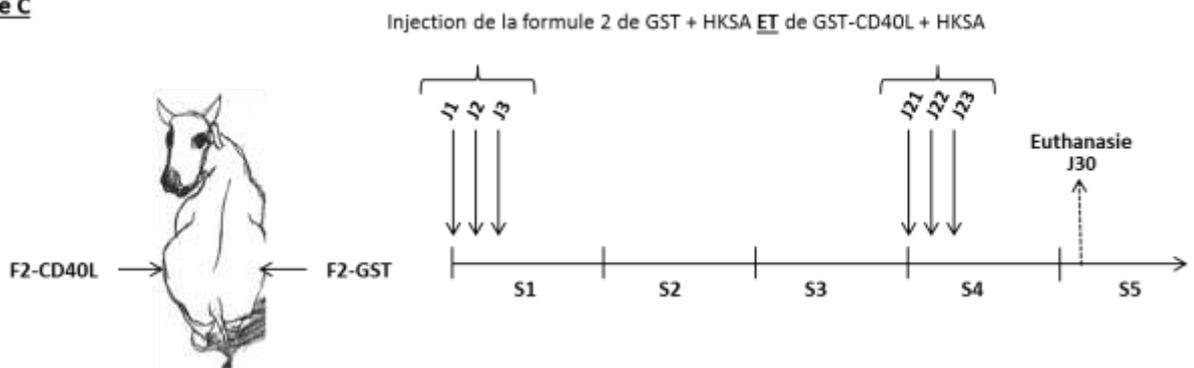


Figure 21: Résumé des 2 protocoles d'immunisation des génisses. En haut, protocole réalisé pour les 4 génisses du groupe B et en bas pour les 3 génisses du groupe C. Chaque flèche verticale continue représente une injection sous-cutanée dans les 2 flancs de chaque génisse.

Sept jours après la dernière injection, les génisses ont été sacrifiées, les nœuds lymphatiques précuraux (NLPC) et préscapulaires (NLPS) récoltés et pesés.

5 Evaluation de la réponse humorale contre HKSA

Afin d'observer la réponse systémique induite par nos immunisations, nous avons mis au point un test ELISA pour vérifier l'augmentation des IgG et IgG2 spécifiques de HKSA dans le sérum des génisses au cours de l'expérience. Nous avons coâté des plaques 96 puits avec 100 µl de PBS contenant 3.10^8 CFU HKSA/ml pendant 24 h à 4°C. La concentration en HKSA a été choisie sur base de protocoles de la littérature (Leitner *et al.*, 2003 ; Camussone *et al.*, 2012) et des résultats d'une mise au point préalable. Les plaques ont ensuite été lavées 5 fois dans du PBS et tween 0,1% puis bloquées avec du PBS, tween 0,1% et BSA 0,5% pendant 2 h à 37°C. Après une nouvelle étape de lavage, les séra des génisses (dilutions 1/1000, 1/5000 et 1/20000) ont été incubés pendant 2 h à 37°C. Les plaques ont ensuite été lavées puis incubées 2 h à 37 °C avec les anticorps de détection anti-IgG bovins (dilution 1/25000) ou anti-IgG2 bovins (dilution 1/50000) couplés à la biotine. Une autre étape de lavage suivie d'une incubation d'une 1 h à 37°C avec de la streptavidine HRP (dilution 1/5000, Sigma) a alors été réalisée. Les plaques ont enfin subi un dernier lavage plus poussé (10 x) puis ont été incubées avec le substrat TMB pendant 5 minutes. La réaction a alors été bloquée et la lecture de la DO réalisée à 450 nm. Une plaque coâtée avec une solution d'*E.coli* lysées et de concentration protéique identique à celle de la solution 3.10^8 CFU/ml de HKSA a été utilisée comme contrôle de spécificité de l'expérience. D'autres contrôles négatifs tels que puits non coâtés, sans sérum ou sans anticorps de détection ont également été réalisés.

6 Re-stimulation *in vitro* des cellules des bovins immunisés

Les ganglions lymphatiques ont été coupés en tranches de 5 mm d'épaisseur puis broyés stérilement. Les cellules ont été filtrées sur un filtre de 70µm, centrifugées 15 minutes à 850 g à 4°C et re-suspendues dans du milieu RPMI (Lonza) contenant 10% FBS, 50 UI/ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine. Les cellules de chaque ganglion ont été comptées 3 fois sur cellule

de Thoma puis diluées pour fournir une solution mère à 2.10^6 cellules par ml. Elles ont été cultivées *in vitro* en plaques 96 puits à raison de 200 000 cellules par puits et stimulées de 2 manières. La première est une stimulation avec 5.10^6 CFU HKSA/ml (Lawrence *et al.*, 2012). Le contrôle négatif a reçu 100µl de RPMI seul. La seconde est aspécifique : les puits ont été préalablement coatés avec 10 µg/ml d'anti-CD3 bovins ou un isotype contrôle. Dans les 2 cas, la stimulation a été suivie d'une culture à 37°C pendant 72 h. Le surnageant a ensuite été réduit à 60µl/puits et de la thymidine tritiée a été ajoutée (0,2 µCi/puits) pour 18 h de culture supplémentaire. L'incorporation de tritium a enfin été mesurée à la fin de cette incubation avec un compteur β (Topcount, Perkin Elmer) afin d'évaluer la prolifération *in vitro* des cellules des ganglions récoltés.

7 Numération et isolement des lymphocytes TCD8⁺ et TCD4⁺ des bovins immunisés

Une partie des cellules ganglionnaires récoltées et re-suspendues comme décrit ci-dessus a été lavée dans du milieu FACS (PBS, 0,5% BSA, 0,1% sodium azide) puis incubée 40 minutes avec des anticorps anti-CD8-alexa 647 et anti-CD4 RPE. Les cellules ont été lavées une seconde fois dans du milieu FACS puis re-suspendues dans ce même milieu à la concentration de 10^7 cellules/ml. Les LTCD4⁺ et LTCD8⁺ ont alors été triés stérilement sur l'analyseur trieur de la plateforme de cytométrie du GIGA (ARIA III, Becton Dickinson). Les LTCD4⁺ et les LTCD8⁺ isolés ont alors été remis en culture dans des puits coatés avec des anticorps anti-CD3 ou l'isotype IgG1, à 37°C pendant 72 h.

8 Mesure de la prolifération *in vitro* des lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺

Cinquante millions de cellules des NLPC droits et gauches de chaque génisse ont été marqués avec la carboxyfluoresceine succinimidyl ester (CFSE). Les cellules ont d'abord été lavées 2 fois dans du PBS et re-suspendues à 50.10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 sans FBS à 37°C. Le CFSE re-suspendu dans du DMSO a été dilué dans du RPMI à 37°C jusqu'à la concentration de 50 µM

puis dilué 10 fois dans la solution de cellules. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 10 min à 37 °C en les agitant régulièrement. Le marquage a alors été arrêté en diluant les cellules dans du milieu contenant 10 % de FBS. Les cellules ont enfin été lavées 2 x dans du PBS puis remises en culture dans du milieu RPMI-pénicilline-FBS classique et stimulées avec HKSA. Après 4 jours de culture, les cellules ont été récoltées, lavées avec le milieu FACS puis marquées avec les anticorps anti-CD4 bovins (A647, MCA1653, BioRad) ou anti-CD8 bovins (A 647, MCA837, BioRad). Les cellules ont ensuite été analysées sur le Canto II.

9 Protocole du test de protection vaccinale

Douze vaches en première lactation ont été sélectionnées. Elles ont été choisies afin de débiter le protocole dans la période du 4^e au 7^e mois de lactation. Les animaux ont été immunisés ou non durant la première phase de l'expérience puis ont subi une infection expérimentale de la mamelle avec la souche bactérienne Newbould 305 (ATCC 29740). L'immunisation a été réalisée via des injections sous cutanées de HKSA et d'adjuvant contrôle GST ou adjuvant actif GST-CD40L près d'un NLPC. La formule vaccinale correspond à la formule F2 décrite précédemment. Les doses restent également inchangées. Les injections de F2 ont été réalisées les jours 0, 1, 2, 21, 22, 23, 42, 43 et 44. Chaque quartier a subi 2 inoculations de 400 CFU dilués dans 10 ml de sérum physiologique via le canal du trayon. Les inoculations ont eu lieu après la traite du matin, les jours 64 et 65 suivant la première immunisation. La charge bactérienne ainsi que le nombre de cellules somatiques du lait de chaque quartier ont été mesurés par le comité du lait (Battice, BELGIQUE) aux jours -7, 32, 64, 65, 66, 67, 69, 71, 73, 75, 82, 89, 95. Une évaluation des éventuels signes de mammite clinique tels la fièvre et l'inflammation locale de la mamelle a été réalisée 2 fois par jour durant la période des 10 jours suivant le challenge bactérien. Les 12 animaux ont été séparés en 3 lots équitables. Le lot 1 a subi le challenge bactérien sans immunisation préalable. Le lot 2 a reçu 3 immunisations avec HKSA et l'adjuvant contrôle GST avant le challenge. Le lot 3, enfin, a été immunisé 3 fois avec HKSA et GST-CD40L avant le challenge bactérien.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 1 : CLONAGE DU CD40L BOVIN EN BACTERIES

1 Clonage du CD40L

1.1 Production de la protéine

Les CD40L ont été produits par culture de bactéries BL21 transformées comme décrit dans le matériel et méthodes. La figure 22 A montre la production de 4 formes de CD40L mise en évidence par western blot et permet la comparaison de leurs tailles respectives réelles et théoriques. Il s'agit des formes couplées au *Tag* His clonées en pDEST 17 et leur tailles théoriques sont 32,8 kDa pour ZL-CD40L, 28,6 kDa pour L-CD40L, 24,8 kDa pour ZC-CD40L et 20,5 kDa pour C-CD40L.

1.2 Purification

1.2.1 Solubilité limitée aux tampons dénaturants

1.2.1.1 Extraction

Nous avons d'abord tenté de solubiliser la protéine contenue dans les culots de *E. coli* dans des tampons non dénaturants afin de conserver son activité biologique. C'est l'étape d'extraction. Cette extraction non dénaturante ou « native » a été réalisée en utilisant le lysozyme de blanc d'œuf dans une solution saline hypertonique telle que détaillée dans le matériel et méthodes. Après différentes incubations et actions physiques sur le mélange de culot bactérien et de tampon d'extraction, celui-ci a été centrifugé. Culot et surnageant ont alors été analysés. Parallèlement, une extraction dénaturante utilisant de la guanidine 6 M a été réalisée sur les culots bactériens. La figure 22 B montre l'analyse par western blot de ces produits d'extraction native et dénaturante.

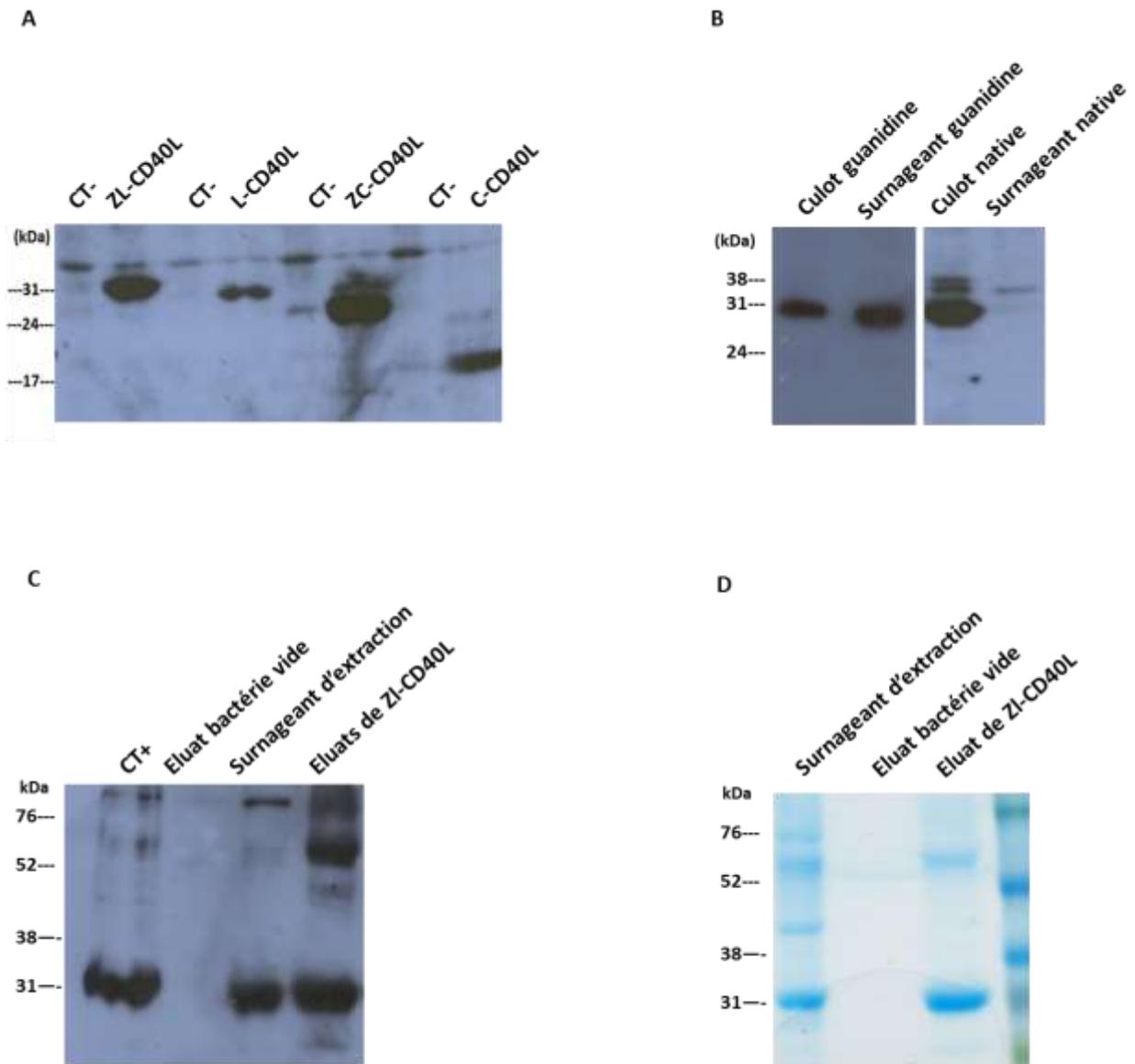


Figure 22: Analyses par Western blot anti-HIS et coloration de coomassie des SDS PAGE de production, extraction et purification de CD40L. Figure A: Western blot, après 4 h de production, des culots des *E. coli* BL21 transformées avec les CD40L clonés en pDEST 17. De gauche à droite, la forme longue avec isoleucine puis sans isoleucine, puis même chose pour les formes courtes. Les contrôles négatifs (CT-) sont les cultures non induites par l'arabinose. Figure B: Western blot sur culots et surnageants d'extractions dénaturantes et natives de ZL-CD40L. De gauche à droite, les échantillons testés sont le culot de l'extraction dans le tampon dénaturant avec guanidine 6M, le surnageant de cette même extraction, le culot de l'extraction dans le tampon non dénaturant avec lysozyme et le surnageant de cette extraction. Figure C: Western blot de la purification sur colonne anti-HIS. De gauche à droite, les échantillons testés sont un contrôle positif contenant du ZL-CD40L, l'éluat issu d'une purification d'extrait de bactéries non transformées (vides), le surnageant d'extraction de ZL-CD40L avant purification, l'éluat de ZL-CD40L après purification. Figure D: Coloration en bleu de coomassie comparant les protéines présentes dans les surnageants d'extraction et éluats de purification de la figure C.

On remarque que le seul surnageant contenant la protéine CD40L est celui de l'extraction dénaturante. Dans l'extraction native en effet, la totalité de la protéine CD40L est restée dans le culot.

1.2.1.2 Purification

Dans un premier temps, nous avons purifié la protéine solubilisée c'est-à-dire celle extraite dans le tampon dénaturant sur des colonnes retenant le *tag* His. Le protocole est celui détaillé dans le matériel et méthodes et utilise un tampon à base d'urée 8 M ainsi qu'une élution des protéines par acidification de la colonne. La présence spécifique de protéine CD40L dans l'élution est confirmée par la figure 22 C. On voit sur ce gel de western blot une large bande aux alentours de 32 kDa, soit la taille théorique de la forme ZL-CD40L, qui ne se retrouve pas dans le produit de purification issu de bactéries vides c'est-à-dire non transformées avec le plasmide codant pour CD40L. On remarque de plus que cette bande est semblable à celle retrouvée dans le surnageant d'extraction de ZL-CD40L avant purification ainsi qu'à celle du contrôle positif. On remarque également la présence d'une bande de plus haut poids moléculaire (autour de 60-70 kDa) principalement dans l'échantillon purifié. La figure 22 D montre le gel d'électrophorèse des mêmes échantillons, coloré au bleu de coomassie. On remarque que l'échantillon purifié c'est-à-dire l'éluat de ZL-CD40L contient seulement 2 bandes principales par rapport aux multiples bandes de l'échantillon non purifié ce qui montre une bonne efficacité de purification. Dans les figures 22 C et 22 D, la présence de la bande de plus haut poids moléculaire (autour de 60-70 kDa) en plus de la bande correspondant à la taille du ZC-CD40L dans les échantillons purifiés et son absence dans l'échantillon issu de bactéries vides fait penser à la présence d'un dimère de ZL-CD40L.

1.2.2 Tentatives pour obtenir une protéine à la fois native et soluble

La solubilisation du CD40L à partir des culots bactériens n'a été possible qu'en utilisant des tampons d'extraction dénaturants. Cela pose 2 problèmes majeurs : l'inactivation du CD40L potentiellement dénaturé et l'impossibilité d'utiliser un tampon agressif *in vivo*. Une solubilisation dans un tampon ne dénaturant pas les protéines est donc obligatoire pour continuer le projet.

Pour y parvenir nous avons essayé les techniques de purification mixte, dialyse et sécrétion dans le périplasme décrites précédemment.

1.2.2.1 Purification mixte

La première de ces techniques, a été de commencer la purification avec le tampon dénaturant (guanidine puis urée) mais de remplacer progressivement l'urée par une solution saline. On a appelé cette technique « mixte » car 2 tampons de classes différentes étaient utilisés. De plus, l'élution s'est faite alors à pH physiologique en utilisant de l'imidazole. Cependant, comme le montre la figure 23 A, aucune des protéines ZL-CD40L initialement présentes dans le surnageant d'extraction ne s'est retrouvée dans l'élution. Les protéines ont précipité dans la colonne de purification dès que le tampon urée 8 M a été remplacé. Les 3 autres formes de CD40L ont également été soumises, sans succès, à cette technique de purification (données non montrées).

1.2.2.2 Dialyse

Puisque renaturer la protéine dans la colonne pendant le processus de purification s'est avéré impossible, nous avons tenté de le faire après purification dénaturante (Urée 8 M), par dialyse dans des tampons non dénaturants. La figure 23 B montre l'analyse par western blot des culots et surnageants issus de la centrifugation après dialyse de l'échantillon purifié de ZL-CD40L. On remarque que la totalité du CD40L précipite et se retrouve dans le culot lorsqu'on dialyse contre du NaCl 1M. Pour la dialyse contre du glucose 3 M par contre, une partie du ZL-CD40L semble rester soluble dans le surnageant. On y retrouve en effet la bande correspondant à la taille attendue du ZL-CD40L autour de 33 kDa ainsi qu'une bande d'environ 65 kDa pouvant correspondre à un dimère. Cependant, cette solution a dû être abandonnée car le glucose 3 M avait tendance à cristalliser et le ligand finissait alors par précipiter totalement après 3 jours. La renaturation des 3 autres formes de CD40L par dialyse a également été tentée mais sans succès.

1.2.2.3 Sécrétion dans le périplasme

Nous avons cloné les formes L-CD40L et ZL-CD40L dans le plasmide pBAD d'Invitrogen, censé favoriser la sécrétion des protéines recombinantes dans le périplasme. Malheureusement, comme le montre l'analyse par western blot (Figure 23 C) des extraits effectués par choc osmotique sur les productions de L-CD40 et de calmoduline, le L-CD40L n'a pas été solubilisé et ne se retrouve que dans le culot d'extraction. La calmoduline a par contre bien été sécrétée ce qui atteste de la réussite technique de l'expérience. L'échec de la sécrétion du CD40L dans le périplasme peut alors s'expliquer de 2 manières : soit l'absence de sécrétion dans le périplasme, soit la présence de CD40L accumulé dans ce compartiment sous une forme insoluble. La plus petite forme C-

CD40L qui devrait logiquement être transportée plus facilement a également été testée par la suite mais s'est comportée de la même façon (données non montrées).

1.2.3 Retrait du *tag* HIS et test de la solubilité du CD40L humain

Nous avons vérifié si l'insolubilité pouvait éventuellement être causée par le *tag* His car dans l'article de référence (Mazzei *et al.*, 1995), il n'y avait pas ce *tag*. Les CD40L ont donc été clonés dans le plasmide d'expression pDEST 14 selon la technique détaillée dans le matériel et méthodes pour le pDEST 17. Une fois de plus, le ligand est resté insoluble dans les tampons non dénaturants (données non montrées). Le CD40L bovin cloné se montrant totalement insoluble, nous avons décidé de produire et de purifier le CD40L humain pour comprendre si le problème venait de notre technique ou si l'insolubilité était intrinsèque aux formes de CD40L bovin choisies. Se référant à l'article de Mazzei et collaborateurs de 1995, nous avons alors cloné la forme extracellulaire courte du CD40L humain (correspondant au C-CD40L bovin) et avons réalisé l'extraction en conditions non dénaturantes. La figure 23 D montre que le C-CD40L humain, bien produit dans le culot de lyse bactérienne comme le montre la bande spécifique de 18 kDa, n'a pas pu être solubilisé par cette technique.

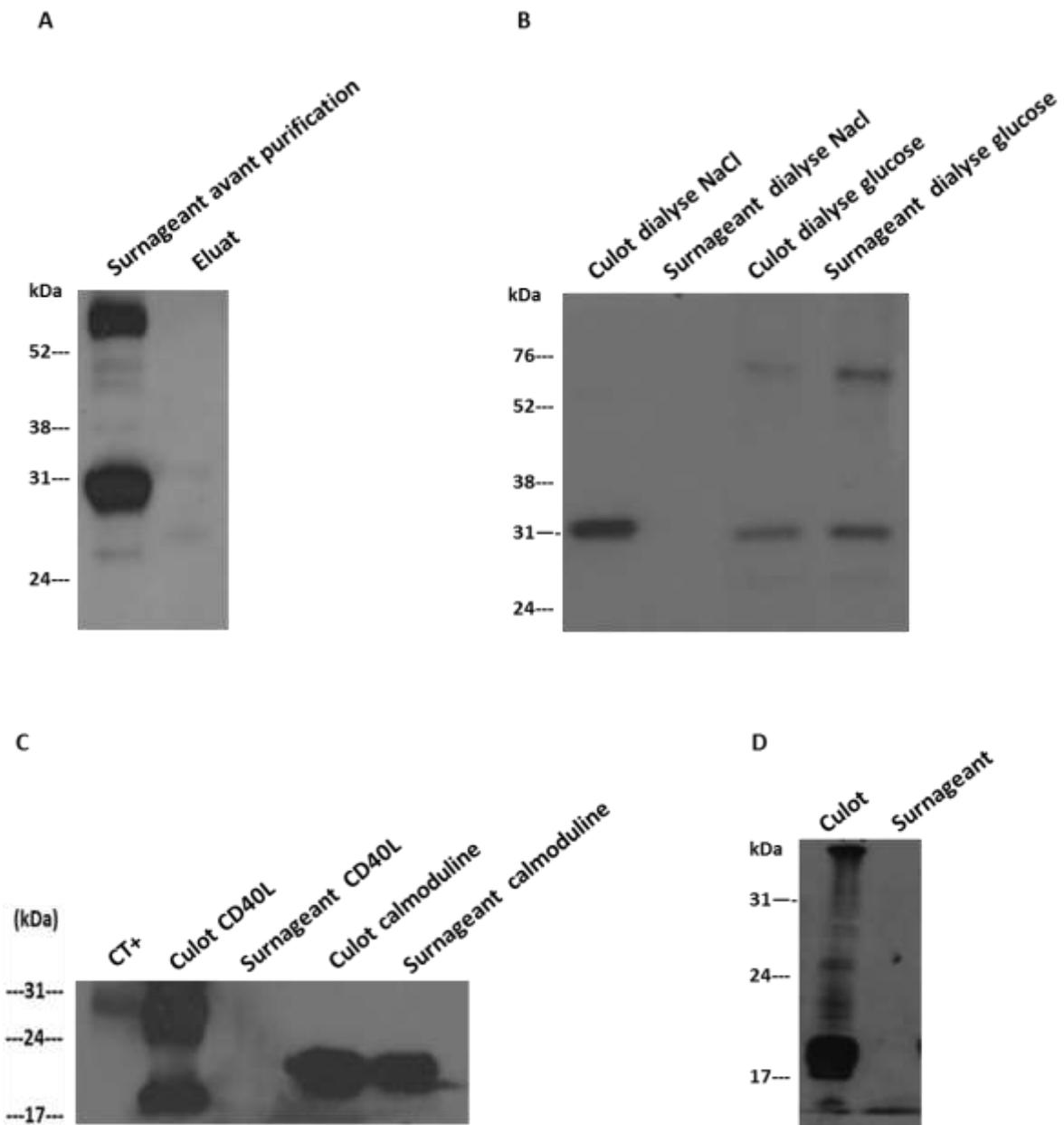


Figure 23: Analyse par western blot des essais de production de CD40L natifs et solubles. Figure A: Western blot anti-His d'échantillons de 2 étapes de la purification mixte. De gauche à droite, surnageant de l'extraction avec guanidine et éluat de la colonne anti-his utilisée en condition mixte (lavages et élution dans un tampon non dénaturant). Figure B: Western blot anti-HIS des éluats de colonne His-tag dialysés de ZL-CD40. De gauche à droite, culot de dialyse dans le NaCl 1M, surnageant de dialyse dans le NaCl 1M, culot de dialyse dans du glucose 3M, surnageant de dialyse dans du glucose 3M. Figure C: Western blot anti-His des productions à partir de plasmide pBAD. De gauche à droite, échantillon contrôle positif, culot d'extraction du L-CD40L, surnageant d'extraction par choc osmotique du L-CD40L, culot d'extraction de calmoduline, surnageant d'extraction par choc osmotique de calmoduline. Figure D: Analyse par western blot anti-CD40L-rm des culots et surnageants d'extraction native du C-CD40L humain produit en pDEST 14.

2 Clonage d'une protéine de fusion GST-CD40L

Toutes les techniques de solubilisation des CD40L ayant échoué, nous avons décidé de modifier très fortement la structure de la protéine. Nous voulions produire une protéine très différente tout en gardant l'activité fonctionnelle potentielle du CD40L. Pour cela, nous avons conservé la séquence normale du CD40L, mais l'avons fusionné à une protéine légèrement plus grosse et bien plus soluble : la Glutathion-S-transférase (GST) de *Shistosoma japonicum*. Les 4 formes de CD40L précédemment testées ont donc été couplées à cette protéine GST. Les formes non couplées ont été abandonnées.

2.1 Production et extraction de la protéine

2.1.1 Production

La production de la protéine de fusion a été réalisée comme décrit dans le matériel et méthodes et vérifiée par western blot (données non montrées) après traitement au SDS des culots bactériens totaux.

2.1.2 Extraction

2.1.2.1 Succès de l'extraction native

L'extraction au moyen du tampon de lyse non dénaturant du kit probound de chez Invitrogen a été réalisée avec succès comme le montre l'analyse en western blot de la figure 24 A. On retrouve en effet les 4 formes de ligands couplés à la GST dans les surnageants d'extraction non dénaturante comme expliqué dans le matériel et méthodes. En effet, les bandes observées correspondent aux tailles théoriques attendues soit 49,9 kDa pour GST-ZC-CD40L, 53,6 kDa pour GST-L-CD40L, 45,6 kDa pour GST-C-CD40L et 57,9 kDa pour GST-ZL-CD40L. De plus, aucune de ces bandes n'apparaît dans l'extrait issu de bactéries vides ce qui confirme que les 4 bandes décrites ci-dessus correspondent à des protéines de fusion GST-CD40L. Enfin, si les 4 protéines ont bien été solubilisées, une des 4 formes a cependant été extraite plus efficacement que les autres : il s'agit de la forme courte avec motif d'isoleucine (GST-ZC-CD40L). Cette particularité a été vérifiée lors de 2 nouvelles extractions (non montrées). Nous avons donc choisi de travailler en priorité sur cette forme, d'autant plus que la littérature donnait, en moyenne, une efficacité égale aux formes solubles courtes et longues de CD40L, et que le motif de trimérisation y était largement plébiscité (Mazzei *et al.*, 1995; Vonderheide *et al.*, 2001, Stone *et al.*, 2006).

2.1.2.2 Mise au point d'un protocole de production-extraction sur mesure

Grâce à la présence de GST, la protéine a bien été solubilisée dans un tampon de lyse non dénaturant. Cependant, la quantité de GST-CD40L soluble dans le surnageant était très faible par rapport à celle restant insoluble dans le culot d'extraction comme le montre la figure 24 B. On voit sur cette coloration au bleu de coomassie des produits d'extractions natives de GST-ZC-CD40L et de GST-C-CD40L que la protéine de fusion représentait la majorité des protéines totales du culot (très grosse bande à la taille attendue). Au contraire, dans les surnageants, la bande correspondant aux protéines de fusion n'était même pas visible parmi les autres bandes de protéines. La majorité des protéines produites restait donc inutilisable. Un nouveau protocole d'extraction a alors été mis au point en modifiant systématiquement un paramètre du protocole à chaque nouvelle extraction et en évaluant son effet sur le rendement. Nous ne reprendrons pas ici l'ensemble des paramètres testés mais seulement les 2 plus importants. Le premier paramètre appartient à la phase de production qui précède l'extraction. Comme le montre l'image western blot de gauche de la figure 25 A, la température de culture bactérienne après induction de la production par l'arabinose s'est révélée cruciale : si la production était effectuée à 37 ° C, la solubilisation de la protéine était extrêmement faible. Par contre si la production se faisait à 20°C, la quantité de protéine solubilisée augmentait fortement. Une explication plausible est qu'à 37°C, les bactéries produisent tellement de protéines recombinantes qu'elles s'agrègent immédiatement et s'accumulent dans les corps d'inclusions contenus dans leur cytoplasme. A 20°C, une partie des protéines reste soluble. Le second paramètre illustré par l'image de droite de la figure 25 A est l'effet de la présence de NaCl à 500 mM dans le tampon d'extraction. Nous avons en effet testé des concentrations en NaCl différentes de celle du tampon du kit *Probound* ; diminuer le taux de NaCl permet en effet parfois d'augmenter la fixation des protéines recombinantes sur les colonnes de purification utilisées à l'étape suivante.

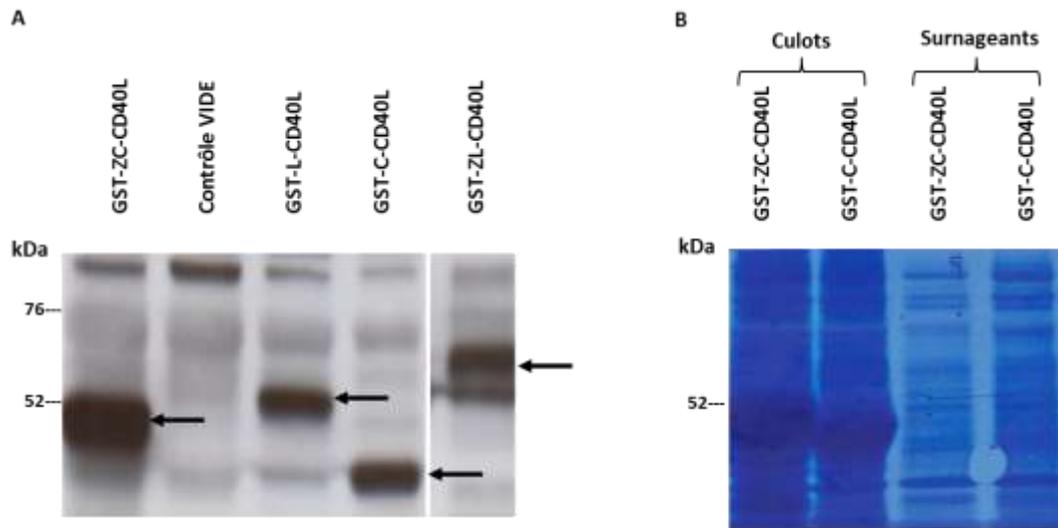


Figure 24: Analyse par Western blot et coloration au bleu de coomassie des produits d'extraction native de 4 formes de protéines de fusion GST-CD40L. La figure A montre l'analyse western blot anti-GST des surnageants de cette extraction. De gauche à droite, extrait de GST-ZC-CD40L, extrait de bactéries vides, extrait de GST-L-CD40L, extrait de GST-C-CD40L et extrait de GST-ZL-CD40L. Les flèches pointent chaque bande de protéines recombinantes. Figure B. Coloration en bleu de coomassie après transfert sur membrane pvdf de culots et surnageants de l'extraction. De gauche à droite, les culots d'extraction des formes GST-ZC-CD40L et GST-C-CD40L puis les surnageants d'extraction de ces mêmes formes.

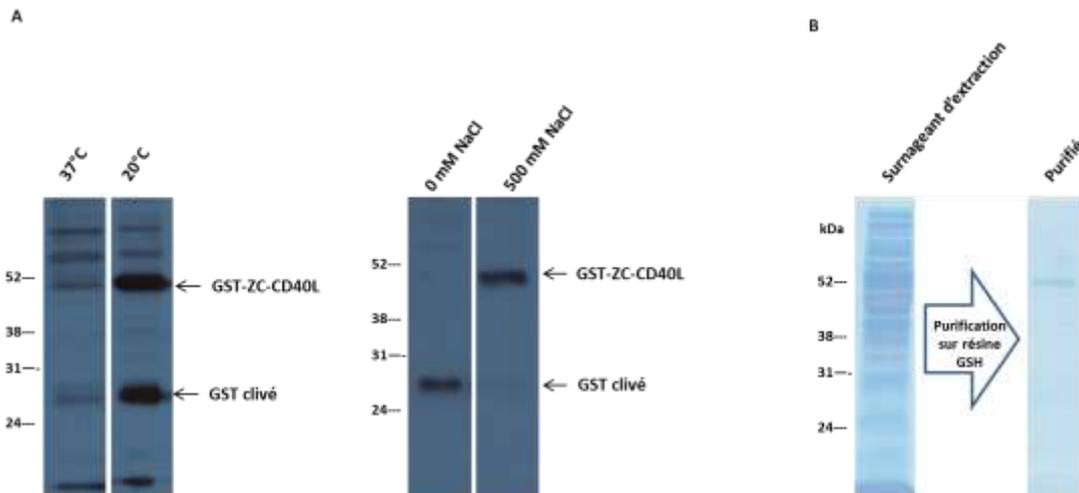


Figure 25: Analyse par western blot anti-GST et par coloration au bleu de coomassie des SDS-PAGE d'extraits et d'élutions de GST-CD40L. Figure A: Images Western blot anti-GST de surnageants de différentes extractions natives. A gauche, surnageants d'extractions issus de productions à 37 et à 20 °C. A droite, Surnageant d'extraction avec tampon contenant 0 mM (à gauche) ou 500 mM (à droite) de NaCl. Figure B: Coloration au bleu de coomassie après SDS-PAGE de produits de purification du GST-ZC-CD40L. A gauche, le surnageant d'extraction native total et à droite le produit purifié par passage sur la colonne retenant la GST.

On remarque que lorsqu'il n'y a pas de NaCl, on n'observe qu'une bande nette à 26-27 kDa (taille attendue pour le *tag* GST seule) et aucune bande à 49,9 kDa (taille attendue pour le GST-ZC-CD40L). En revanche, en présence de NaCl 500mM, la bande à 49,9 kDa est importante alors que la bande à 26-27 kDa est très faible. La GST seule est probablement issue d'un clivage du GST-CD40L par des protéases. La présence de la bande GST-CD40L uniquement avec le tampon NaCl peut s'expliquer de 2 manières : en l'absence de NaCl, soit la solubilité du GST-CD40L est nulle, soit sa protéolyse est totale. Il est cependant peu probable que la protéolyse soit totale, d'autant plus que nous utilisons des inhibiteurs de celle-ci. Il est plus probable que le NaCl soit indispensable à la solubilité du GST-CD40L. Le NaCl 500 mM diminue aussi manifestement la protéolyse puisque la bande de GST clivée est quasi invisible dans cette condition. Par la suite, nous avons donc produit systématiquement à 20 °C et extrait dans un tampon contenant 500 mM de NaCl.

2.2 Purification et tests d'activité fonctionnelle

2.2.1 Principe de la purification utilisée

Nous avons purifié les surnageants d'extraction sur des colonnes fixant la GST en suivant les instructions du kit (Thermo scientific). Le procédé de base conseillé par la firme ressemble au protocole définitif que nous avons mis au point et qui est détaillé dans le matériel et méthodes avec quelques différences. La première différence est l'absence de Triton X-100 et X114 dans les tampons de lavage et d'élution. La seconde est un pH de 8 constant tout au long de la purification. Enfin, le nombre de lavages est réduit à 3 et les temps d'incubation sont réduits à 30 minutes pour l'étape de binding et 15 minutes pour l'élution. Le résultat des premières purifications est montré par la Figure 25 B. On remarque qu'avant purification (partie gauche de la figure), l'échantillon est composé de très nombreuses protéines qui forment de multiples bandes bleues en coloration de coomassie. Après purification par contre, on observe une simple bande dont le poids moléculaire est proche de 50 kDa ce qui correspond donc à la taille théorique de GST-ZC-CD40L. La bande est bien visible en coloration de coomassie et nous pouvons évaluer la quantité de GST-CD40L dans cette bande à quelques µg. En tenant compte du volume d'échantillon appliqué sur le gel, on peut estimer grossièrement la concentration de la protéine d'intérêt dans l'éluat. Un dosage de Bradford réalisé sur l'éluat donnait 52 µg/ml et corroborait l'estimation. Comme cette concentration restait relativement faible et que, de plus, des protéines précipitées avaient été observées dans la colonne, nous avons tenté d'améliorer le rendement de l'étape « colonne ». La figure 26 A montre 2 paramètres influençant fortement le rendement de cette étape : il s'agit du pH de l'élution et de la concentration en NaCl de l'élution. On remarque que l'éluat le plus

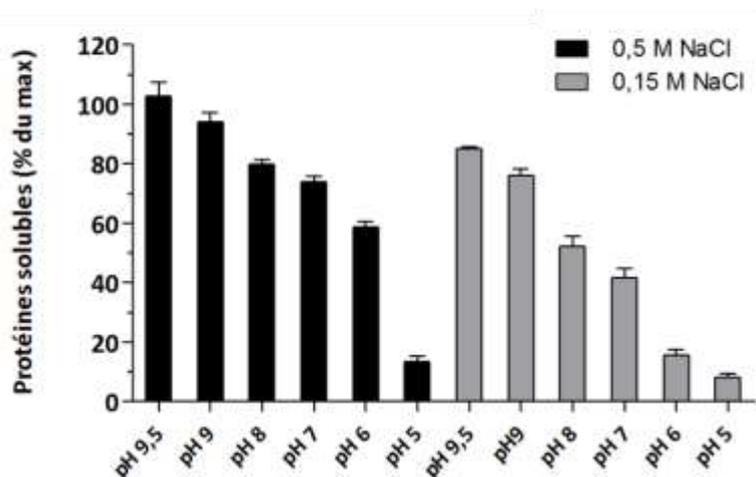
RESULTATS

concentré en GST-CD40L (102 µg/ml) est obtenu avec 500 mM de NaCl et un pH d'élution de 9.5 et que ce taux diminue à mesure que la concentration en NaCl et le pH diminuent. Au pH physiologique et à concentration en NaCl isotonique, la concentration en GST-CD40L n'est que de 45 µg/ml environ. Nous avons remarqué qu'au-dessus de pH 9,5 le rendement n'augmente pas. La figure 26 B illustre le meilleur rendement obtenu avec la combinaison des techniques d'extraction mises au point précédemment et de l'élution pH 9,5 et 500 mM NaCl. On voit en effet une large bande de GST-CD40L purifié présente sur le côté droit du SDS-PAGE colorée au bleu de coomassie.

2.2.2 Premier test fonctionnel

Ayant obtenu une quantité de protéine purifiée et soluble raisonnable, nous avons entrepris de tester son activité biologique sur des cellules bovines. En 1999, Thienel et collaborateurs avaient démontré la sécrétion de MCP-1 suite à la stimulation du CD40 des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Nous avons acquis une culture de cellules aortiques endothéliales bovines primaire (BAEC), confirmé par western blot l'expression du CD40 à leur surface et procédé aux tests décrits dans le matériel et méthodes. La figure 27 A montre un résultat représentatif des 3 premiers tests de dosage par ELISA du MCP-1 sécrété lors de la stimulation des BAEC. On voit que le contrôle négatif général, c'est-à-dire le tampon d'élution seul, induit la production de 1300 pg/ml de MCP-1, valeur égale à la production basale (milieu RPMI seul), ce qui permet de vérifier que le tampon de purification ne stimule pas les BAEC. Pour le contrôle positif général de l'expérience, c'est à dire 1 ng / ml de lipopolysaccharide (LPS), la production de MCP-1 est supérieure à 10000 pg/ml ce qui est très significativement supérieur ($p \leq 0,0014$) aux contrôles négatifs. Les protéines GST-CD40L induisent une forte production de MCP-1, autour de 11000 pg / ml, mais cela n'est pas dû à l'activité de la protéine. En effet, le même niveau de stimulation est constaté lorsqu'on utilise la protéine bouillie, donc dénaturée et inactive, ce qui trahit la présence d'endotoxines bactériennes dans l'éluat. On peut tirer une telle conclusion dans la mesure où, contrairement aux protéines, le LPS résiste parfaitement à l'ébullition (Magalhães *et al.*, 2007).

A



B

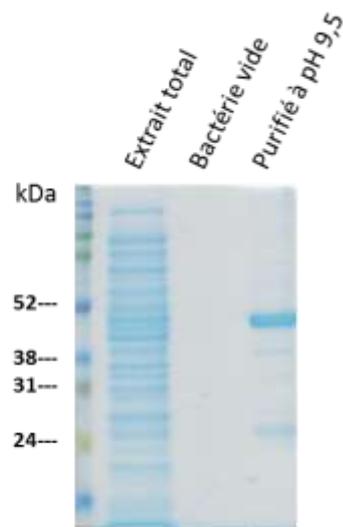


Figure 26: effet du pH et de la concentration en NaCl du tampon d'éluion sur le rendement de la purification de GST-CD40L. La figure A montre les dosages des protéines solubles retrouvées dans l'éluion des différentes conditions de tampons testées exprimés en % du maximum obtenu à pH 9,5 et 500 mM de NaCl. En noir les tampons avec 500 mM de NaCl et en gris les tampons avec 150 mM de NaCl. De gauche à droite, tampons de pH décroissants (de 9,5 à 5). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 2 dosages indépendants. La figure B montre de gauche à droite, une analyse par coloration au bleu de coomassie de l'extrait total de GST-ZC-CD40L, puis des éluats de colonnes d'affinité pour la GST issus d'extraits de bactéries vides et de GST-ZC-CD40L.

Les clichés de microscopie de la figure 27 B exposent les modifications morphologiques exprimées par les BAEC suite aux stimulations par le tampon contrôle, le LPS, le GST-CD40L et le GST-CD40L bouilli. On remarque que l'aspect pavimenteux régulier des cellules non activées laisse la place à une forme étirée, voire globulaire avec perte d'adhérence au fond du puits lorsqu'elles sont stimulées avec du LPS. La purification réalisée telle que décrite dans le paragraphe précédent était donc incomplète et le taux d'endotoxines final trop élevé pour pouvoir interpréter le test MCP-1.

2.3 Amélioration de la purification et preuve de l'activité du GST-CD40L

2.3.1 Echec de la chromatographie par échange d'ions

Nous avons alors tenté d'améliorer la pureté du produit final pour diminuer sa charge en LPS et polluants divers. Nous avons sollicité l'expertise du centre d'ingénierie des protéines de l'Ulg qui a procédé à une purification par chromatographie échangeuse d'ions. Le principe est décrit dans le matériel et méthodes. La figure 28 compare le produit de purification issu de la colonne échangeuse d'anions et celui des colonnes d'affinité pour la GST précédemment utilisées après électrophorèse et coloration au bleu de coomassie des échantillons. On constate cependant que l'échantillon de droite issu de la colonne échangeuse d'ions contient presque autant de bandes protéiques que l'extrait total non purifié (à gauche). Sur la même analyse en revanche l'échantillon issu de la purification par colonnes d'affinité (à gauche du marqueur) semble beaucoup plus pur avec une seule bande apparente. Nous avons alors fait subir au produit purifié par échange d'ions une seconde purification sur les colonnes d'affinité, puis avons testé l'éluat final natif et bouilli sur les cellules BAEC. Le résultat fut une fois encore la mise en évidence d'une forte pollution par le LPS masquant l'activité du ligand (donnée non montrée). La technique par échange d'ions est donc totalement inefficace pour notre CD40L car elle ne permet pas de diminuer la quantité de protéines non voulues ni la charge en LPS de l'échantillon. A ce moment, nous ne comprenions pas exactement pourquoi notre CD40L était tant contaminé par le LPS, cependant l'incapacité de la colonne échangeuse d'anions à éliminer le LPS s'explique assez bien. En effet, une colonne échangeuse d'anions est composée de charges positives retenant les molécules chargées négativement, tel le GST-CD40L (au pH 10,5 utilisé). Le LPS est toujours chargé négativement par ses groupements phosphates, il sera donc également retenu par la colonne.

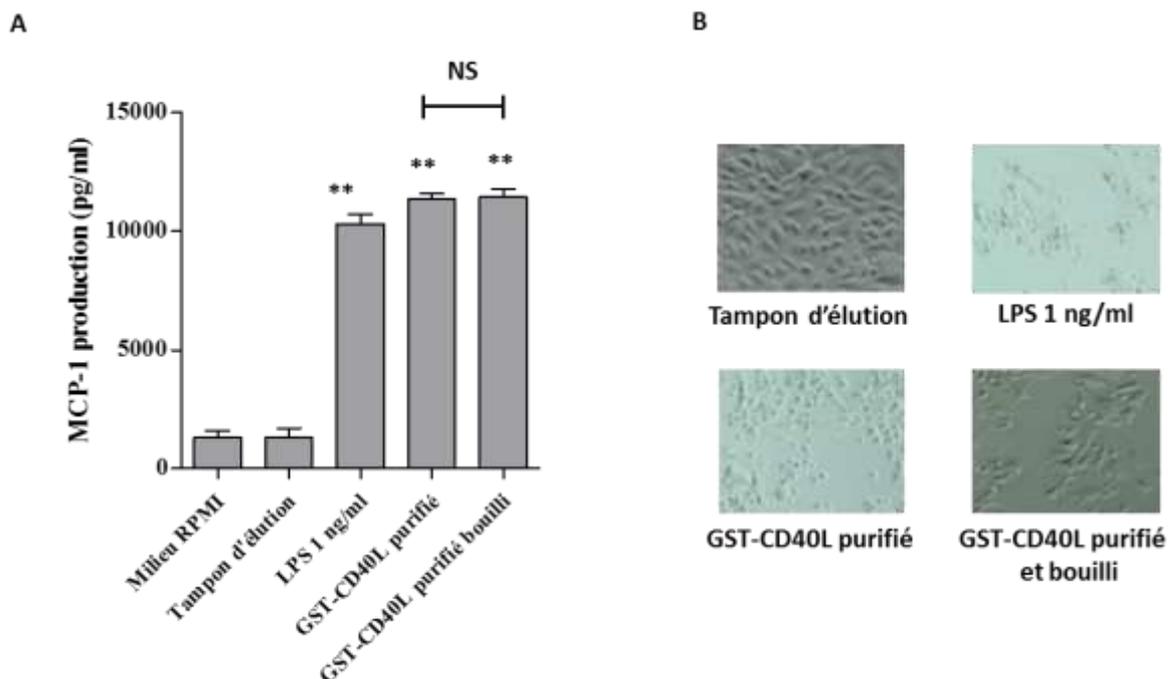


Figure 27: Premier test d'activation des cellules BAEC avec les GST-CD40L purifiés. A. Résultat du dosage par ELISA du MCP-1 libéré dans le surnageant (en pg/ml) des cellules stimulées. De gauche à droite, les productions induites par les stimulations réalisées avec le milieu seul, le tampon d'éluion seul, 1 ng/ml de LPS, 2 µg de GST-CD40L et 2 µg de GST-CD40L bouilli. Les ** représentent une différence significative avec $p \leq 0,0014$ dans le test de Student. NS représente l'absence de différence significative au seuil 5%. Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 4 puits de culture analysés en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. B. Modifications morphologiques. En haut de l'image, la stimulation par le tampon d'éluion seul à gauche et la stimulation par le LPS à 1ng/ml à droite. En bas de l'image la stimulation par le GST-CD40L purifié à gauche et la stimulation par le GST-CD40L purifié bouilli à droite.

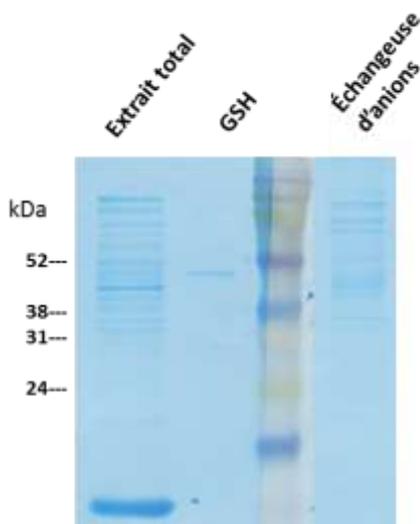


Figure 28: Coloration en bleu de coomassie de l'électrophorèse des échantillons issus de 2 techniques de purification. De gauche à droite, l'extrait avant purification, l'éluat de la colonne d'affinité pour le GST (GSH) et l'éluat de la colonne échangeuse d'anions Q HP.

2.3.2 Echec des colonnes de détoxification

Les tentatives d'élimination du LPS avec les colonnes *Endo Trap* ont échoué et les tests sur BAEC sont restés non interprétables (données non montrées). Pire, la plupart des protéines ont disparu en bouchant les colonnes anti-LPS. Les difficultés rencontrées pour décrocher le LPS du GST-CD40L peuvent potentiellement s'expliquer par des interactions ioniques car si le point isoélectrique global du GST-CD40L est égal à 8, la partie ZC-CD40L en revanche est nettement plus basique ($p_i = 9,14$) donc chargée positivement dans les tampons de purification. Ses charges positives peuvent donc fixer le LPS. Nous ne pouvons pas exclure d'éventuelles interactions hydrophobes non plus.

2.3.3 Améliorations majeures apportées par le détergent Triton-X-100

2.3.3.1 Augmentation de la solubilité et du rendement

Afin d'éliminer un maximum de contaminants, notamment les protéines non souhaitées qui semblaient présentes en petite quantité dans les analyses coomassie, nous avons décidé d'utiliser un détergent non dénaturant. Nous pensions que ces protéines contaminantes s'accrochaient au GST-CD40L lui-même et non à la matrice de la colonne car nous n'observons aucune bande dans les analyses coomassies des échantillons issus d'extraits de bactéries vides (voir figure 26 B). De même, nous craignons que le GST-CD40L soit adsorbé sur d'infimes fragments de membranes bactériennes de taille suffisamment faible pour rester dans le surnageant de lyse après centrifugation à 28000 g. Le détergent devait donc permettre de rompre les interactions faibles entre GST-CD40L et les protéines ou fragments de membranes contaminants. Nous avons donc essayé un détergent non ionique : le Triton X-100. Celui-ci a été ajouté au tampon d'extraction et dans tous les tampons de lavage tel que détaillé dans le matériel et méthodes. L'efficacité de cette nouvelle purification a été vérifiée par ELISA, électrophorèse et test d'activité montrés sur la figure 29. La figure 29 A montre les dosages par ELISA anti-GST du produit d'élution et du résidu protéique coincé inutilisable dans la colonne de purification pour les conditions avec et sans Triton X-100. On voit que la purification avec le Triton X-100 est significativement ($p=0,0016$) plus productive et que la perte de protéines par précipitation dans la colonne est très significativement plus faible ($p=0,0004$) comparé à la condition sans Triton X-100. Cette solubilité augmentée n'est cependant pas trop surprenante sachant que le CD40L seul s'était montré soluble uniquement dans les tampons dénaturants et détergents. La figure 29 B met en évidence une extraction globalement plus efficace et surtout une augmentation du rendement de la purification dans la condition Triton-X-100. L'éluat y est beaucoup plus concentré qui se traduit par une bande beaucoup plus épaisse à la hauteur attendue pour GST-CD40L (flèche noire). Il ne semble cependant pas y avoir

d'augmentation de pureté dans la mesure où les quelques traces de bandes protéiques inconnues de l'éluat semblent présentes dans les 2 conditions. Par la suite, comme expliqué dans le matériel et méthodes, le Triton X-114 a été rajouté à la fin du protocole de purification. Il est naturel de se demander pourquoi rajouter une étape de retrait du détergent après l'élution alors qu'il suffisait de ne plus en mettre dans les 2 derniers lavages. Au final les protéines se retrouvent dans un tampon sans détergent dans les 2 cas ; cependant, l'étape de décrochage (élution) des protéines semble être une étape critique qui favorise la précipitation. Il est donc préférable que cette étape ait lieu dans un tampon contenant le détergent Triton qui favorise la solubilité. Nous remarquerons que ceci n'est qu'une hypothèse pour tenter d'expliquer le rendement 5 fois supérieur (données non montrées) obtenu avec ce dernier procédé de purification.

2.3.3.2 Elimination du LPS

De nouveaux tests fonctionnels ont été réalisés avec ces derniers éluats. Le premier de ces tests a montré qu'un résidu de Triton dans l'éluat tuait les cellules endothéliales (données non montrées) et nous avons donc procédé au retrait du Triton des tampons des 2 derniers lavages de la colonne anti-GST. Cette fois, comme le montre la figure 30 A, nous avons démontré que l'activité du GST-CD40L produit n'était pas due à la pollution par le LPS, le GST-CD40L bouilli n'activant plus du tout ($p= 0,0015$ comparé à l'échantillon non bouilli) les BAEC. La figure 30 B montre enfin les modifications morphologiques visibles sur les BAEC activées, en haut de l'image, par le GST-CD40L purifié avec le Triton X-100. On voit en bas de l'image que la stimulation avec le GST-CD40L purifié avec Triton X-100 et bouilli n'induit plus de modifications morphologiques. Cela confirme qu'il ne contient plus de LPS. La disparition du LPS s'explique en fait par l'effet du Triton X-100.

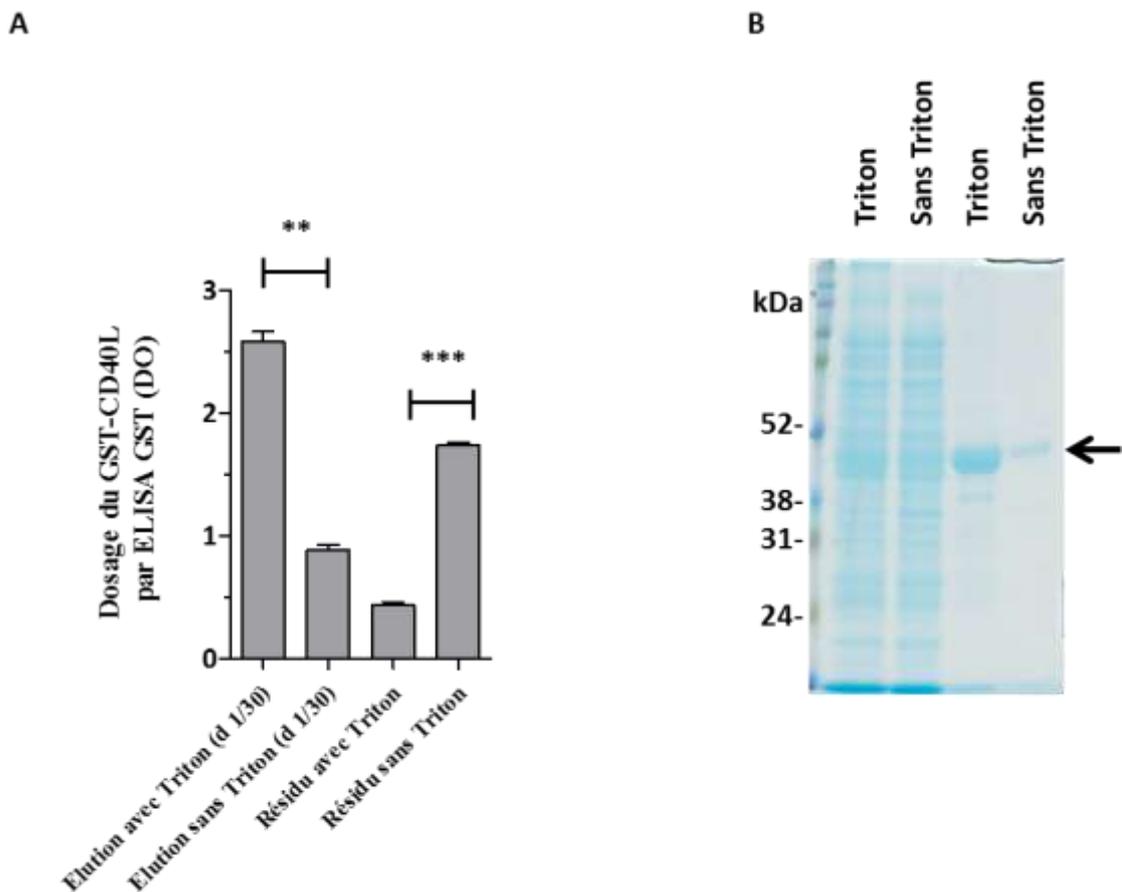


Figure 29: Dosage ELISA et analyse par SDS-PAGE colorée en coomassie d'échantillons purifiés avec et sans Triton X-100. A : Dosage par ELISA anti-GST d'éluats des colonnes de purification par affinité pour le GST. De gauche à droite, éluat (dilué 30x) purifié avec Triton X-100, éluat (dilué 30x) purifié sans Triton X-100, résidu de la colonne après purification avec Triton X-100 et résidu de la colonne après purification sans Triton X-100. Les ** et les *** représentent des différences significatives avec respectivement $p \leq 0,0016$ et $p = 0,0004$ dans le test de Student. Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de triplicats du même dosage et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. B: coloration au bleu de coomassie de SDS-PAGE d'échantillons d'extraction et de purification. De gauche à droite, extrait total sans Triton X-100, extrait total avec Triton X-100, élution de purification avec Triton X-100 et élution de purification sans Triton X-100.

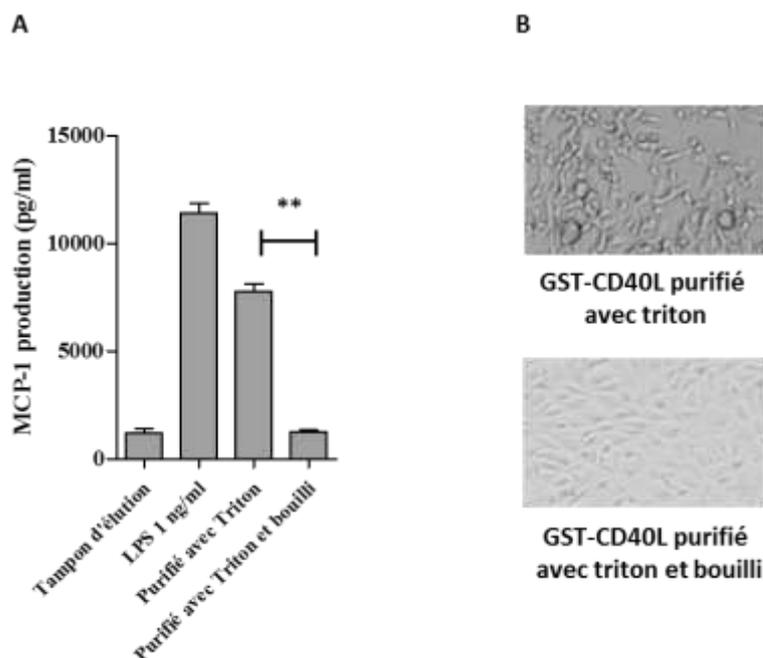


Figure 30: Test d'activation des cellules BAEC avec les GST-CD40L purifiés avec Triton X-100. La figure A montre le résultat du dosage par ELISA du MCP-1 libéré dans le surnageant (en pg/ml) des cellules stimulées. De gauche à droite, les productions induites par les stimulations réalisées avec le tampon d'élution seul, 1 ng/ml de LPS, 2 µg de GST-CD40L purifié avec Triton X-100 et 2 µg de GST-CD40L purifié avec Triton X-100 et bouilli. Les ** représentent une différence significative ($p=0,0015$, test de Student). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 4 puits de culture analysés en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. La figure B montre les modifications morphologiques visibles sur les mêmes cellules BAEC activées. En haut de l'image, la stimulation par le GST-CD40L purifié avec Triton X-100 et en bas, la stimulation par le GST-CD40L purifié avec Triton X-100 et bouilli.

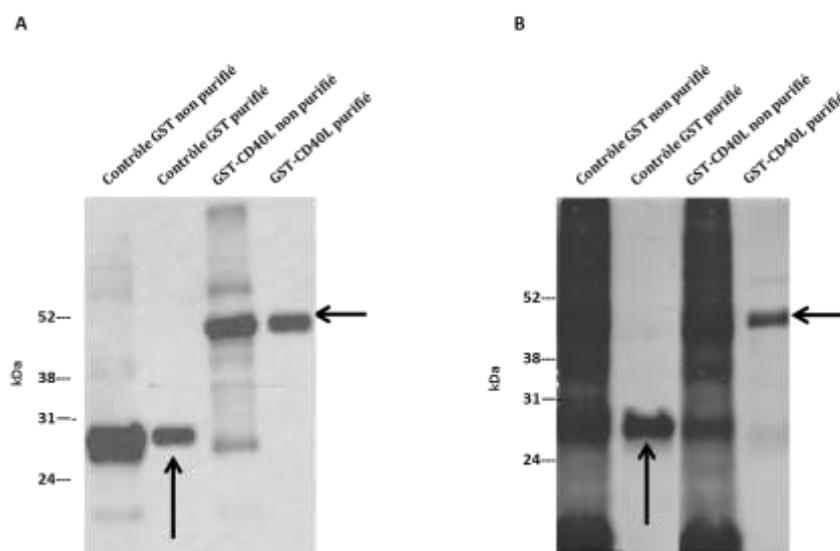


Fig 31. Analyse par western blot anti-GST et coloration de coomassie des produits d'extraction et de purification de GST-CD40L et de la protéine contrôle GST. Les flèches horizontales représentent les bandes de taille attendue pour GST-CD40L. Les flèches verticales représentent les bandes de taille attendue pour le contrôle GST. La figure A montre l'analyse western blot de l'extrait total et de l'éluat purifié de GST seul à gauche et de GST-CD40L à droite. La figure B montre les mêmes échantillons traités en bleu de coomassie.

3 Production d'une protéine contrôle

Le GST-CD40L bouilli semblait être un bon contrôle négatif, cependant, nous voulions vérifier si une protéine n'activant pas le CD40 mais produite et purifiée exactement selon le même procédé que le GST-CD40L donnerait les mêmes résultats que le contrôle bouilli. En effet, le fait de faire bouillir le GST-CD40L représentait une manipulation supplémentaire importante que ne subissait pas le GST-CD40L de la condition non bouillie et pouvait biaiser les résultats. Nous avons donc choisi de produire et de purifier la partie GST seule. La figure 31 A montre l'analyse par western blot anti-GST des produits d'extraction et de purification de la GST issue de la construction GST seule et du GST-CD40L. On vérifie que la bande obtenue pour le GST-CD40L est toujours proche de 50 kDa (flèche horizontale). On voit également que la bande obtenue pour la GST purifiée seule (flèche verticale continue) est proche de 29 kDa, ce qui est la taille théorique attendue pour cette protéine recombinante, mais est supérieur à la taille de la GST de *shistosoma japonicum* du kit Invitrogen (27 kDa). Nous avons en effet allongé la séquence avec les acides aminés de la zone de jonction entre GST et CD40L présente dans la protéine de fusion. Il s'agit en fait d'une précaution prise pour que la protéine contrôle ne diffère de la protéine de fusion que par l'absence de la séquence exacte du CD40L, supprimant ainsi toute différence d'effet (entre GST-CD40L et GST contrôle) qui ne serait pas due à l'activité propre du CD40L. La figure 31 B montre un gel équivalent traité au bleu de coomassie. Les flèches correspondent aux explications déjà données pour la figure A. On remarque que la concentration en protéine GST dans l'éluat est plus importante que celle en CD40L. La GST se fixe probablement mieux que GST-CD40L sur sa colonne spécifique tout en étant plus soluble. La figure 32 montre l'effet de la stimulation des cellules BAEC avec la GST purifiée avec ou sans Triton X-114. Comme pour le GST-CD40L, l'éluat issu de la purification sans Triton aboutit à une protéine contaminée par du LPS. En effet, la GST n'est pas censée activer les cellules endothéliales, or la production de MCP-1 est proche de la production maximale. De plus, si cela était dû à un effet réel de la protéine, le traitement par ébullition de l'échantillon l'aurait abrogé. La confirmation de cette pollution nous est encore une fois donnée par le test de l'échantillon purifié avec le Triton X-114, dans lequel la GST n'active pas les BAEC. La différence entre la GST purifiée avec et sans Triton est significative ($p=0,006$) et cela justifie l'utilisation de la GST comme contrôle négatif. En effet, la GST réagit bien comme le GST-CD40L lors de la purification car elle fixe le LPS (ce n'était pas certain étant donné le pI de 6,1 de la GST) et en est débarrassée par le détergent.

4 Validation de l'activité dans 2 tests fonctionnels différents

4.1 Test de stimulation de cellules endothéliales bovines

La figure 33 montre le dosage du MCP-1 dans les surnageants de BAEC stimulées avec des doses croissantes de LPS, GST, GST-CD40L ou avec la dose maximale (1 μ g /ml) de GST-CD40L bouilli. On remarque que le tampon d'élution et la GST seule n'activent pas les BAEC, de même que le GST-CD40L bouilli. En revanche, le test est extrêmement sensible au LPS, car la dose de 1 pg de LPS par ml est suffisante pour multiplier la production basale par 2. Cette dose active également les BAEC 2 fois plus que le GST-CD40L bouilli à 1 μ g/ml (différence significative avec $p= 0,0117$), ce qui prouve que notre adjuvant purifié contient moins d' 1 ng de LPS /mg de GST-CD40L. Nous pouvons également signaler que des essais avec 10 μ g/ml de GST-CD40L bouilli ont été réalisés (données non montrées) sans que la production de MCP-1 n'augmente ce qui prouve que le niveau de pollution est en fait inférieur à 0,1 ng LPS par mg de GST-CD40L. En ce qui concerne l'efficacité du GST-CD40L, ce test met en évidence 2 particularités. La première est l'effet dose-dépendant du GST-CD40L avec une sécrétion de MCP-1 qui augmente régulièrement avec la quantité ajoutée sur les cellules. La seconde est l'existence d'une dose minimale activatrice : 2 ng/ml de GST-CD40L sont ainsi significativement plus efficaces que la même dose de GST ($p= 0,0037$; test de student). Cette dose seuil a d'ailleurs été retrouvée dans toutes les expériences ultérieures de stimulation des BAEC.

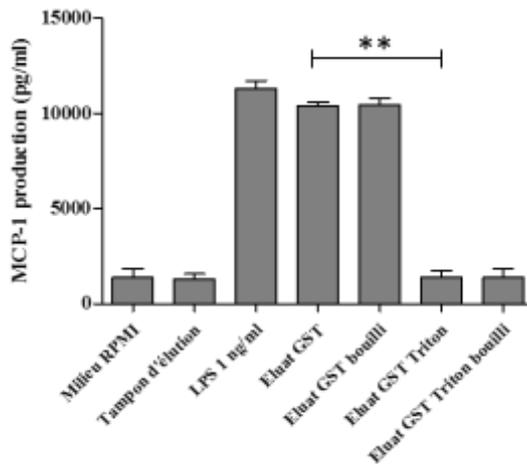


Figure 32: Mesure de la production de MCP-1 des cellules BAEC stimulées avec les protéines GST contrôles purifiées avec et sans Triton X-100. De gauche à droite, les productions induites par les stimulations réalisées avec le milieu seul, le tampon d'éluat seul, 1 ng/ml de LPS, 2 µg de GST purifié sans Triton X-100, 2 µg de GST purifié avec Triton X-100 et bouilli, 2 µg de GST purifié avec Triton X-100 et 2 µg de GST purifié avec Triton X-100 et bouilli. Les ** représentent une différence significative (p=0,006 avec le test de Student). Les données représentent les valeurs moyennes ± SD de 4 puits de cultures analysés chacun en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

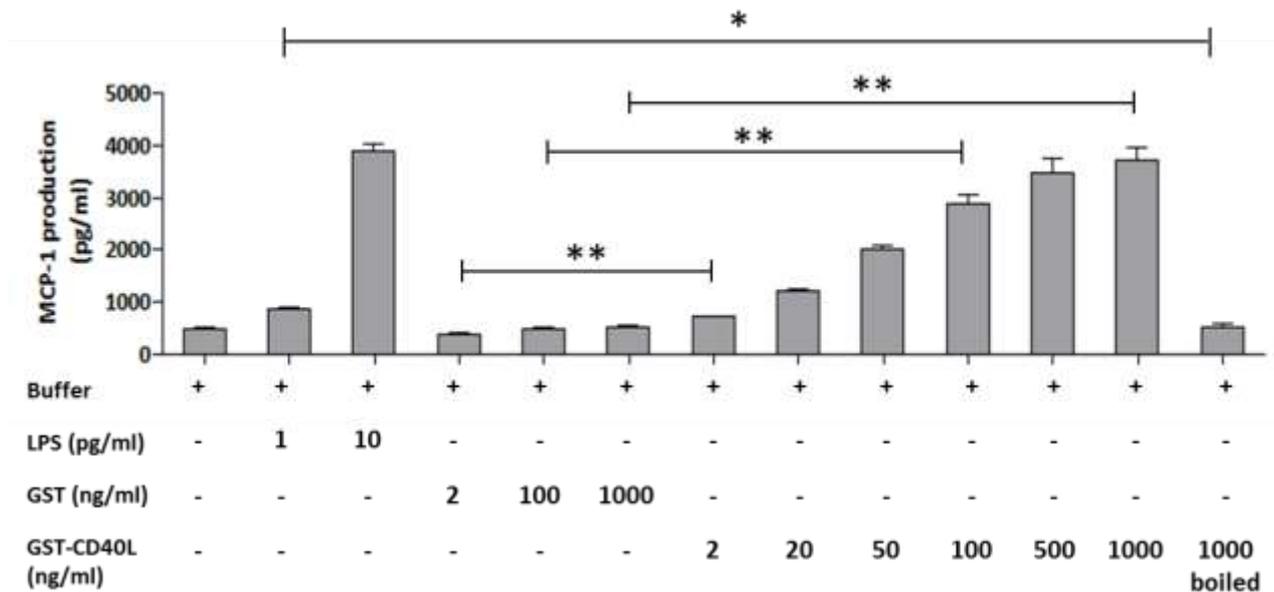


Figure 33. Dosage de la chimiokine MCP-1 dans les surnageants de culture de cellules aortiques bovines par ELISA anti-MCP-1. Les cellules ont été stimulées avec des doses croissantes de GST-CD40L ou de contrôle GST. Le GST-CD40L bouilli, le tampon d'éluat et le LPS ont été utilisés respectivement comme contrôles négatifs et positifs. Les ** et * représentent une différence significative avec p≤0,0037 et p= 0,017 respectivement dans le test de Student. Les données représentent les valeurs moyennes ± SD de 4 puits de culture analysés chacun en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

4.2 Test de prolifération et d'agrégation des lymphocytes B

Les lymphocytes B bovins isolés et cultivés avec de l'IL-4 comme décrit dans le matériel et méthodes ont été stimulés avec le tampon d'éluion, le LPS ou les protéines recombinantes purifiées GST et GST-CD40L. L'activation du CD40 des lymphocytes B est en effet connue depuis longtemps (Banchereau *et al.*, 1991) pour induire leur prolifération. La figure 34 A montre la prolifération, évaluée grâce à la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée, de lymphocytes bovins, stimulés par différentes doses de LPS ou de protéines recombinantes GST et GST-CD40L. On note que l'effet du LPS augmente avec la dose et que 5000 ng de LPS par ml n'induisent qu'une prolifération modeste (13 fois le niveau basal) comparé à 5000 ng de GST-CD40L (105 fois le niveau basal). De plus, à partir de 20 ng de GST-CD40L par ml, la prolifération des Lymphocytes B est significative avec $p= 0,0002$ par rapport à la même dose de GST. Cette prolifération augmente à mesure que la dose de GST-CD40L augmente. La figure 34 B permet d'observer le phénomène d'agrégation des lymphocytes B bovins induit par la stimulation du CD40. Cet effet a été décrit dès 1988 par Gordon et collaborateurs. On remarque que l'agrégation augmente avec la dose de GST-CD40L. Par contre, ni le contrôle GST, ni le LPS ne stimulent l'agrégation des lymphocytes B.

4.3 Comparaison avec l'activité des CD40L commerciaux

La figure 35 A montre la prolifération des lymphocytes B bovins stimulés avec notre GST-CD40L ou avec les CD40L commerciaux. On remarque que le CD40L de souris n'induit aucune prolifération, quelle que soit la dose. Le GST-CD40L humain induit une prolifération significative, diminuée quand on utilise la protéine bouillie. Il semble donc avoir une activité sur les récepteurs bovins. Cependant, l'ébullition ne supprime que 50% de cette activité, ce qui montre une forte pollution par le LPS. De plus, l'activité du GST-CD40L humain non bouilli reste modérée et n'est pas significativement différente de celle induite par 2000 ng/ml de LPS. En comparaison, notre GST-CD40L bovin active 2,15 fois plus fortement les lymphocytes B et perd toute activité lorsque dénaturé par l'ébullition. La figure 35 B montre que seul notre GST- CD40L induit, sur ces mêmes lymphocytes B, une agrégation supérieure à celle provoquée par le LPS. Comme le montre la figure 35 C, le test de stimulation des cellules endothéliales avec les CD40L humains et de souris n'a pas révélé d'activité fonctionnelle spécifique.

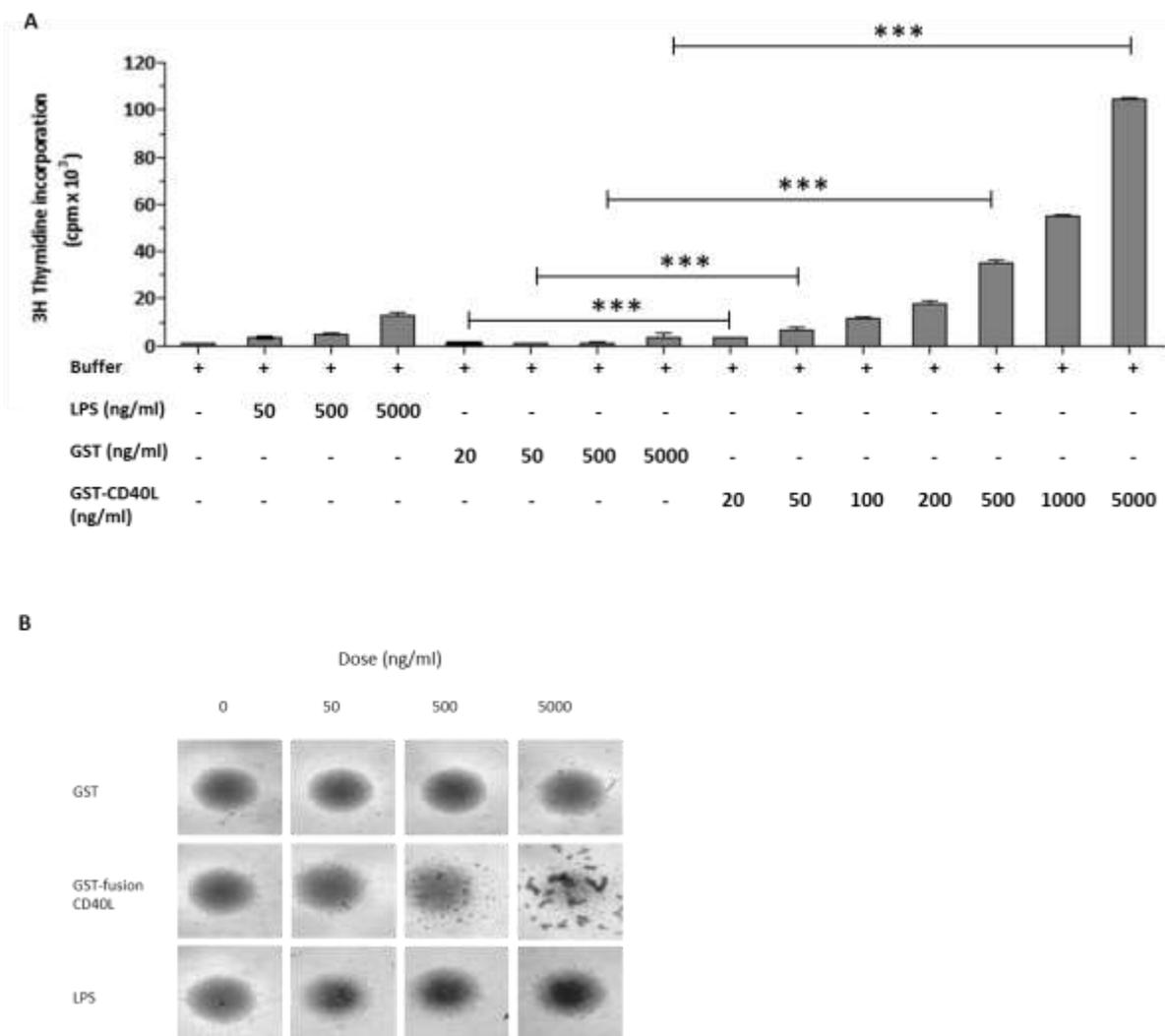


Figure 34: Activation des lymphocytes B bovins par la protéine GST-CD40L. A. Prolifération des lymphocytes B bovins cultivés pendant 90 heures en présence d'IL-4 et de 20 à 5000 ng/ml de protéine GST contrôle, de GST-CD40L ou de LPS. La thymidine tritiée a été ajoutée lors des 18 dernières heures de culture. Les *** représentent une différence significative ($p \leq 0,0009$) dans le test de Student. Les données représentent les valeurs moyennes \pm SD de 6 puits de culture et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. B. Agrégation des lymphocytes B stimulés avec 0 à 5000 ng/ml de protéine GST contrôle, de GST-CD40L ou de LPS. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

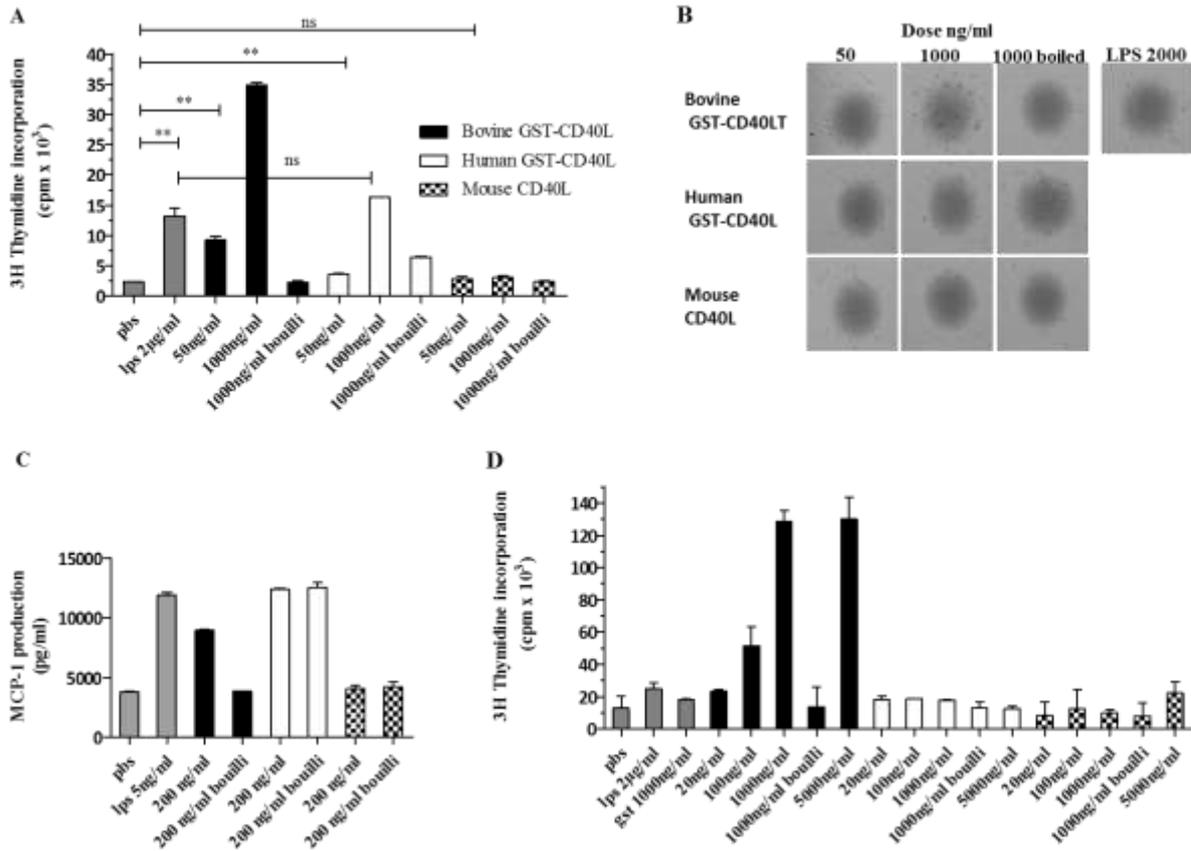


Fig 35. Comparaison de l'activité du GST-CD40L bovin à celle des CD40L commerciaux humains et de souris lors des tests fonctionnels. A. Prolifération des lymphocytes B bovins stimulés respectivement de gauche à droite avec le milieu seul, 2000ng/ml de LPS et 3 doses (50 ng/ml, 1000 ng/ml ou 1000 ng/ml bouilli) de différents CD40L. En noir, notre GST-CD40L, en blanc le GST-CD40L humain commercial et en damier le CD40L de souris commercial. B. Agrégation observée au microscope optique de ces mêmes lymphocytes B. C. Production de MCP-1 par les cellules endothéliales bovines stimulées avec 5 ng/ml de LPS ou 200 ng/ml des différents CD40L natifs ou bouillis. Le code de couleurs est identique à celui du A. D. Prolifération des PBMC bovins stimulés respectivement de gauche à droite avec le milieu seul, 2000 ng/ml de LPS, 1000 ng/ml de GST et 5 doses (20 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml, 1000 ng/ml bouilli ou 5000 ng/ml) de différents CD40L. Le code de couleurs est toujours identique à celui du A.

Il a confirmé l'inactivité du CD40L de souris et la pollution du GST-CD40L humain par du LPS. Enfin, figure 35 D, un test de prolifération identique à celui des lymphocytes B à été réalisé sur des PBMC bovins. On remarque que notre GST-CD40L a induit une très forte prolifération de ces cellules (plus de 10 fois), complètement abrogée par l'ébullition préalable de la protéine. Par contre, les CD40L commerciaux ont simplement induit une prolifération légèrement inférieure à celle provoquée par 2000 ng/ml de LPS, soit entre 1,5 et 2 fois.

5 Evaluation des interactions physiques ligand-ligand et récepteur-ligand

5.1 Interaction ligand-ligand

La figure 36 A montre l'analyse par western blot de GST-CD40L réalisée après électrophorèse SDS-PAGE, c'est-à-dire en condition dénaturante. La figure 36 B montre par contre une analyse par western blot réalisée après une électrophorèse non dénaturante permettant de conserver les structures tertiaires et quaternaires (respectivement les liaisons faibles intra et intermoléculaires). La protéine GST-CD40L apparaît ici sous la forme de 3 bandes de tailles différentes correspondant, pour les 2 plus grosses au moins, à des multimères. On ne peut en effet pas savoir si la plus petite bande est un monomère ou un multimère, l'échelle de poids moléculaire n'étant pas pertinente en électrophorèse native. La présence de ces 3 bandes en électrophorèse native laisse penser que de petits multimères peuvent s'associer entre eux par liaisons faibles, formant des multi-multimères. Cette même analyse (SDS et native PAGE) a également été réalisée pour le contrôle GST seul qui n'a montré aucune multimérisation (figure 37), bien que la littérature donne aux protéines GST une structure dimérique lors du fonctionnement de l'enzyme (Lim *et al.*, 1994). Dans notre cas, la multimérisation semble donc due aux propriétés intrinsèques du CD40L. Nous devons signaler ici que d'autres modifications post traductionnelles de la protéine, telle la glycosylation sur le trio Asn-Val-Thr situé 20 aas en amont de l'extrémité C-terminale (Banchereau *et al.*, 2000), ne sont pas possibles en *E. coli*.

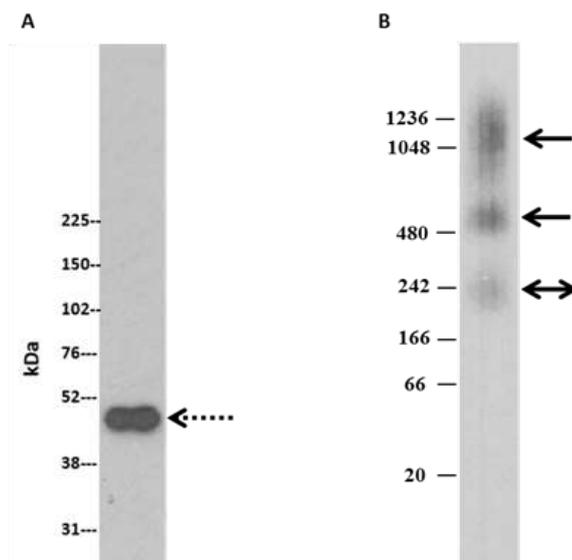


Figure 36: Analyse par Western blot anti-GST montrant la multimérisation du GST-CD40L. Les flèches en pointillé et continues représentent respectivement les formes monomériques et multimériques de la protéine. La double flèche continue peut représenter une forme mono ou multi-mérique. A. Electrophorèse SDS-PAGE du GST-CD40L. B. Electrophorèse en condition native du GST-CD40L.

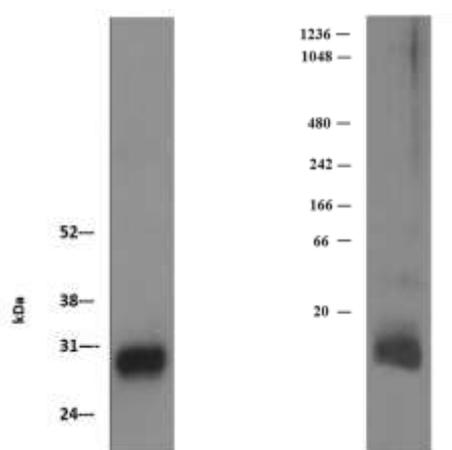
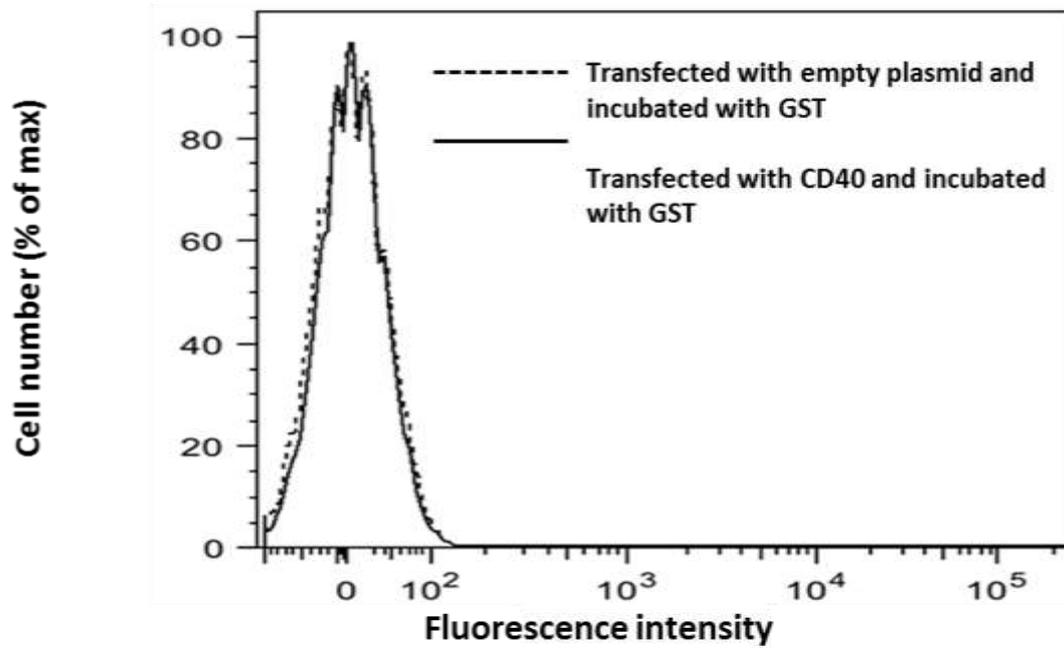


Figure 37: Western blot anti-GST évaluant la multimérisation de la protéine contrôle GST seule. A gauche, électrophorèse SDS-PAGE. A droite, électrophorèse en condition native.

5.2 Interaction ligand-récepteur

Nous avons voulu vérifier si le GST-CD40L se fixait bien sur le récepteur CD40. Pour cela nous avons transfecté des cellules Cos-7 avec des plasmides pcDNA3.1 vides ou codant pour le récepteur CD40 bovin (CD40) et avons incubé ces cellules avec le GST-CD40L ou le GST puis des anticorps de détection comme expliqué dans le matériel et méthodes. Nous avons évalué par FACS (figure 38), la présence d'anticorps de détection (couplés à un fluorochrome) fixés sur les cellules. La figure 38 A montre la fluorescence dans les 2 premiers contrôles négatifs, c'est-à-dire les incubations avec la GST seule des Cos transfectées avec pcDNA vide ou pcDNA codant pour CD40. Cette fluorescence est inférieure au seuil de positivité et identique pour ces 2 contrôles. La figure 38 B met en évidence une nette augmentation de fluorescence pour la condition incubée avec GST-CD40L et transfectée avec le récepteur CD40 par rapport à la condition transfectée avec le plasmide vide (3^e contrôle). Les 3 différents contrôles négatifs nous assurent que cette augmentation de fluorescence n'est due qu'à la liaison spécifique du ligand sur le récepteur. En observant la figure 38, on pourrait être tenté de dire que la fixation n'est pas très bonne vu le faible taux de cellules positives. Celui-ci n'était en effet que de 16 % (donnée non montrée) mais ne peut être interprété qu'en prenant en compte l'efficacité de la transfection. Ainsi le taux de cellules Cos bien transfectées et exprimant correctement le récepteur CD40 ne dépassait probablement pas 20% (donnée évaluée à partir de transfections avec GFP), ce qui explique que peu de cellules aient été marquées.

A



B

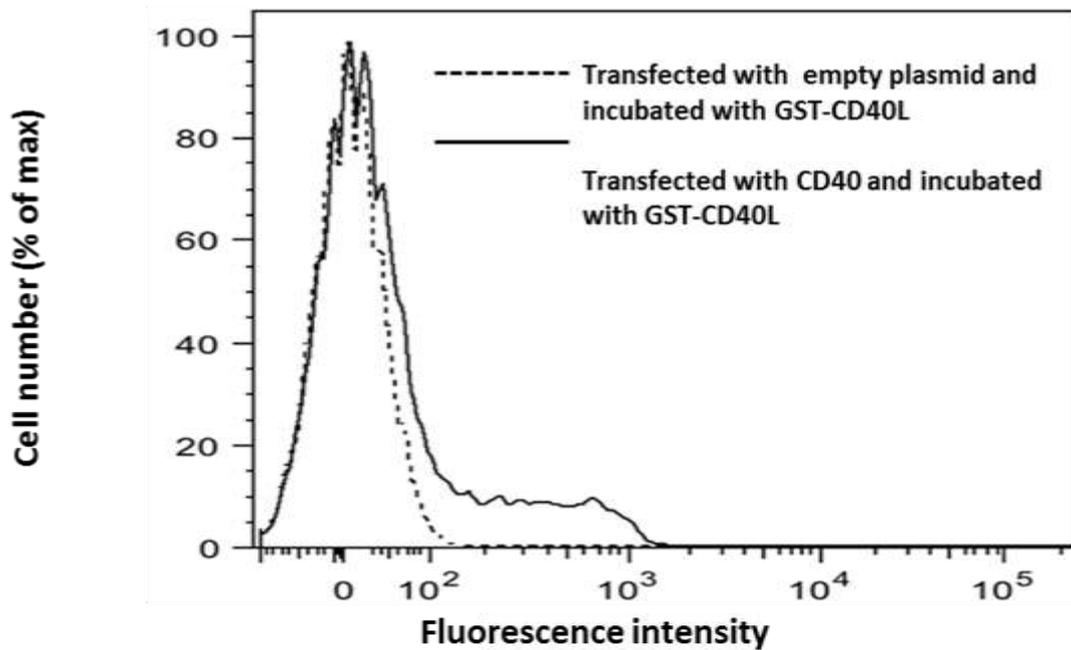


Figure 38. Vérification de la capacité de liaison du GST-CD40L sur son récepteur. A. Tracé montrant l'intensité de la fluorescence des cellules Cos-7 transfectées avec un plasmide codant pour le CD40 bovin ou un plasmide vide et incubées avec le contrôle GST. B. Intensité de la fluorescence des cellules Cos-7 transfectées avec un plasmide vide ou codant pour le CD40 bovin et incubées avec GST-CD40L. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

CHAPITRE 2 : CLONAGE DU CD40L BOVIN EN CELLULES DE MAMMIFERES

Comme vu dans l'introduction, la vaccination ADN présente de nombreux avantages. Pour réaliser cette vaccination ADN, il est nécessaire de cloner le CD40L dans un vecteur permettant l'expression dans les cellules de mammifères.

1 Production

1.1 Technique

Nous avons commencé par cloner les 4 mêmes formes de CD40L décrites pour la production en *E. coli*. Nous avons procédé comme décrit dans le matériel et méthodes pour introduire les séquences d'intérêt dans les plasmides pcDNA3.1⁺ spécialement conçus pour la production en cellules Cos-7. Les cellules Cos ont d'abord été transfectées avec les pcDNA3.1⁺ vides ou codant pour ces 4 formes de CD40L selon le protocole standard et la production a été évaluée par western blot anti-CD40L.

1.2 Problèmes rencontrés

Aucune protéine d'intérêt n'a pu être détectée lors des premiers essais, ni dans les culots cellulaires, ni dans les surnageants. L'inefficacité des anticorps de détection, la concentration trop faible ou encore l'absence totale de production étaient trois explications potentielles à cet échec.

1.2.1 Absence de la protéine dans les culots cellulaires

1.2.1.1 Détection inefficace

Nous avons changé d'anticorps anti-CD40L, et analysé culots et surnageants par western blot en utilisant 2 nouveaux anti-CD40L efficaces sur les productions bactériennes. Mais aucun des anti-CD40L N-term ou anti-CD40L C-term n'a pu mettre en évidence de bandes spécifiques dans les extraits de cellules transfectées avec les pcDNA3.1⁺ codant pour les 4 formes de CD40L.

Des expériences d'immuno-précipitation et de concentration des surnageants avant analyse ont également été réalisées sans succès à cette époque (non détaillé et non montré). Nous n'avions alors pas d'évidences en faveur d'un problème de détection.

1.2.1.2 Production inefficace

Hypothèse

Ne sachant pas par quoi commencer, nous avons décidé de calquer notre technique sur la méthode de Chubet et Brizzard (BioTechniques, 1996) : nous avons remplacé le peptide signal de l'hormone de croissance humaine par le peptide signal du plasminogène puis par celui du preprotrypsinogène. Cela n'a eu aucun effet. Nous avons alors recherché la cause du problème de manière plus systématique. Tout d'abord, nous avons voulu vérifier si la séquence était bien transcrite. Pour cela nous avons réalisé une RT-PCR sur l'ARN extrait des cellules Cos-7 transfectées comme détaillé dans le matériel et méthodes. La figure 39 A montre le résultat de cette expérience. On remarque que toutes les transfections à base de CD40L, quelle que soit la forme ou le peptide signal ont permis l'apparition d'une bande dont le nombre de paires de bases est proche de celui attendu pour le C-CD40L. Cette bande n'apparaît pas pour le contrôle plasmide vide ou le « contrôle technique » du puits sans ADN. De plus, le contrôle interne GAPDH de la figure 39 B montre que les quantités totales d'ADNc issues de la RT étaient identiques dans la condition plasmide vide et les conditions pcDNA3.1-CD40L. On peut alors conclure que de l'ARNm codant pour ces différentes formes de CD40L a bien été produit suite à la transfection par les constructions pcDNA3.1-CD40L.

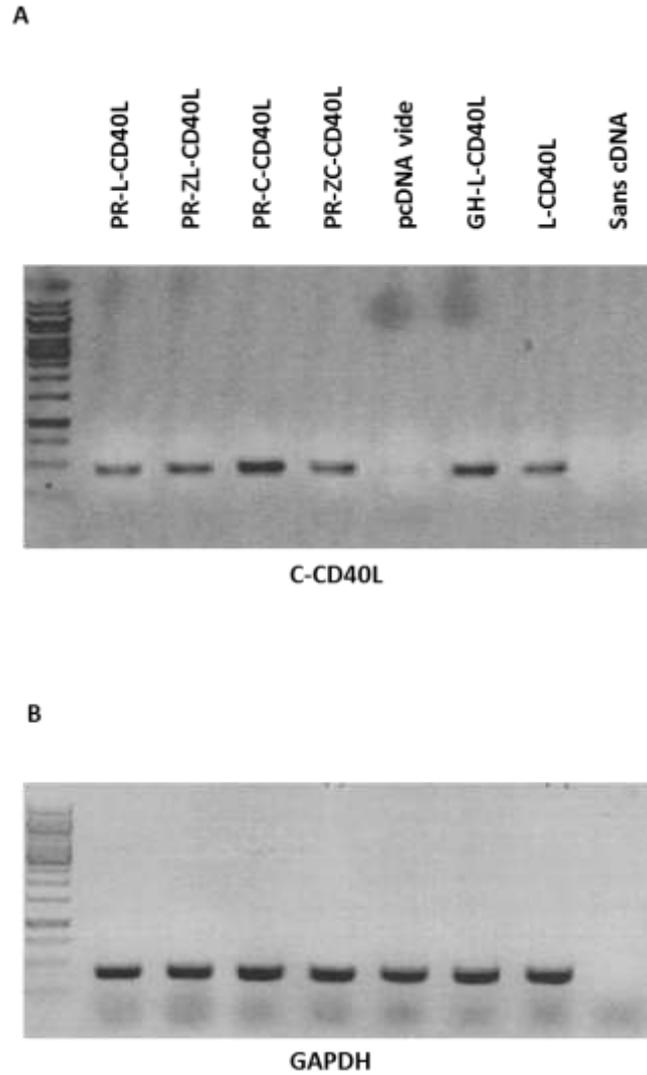


Figure 39: Electrophorèse des produits PCR issus de la RT des extraits de cellules Cos transfectées. La figure A montre le résultat obtenu lorsque la PCR est réalisée avec les primers spécifiques de la forme C-CD40L. De gauche à droite, les échantillons sont issus de transfections par les plasmides codant pour L-CD40L, ZL-CD40L, C-CD40L, ZC-CD40L, pCDNA vide, L-CD40 avec peptide signal de la GH, L-CD40L sans peptide signal et le dernier puits sans cDNA. La figure B montre le résultat obtenu lorsque la PCR est réalisée avec les primers spécifiques de GAPDH. De gauche à droite, les échantillons sont identiques à ceux de la figure A.

RESULTATS

La transcription a donc bien eu lieu et il s'agit en conséquence d'un problème traductionnel ou post-traductionnel. Nous avons alors pensé que la protéine était probablement produite mais dégradée complètement.

Confirmation

Nous avons essayé d'empêcher cette dégradation potentielle en inhibant le protéasome des cellules Cos avec l'inhibiteur MG132 (voir matériel et méthodes). Le résultat a été immédiat comme le montre, sur la figure 40 A, l'analyse par western blot d'échantillons de culot cellulaire de Cos-7 transfectées avec le ZC-CD40L et traitées ou non avec du MG132. A droite de la figure, l'échantillon de culot cellulaire de Cos-7 traitées avec MG132 laisse apparaître une bande de près de 25 kDa. A gauche, dans l'échantillon non traité, cette bande n'apparaît pas. La bande obtenue est donc bien la protéine CD40L produite en cellules de mammifères, ce qui prouve que la protéine est habituellement traduite mais dégradée par le protéasome.

1.2.2 Absence de la protéine dans les surnageants

1.2.2.1 Détection inefficace

Même après avoir réussi à détecter par western blot les CD40L dans les culots de cellules Cos-7, nous n'y parvenions toujours pas dans les surnageants. Nous avons alors décidé d'augmenter la sensibilité du test de détection en utilisant l'ELISA anti-GST. La figure 41 montre le premier dosage par ELISA anti-GST réalisé sur des surnageants de Cos-7 transfectées avec les plasmides codant pour GST-CD40L ou contrôles. On remarque que la densité optique (figure 41 A) ainsi que la concentration protéique (figure 41 B) obtenue pour les conditions transfectées avec les plasmides GST et GST-ZC-CD40L est significativement supérieure ($p \leq 0,0006$; test de t) à celle obtenue avec les contrôles plasmides vides ou plasmides codant pour ZC-CD40L. La GST et le GST-ZC-CD40L ont donc bien été produits dans le surnageant des Cos transfectées. Ce résultat confirme aussi que cet ELISA anti-GST a une plus grande sensibilité que le western blot employé jusque-là. Pour détecter les formes sans GST, nous avons utilisé un autre dosage ELISA, basé sur un coating avec un anticorps anti-FLAG (voir matériel et méthodes). En effet, nous avons préalablement couplé le peptide FLAG à l'extrémité N-Terminale de toutes les formes de CD40L, y compris les GST-CD40L comme expliqué au point précédent. Nous avons alors pu comparer les productions de formes avec et sans GST.

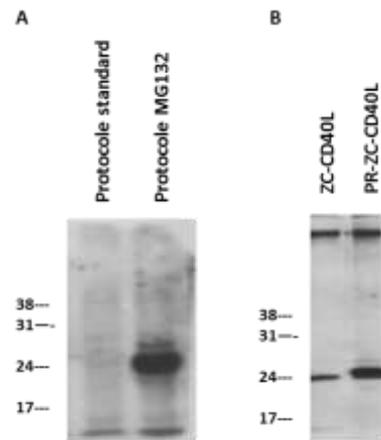


Figure 40: analyse western blot anti-CD40L montrant l'effet du MG132 et du peptide signal sur la production en cellules Cos-7. La figure A montre l'analyse d'extraits de culots de cellules Cos transfectées avec le pcDNA codant pour ZC-CD40L avec et sans MG132. De gauche à droite, échantillon issu de la transfection avec le protocole standard et échantillon issu du traitement avec MG132. La figure B montre, de gauche à droite, l'analyse d'extraits de transfections réalisées sans et avec peptide signal du preprotrypsinogène (PR).

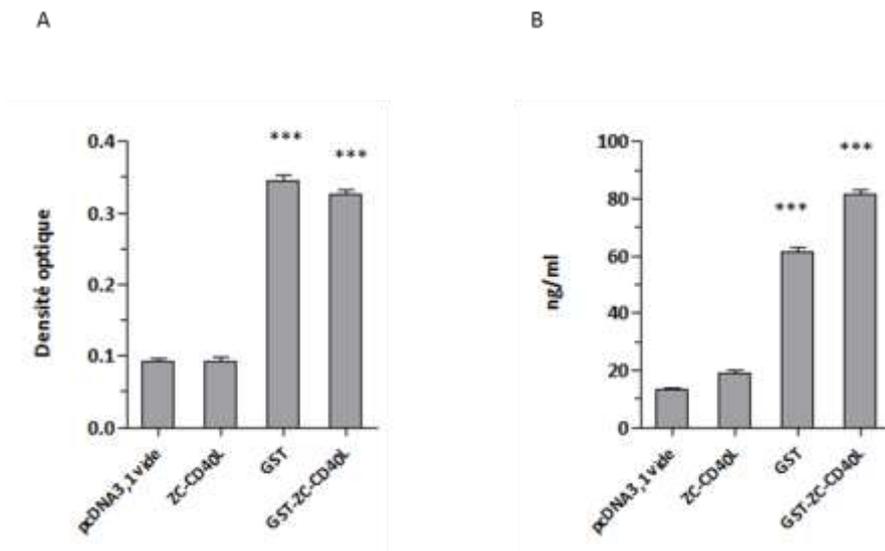


Figure 41: dosage par ELISA anti-GST de surnageants de Cos-7 transfectées. De gauche à droite, transfection réalisée avec contrôle négatif pcDNA vide, puis codant pour ZC-CD40L (second contrôle négatif), GST et GST-ZC-CD40L. La figure A donne les DO obtenues lors du premier dosage réalisé. La figure B donne les concentrations en GST-CD40L évaluées, grâce au dosage simultané d'un échantillon purifié de GST-CD40L de concentration connue. Les *** représentent des DO significativement différentes des contrôles ($p \leq 0,0006$, test de t). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 3 duplicats et sont représentatives de 3 expériences.

RESULTATS

La figure 42 A montre, à gauche un schéma de la technique de détection employée et à droite le résultat du dosage des formes FLAG-GST-CD40L avec un anticorps de détection anti GST. On remarque que tous les dosages d'échantillons issus des formes contenant le GST sont caractérisés par une DO très significativement supérieure ($p \leq 0,0004$; test de t) à celle de l'échantillon FLAG-ZC-CD40L, contrôle négatif ne contenant pas le GST donc non détecté par cet ELISA. Toutes ces formes ont donc bien été produites, avec un maximum de production pour FLAG-GST-ZC-CD40L et FLAG-GST. La figure 42 B rappelle de même, à gauche, le schéma technique et montre, à droite, le résultat du dosage des formes FLAG-CD40L avec l'anticorps de détection anti-CD40L-rm. On remarque que tous les dosages d'échantillons issus des formes contenant le CD40L sont caractérisés par une DO significativement supérieure ($p \leq 0,002$, test de t) à celle de l'échantillon FLAG-GST, contrôle négatif ne contenant pas le CD40. Les 8 formes ont donc bien été produites.

1.2.2.2 Production trop faible

Nous avons commencé par évaluer la quantité de GST-CD40L présente dans les surnageants de Cos-7. Pour cela, du GST-CD40L purifié produit en bactéries a été utilisé comme étalon tel que décrit dans le matériel et méthodes. Les dosages par ELISA des surnageants de cellules Cos transfectées ont montré des concentrations en protéines GST-CD40L d'environ 80 ng/ml (voir figure 41 B) Nous avons alors tenté d'augmenter la concentration de la protéine produite dans le surnageant des Cos-7.

Deux stratégies ont été utilisées : améliorer l'efficacité de la transfection et diminuer le volume de milieu de culture par quantité de cellules. La production a été suffisamment améliorée pour qu'une bande de GST-CD40L apparaisse pour la première fois à l'analyse western blot de la figure 43 A. Après quelques essais supplémentaires, la production de protéine et la sensibilité de notre analyse western blot est devenue suffisante pour observer des bandes de formes CD40L non couplées au GST. La figure 43 B montre ainsi le résultat du western blot anti-CD40L-rm réalisé sur des échantillons de surnageants de Cos transfectées avec les plasmides codant pour CD40L. On voit que les échantillons de surnageants issus des transfections par les 4 plasmides codants pour les formes de FLAG-CD40L montrent tous une bande différente. Aucune bande n'est, par contre, apparue pour l'échantillon issu du contrôle plasmide vide. La figure 43 C montre l'analyse par western blot d'un échantillon de surnageant de Cos transfectées en parallèle avec un échantillon contenant 25 ng de protéine purifiée.

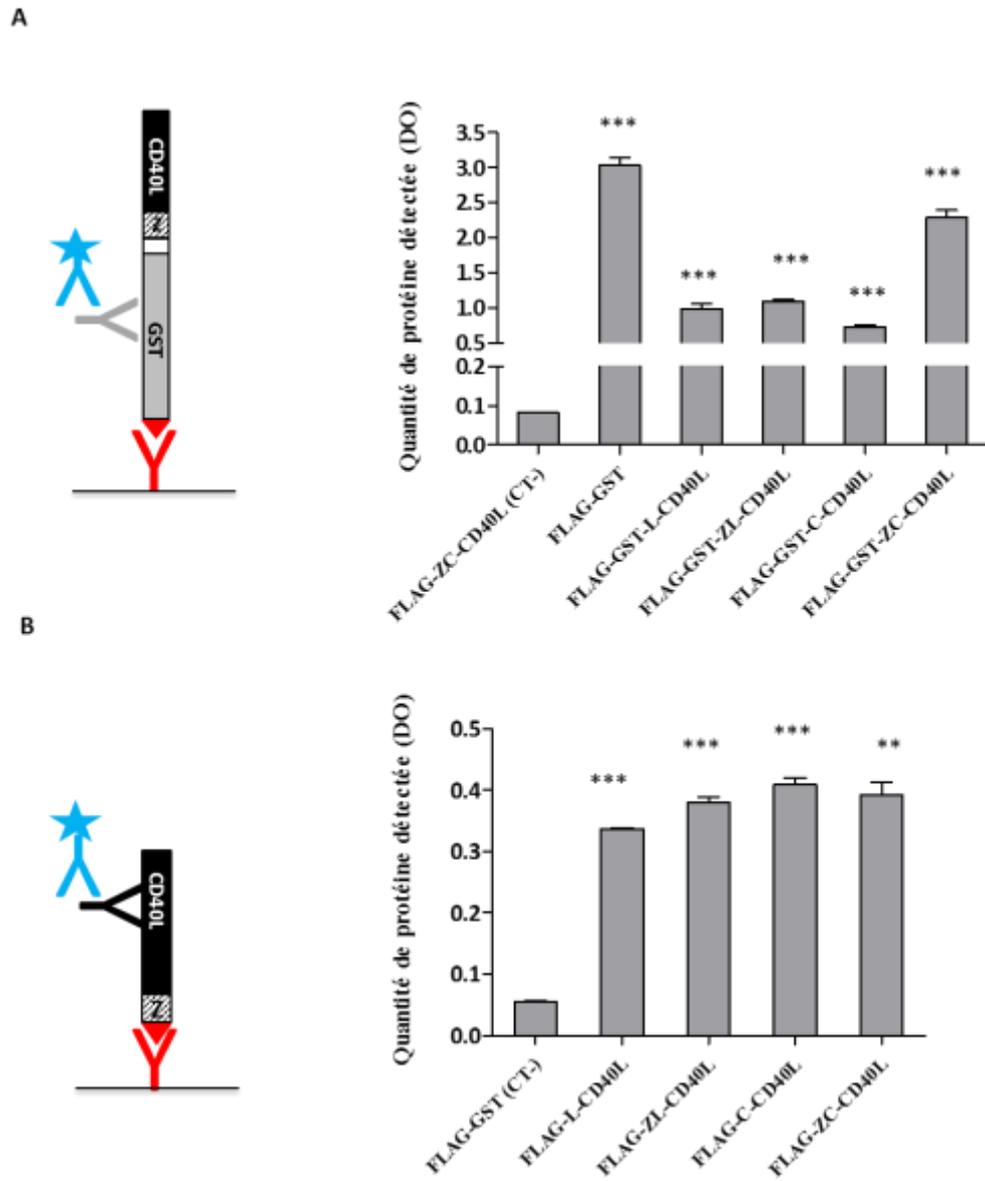


Figure 42: dosage par ELISA anti-FLAG de surnageants de Cos-7 transfectées. La figure A montre les dosages des formes GST avec l'anticorps de détection anti-GST. De gauche à droite, transfection avec pcDNA codant pour CD40L sans GST (contrôle négatif), puis pour la GST, la forme longue, la forme longue avec motif de trimérisation, la forme courte et enfin la forme courte avec motif de trimérisation. La figure B montre le dosage des formes sans GST avec l'anticorps de détection anti CD40L. La GST sert de contrôle négatif et les formes sans GST sont placées dans le même ordre que les formes GST de la figure A. Le ** et les *** représentent des DO significativement différentes des contrôles ($p=0,002$ et $p\leq 0,0004$ respectivement dans le test de t). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 3 expériences indépendantes.

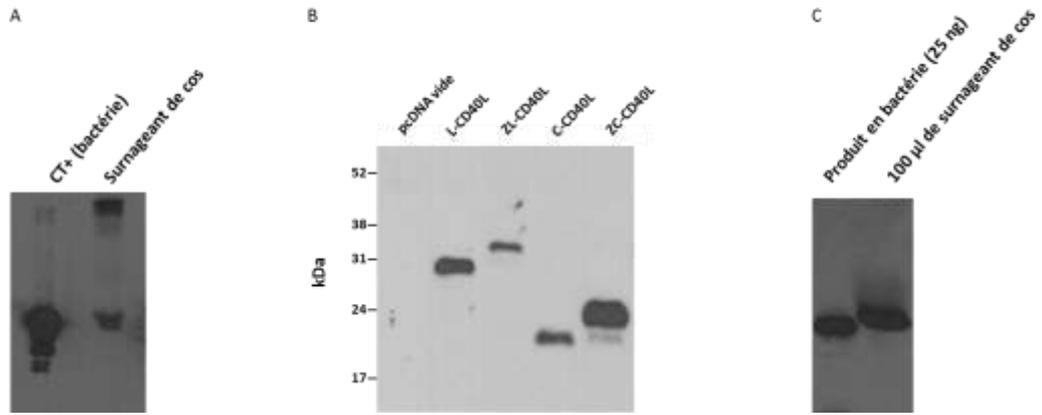


Fig 43: Analyses western blot de surnageants de cellules Cos transfectées et de protéines purifiées. La figure A expose la première analyse par western blot anti-GST d'un échantillon de surnageant de cellules Cos transfectées avec le protocole final de transfection. De gauche à droite, la protéine purifiée servant de contrôle positif et le GST-ZC-CD40L produit en Cos. La figure B montre l'analyse par anticorps anti-CD40L de 5 surnageants de Cos-7 transfectées avec des plasmides vides sur la bande de gauche, ou codant pour les 4 formes de CD40L non couplés à la GST sur le reste de l'image. La figure C compare la bande de GST-ZC-CD40L obtenue par analyse anti-GST d'un surnageant de Cos transfectées (à droite) à la bande obtenue avec une dose connue de protéines purifiées (à gauche).

L'intensité similaire des 2 bandes spécifiques confirme la présence d'environ 25 ng de GST-CD40L par 100 µl de surnageant, c'est-à-dire 250 ng/ml.

1.3 Solutions

La protéine étant dégradée par le protéasome, nous nous sommes alors demandé comment diminuer cette dégradation. Nous avons décidé d'agir sur 2 points pour éloigner notre protéine du protéasome : stimuler sa sécrétion et éviter sa précipitation.

1.3.1 Stimulation de la sécrétion

Stimuler la sécrétion en améliorant l'adressage pour dévier la protéine de sa route vers le protéasome a été le premier point du travail. Nous avons testé à nouveau les 3 peptides signal décrits plus haut, mais en présence d'inhibiteur du protéasome cette fois pour démasquer le peptide le plus efficace. Les 3 peptides testés se sont montrés presque équivalents (donnée non montrée). La figure 40 B montre la production de CD40L en présence du MG132 dans les culots de Cos transfectées avec CD40L en absence, à gauche, ou en présence, à droite, d'un peptide signal. Il faut donc un peptide signal pour augmenter la production, mais le choix de celui-ci ne semble pas crucial. Nous avons gardé pour la suite le peptide signal du preprotrypsinogène qui semblait avoir un léger avantage sur les 2 autres.

1.3.2 Stabilisation de la protéine

Ce sont les protéines instables, mal repliées ou précipitées, qui sont dégradées par la voie du protéasome. Pour améliorer cette stabilité, nous avons produit d'autres constructions plasmidiques : une avec la séquence du CD40L bovin entier (car forme la plus naturelle et de plus transmembranaire), une autre avec la séquence du ligand fusionnée à celle de la protéine du surfactant bovin et une dernière dont la séquence était fusionnée à celle de la GST. Le CD40L entier et le CD40L fusionné avec le surfactant ne furent jamais détectés, même en présence de MG132, ni dans les culots ni dans les surnageants. Les formes fusionnées à la GST ont bien été produites. Nous avons cloné les 4 mêmes formes de GST-CD40L plus la GST décrites pour la production en *E. coli*. Nous avons procédé comme décrit dans le matériel et méthodes pour introduire les séquences d'intérêt dans les plasmides pcDNA3.1⁺. Les cellules Cos ont ensuite été transfectées avec les pcDNA3.1⁺ vides ou codant pour ces 4 formes de GST-CD40L ou GST. Les surnageants et les culots ont enfin été récoltés comme décrit précédemment. L'analyse par western blot anti GST de la figure 44 montre la présence des GST-CD40L et de la GST dans les culots

des Cos transfectées sans MG132. La dégradation des CD40L semblait donc être fortement diminuée par la fusion avec la GST.

1.3.3 Amélioration de la détection

Avant de pouvoir conclure à la nécessité de produire des protéines de fusion GST-CD40L en cellules de mammifères, il restait une question : le GST-CD40L y était-il réellement plus stable et moins dégradé que le CD40L ou était-ce simplement que nous avions un anticorps anti-GST beaucoup plus performant que l'anti CD40L? Le GST-CD40L et le CD40L pourraient en effet être produits et dégradés en quantité identique mais nous ne détecterions que le GST-CD40L grâce à l'anti-GST de très forte affinité. Pour répondre à cette question, nous avons ajouté un peptide FLAG au début de la séquence des CD40L et des GST-CD40L. Ce peptide présente le double avantage de ne pas perturber la fonction de la protéine à laquelle il est associé, car il est de très petite taille (8 aa), et d'être la cible de nombreux anticorps commerciaux très efficaces. La figure 45 présente l'analyse western blot anti-FLAG des culots de Cos transfectées sans MG132 avec les formes FLAG-GST-CD40L (Figure 45 A) et FLAG-CD40L (figure 45 B). Dans la figure 45 A, les tailles attendues pour FLAG-GST-L-CD40L, FLAG-GST-ZL-CD40L, FLAG-GST-C-CD40L et FLAG-GST-ZC-CD40L sont respectivement 54.7, 58.9, 46.7 et 50.8 kDa et correspondent aux bandes observées de gauche à droite. Dans la partie B, les tailles attendues pour FLAG-L-CD40L, FLAG-ZL-CD40L, FLAG-C-CD40L et FLAG-ZC-CD40L sont respectivement 25.3, 29.5, 17.3 et 21.5 kDa et correspondent aux bandes observées de gauche à droite. La production a donc bien lieu pour le CD40L non fusionné à la GST et il ne semble pas y avoir de production supérieure pour les formes GST-CD40L. La dégradation de la protéine d'intérêt dans le protéasome, même si elle demeure conséquente, n'est pas totale et c'est donc un déficit dans notre technique de détection qui était majoritairement responsable de son absence dans les analyses réalisées.

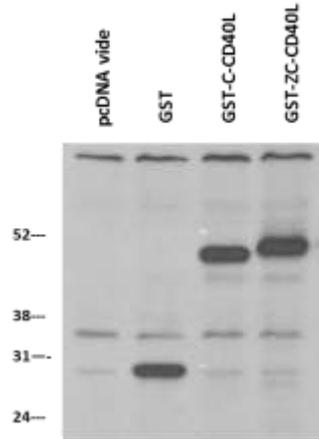


Fig 44: analyses par western blot anti-GST d'extraits issus des transfections avec les pcDNA codant pour les formes GST-CD40L. De gauche à droite, extraits correspondant au pcDNA vide, au pcDNA-GST, au pcDNA-GST-C-CD40L et au pcDNA-GST-ZC-CD40L.

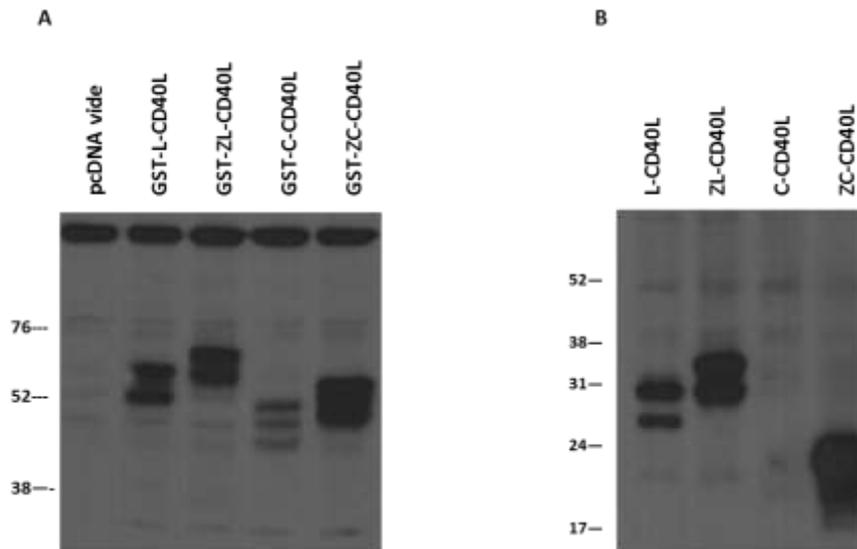


Figure 45: analyse par western blot anti-FLAG d'extraits de culots de cellules Cos transfectées. La figure A montre l'analyse des extraits correspondants aux formes FLAG-GST-CD40L. De gauche à droite, transfection avec pcDNA vide, forme longue, forme longue avec motif de trimérisation, forme courte et forme courte avec motif de trimérisation. La figure B montre les transfections avec les mêmes formes sans GST respectivement de gauche à droite.

RESULTATS

Nous remarquons la présence de 2 bandes dans chaque condition FLAG-CD40L et de FLAG-GST-CD40L. Cela correspond probablement à la glycosylation du site ASN 240 du CD40L. La bande correspondant à la protéine glycosylée présente un poids moléculaire environ 5-7 kDa plus haut que celle de la protéine non glycosylée.

1.3.4 Remarques

1.3.4.1 Comparaison des productions de chaque forme de ligand

La figure 46 A compare les densités optiques (DO) obtenues lors des dosages d'échantillons de surnageants de Cos-7 transfectées avec les formes GST-CD40L ou CD40L dans l'ELISA FLAG. La figure 46 A 1, où l'on utilise un anticorps de détection anti-GST, montre que les quantités de GST-CD40L produites sont similaires pour 3 des 4 formes et que la forme GST-ZC-CD40L est la plus produite. La figure 46 A 2, où on utilise un anti CD40L, montre quant à elle une production identique pour les 4 formes de CD40L. On y remarque cependant un résultat inattendu. En effet, alors que dans la figure 46 A 1, l'échantillon GST-ZC-CD40L semble bien (DO 25 x plus élevée que le contrôle négatif) concentré en protéine, dans la figure 46 A 2 en revanche, la DO détectée pour ce même échantillon est proche de celle du contrôle négatif. Cela est inattendu car l'anti-CD40L est normalement capable de détecter le CD40L lorsqu'il est dans la protéine de fusion GST-ZC-CD40L (vérifié par western blot, donnée non montrée). Une explication possible est l'encombrement stérique occasionné par la GST schématisé par la double flèche grise sur la figure 46 B. La GST pourrait ainsi gêner la fixation de l'anticorps anti CD40L-rm. Le repliement naturellement important du CD40L sur lui-même pourrait en effet expliquer que la partie médiane du CD40L se retrouve contre la partie N-terminale donc contre la GST. Il est donc très difficile, de comparer les quantités produites avec les formes GST par rapport aux formes sans GST. Pour résoudre ce problème nous avons traité, dans une même analyse western blot anti CD40L-rm, des échantillons de CD40L et de GST-CD40L. Cette analyse, plus pertinente car les protéines dénaturées n'induisent plus d'encombrement stérique, a révélé des quantités de protéines très proches (données non montrées). Dès lors, la GST ne semblait donc plus nécessaire à la production en cellules de mammifères.

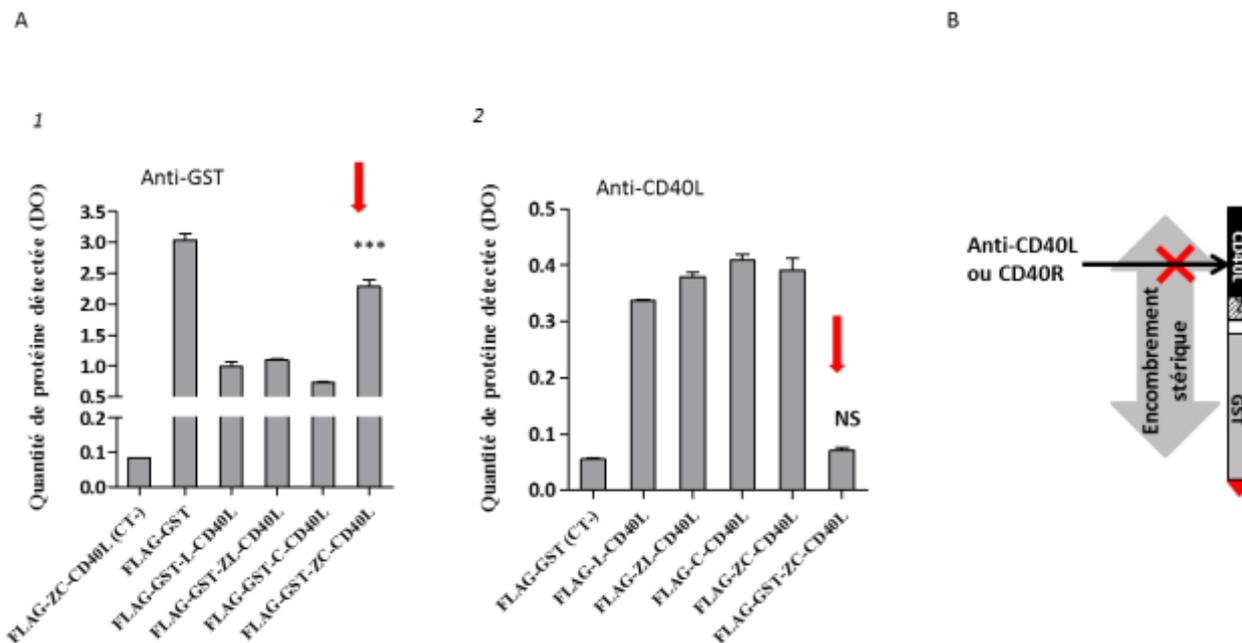


Figure 46 : Effet perturbateur de la GST. La figure A met en parallèle le résultat du dosage par l'ELISA anti-FLAG d'une même protéine GST-CD40L avec anticorps de détection anti-GST (en A1) ou avec anti-CD40L (en A2). Dans les 2 dosages, de gauche à droite, le premier échantillon sert de contrôle négatif et les 4 suivants de contrôle positif de l'expérience. Le dernier est l'échantillon GST-CD40L comparé par les 2 méthodes. Les *** représentent une différence très significative ($p < 0,0001$ dans le test de Student). La figure B schématise l'interaction potentielle de la GST avec les anticorps anti-CD40L ou le récepteur CD40. Les données présentées en A et B sont les valeurs moyennes \pm SD de 4 puits de culture analysés en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

1.3.4.2 Solubilité de la protéine du surnageant vs protéine du culot

Afin de mieux comprendre la répartition des CD40L retrouvés dans les culots et les surnageants des cellules Cos, nous avons analysé ces 2 fractions dans un même test. Nous avons alors réalisé une lyse cellulaire avec le tampon non dénaturant utilisé pour l'extraction en bactéries, mais non complétement en lysozyme. Le résultat exposé à la figure 47 est une nouvelle fois interpellant. On voit en effet qu'après transfection avec plasmide codant pour GST ou GST-CD40L, bien que les 2 protéines soient présentes tant dans le surnageant que dans le culot (vérifié par extraction dénaturante avec SDS), la solubilisation dans un tampon non dénaturant du GST-CD40L contenu dans le culot est impossible. En revanche, cela ne pose aucun problème pour la GST seule. Le GST-CD40L semble donc produit sous 2 formes : l'une soluble dans le surnageant et l'autre insoluble dans le culot. L'explication pourrait être un mauvais repliement d'une partie des protéines produites. Les protéines mal repliées précipiteraient alors à l'intérieur des cellules et se retrouveraient dans les culots. Les protéines bien repliées seraient sécrétées solubles dans le surnageant.

2 Evaluation de la structure quaternaire

La figure 48 montre l'analyse par western blot de surnageants de cellules transfectées avec des plasmides pVAX codant pour CD40L. La figure 48 A compare l'analyse western blot de ZC-CD40L réalisée après SDS-PAGE, à gauche, et après électrophorèse native à droite. En SDS-PAGE, le ZC-CD40L est représenté par une seule bande de 21 kDa (flèche simple en pointillé). Comme déjà expliqué dans la partie « production en bactéries », en électrophorèse native, la préservation des liaisons faibles intermoléculaires permet la formation de multimères représentés par plusieurs (au moins 4) bandes de haut poids moléculaire (flèches simples continues). Encore une fois, la présence de ces multimères est un présage d'efficacité du ligand produit (Stone *et al.*, 2006). La figure 48 B compare le surnageant contrôle, le ZL-CD40L et le ZC-CD40L en électrophorèse native. On remarque qu'aucune des 4 bandes (flèches simples continues) observées dans chaque échantillon de CD40L n'apparaît dans le contrôle, ce qui prouve que chaque bande est composée de CD40L. De plus, chaque bande de l'échantillon de ZL-CD40L a une masse moléculaire supérieure à la bande correspondante du ZC-CD40L.

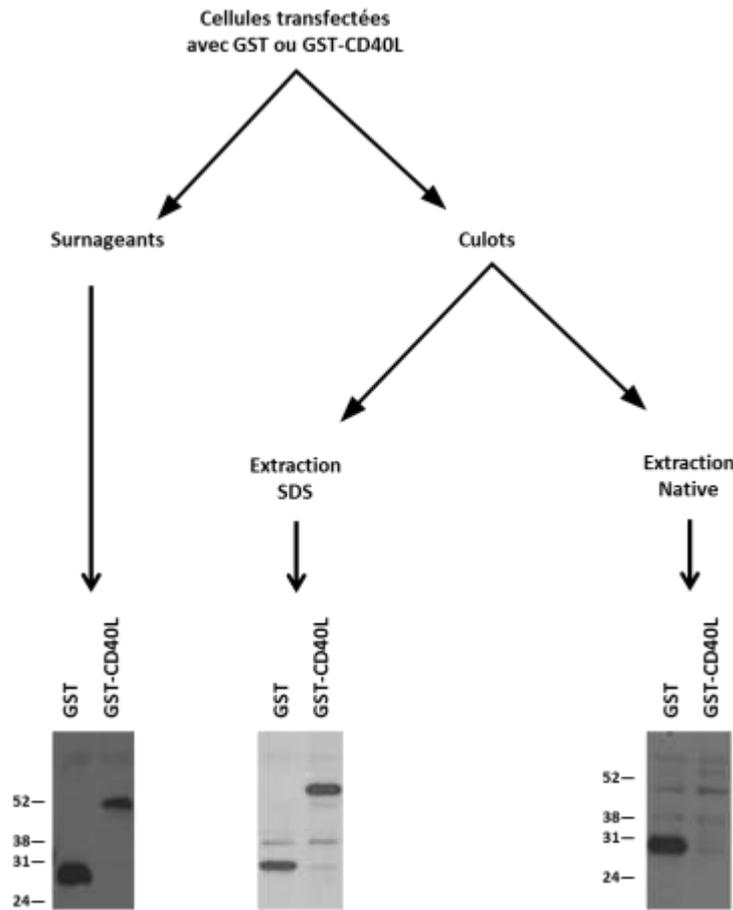


Figure 47: Analyses western blot anti GST des extractions natives de GST et de GST-CD40L depuis les culots de Cos-7. De gauche à droite, les images western blot montrent respectivement les échantillons de surnageants de culture, d'extractions SDS et enfin d'extractions natives des culots cellulaires des Cos transfectées avec GST (à gauche de chaque image) et GST-CD40L (à droite).

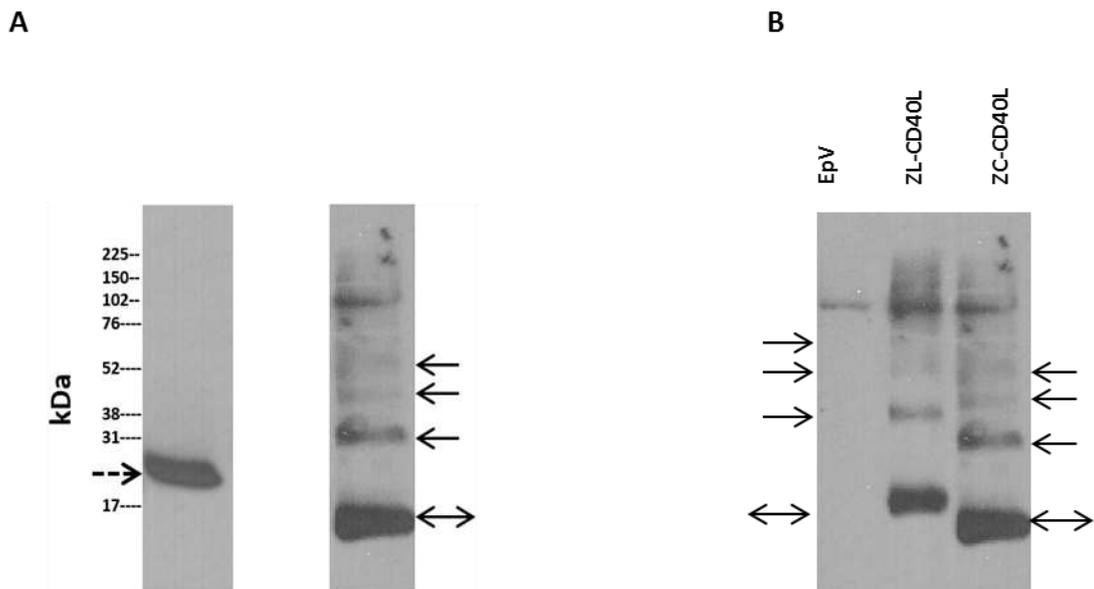


Fig 48: Analyse par Western blot anti-CD40L montrant la multimérisation des CD40L produits en cellules Cos-7. Les flèches pointillées et continues représentent respectivement les formes monomériques et multimériques des CD40L. A. Comparaison entre les analyses en conditions dénaturantes SDS-PAGE à gauche et non dénaturantes (NATIVE-PAGE) à droite du ZC-CD40L. B. Analyse en condition non dénaturante (NATIVE-PAGE) de surnageants de Cos-7 transfectées avec des plasmides pVAX vides (EpV), codant pour ZL-CD40L ou ZC-CD40L.

Cette augmentation graduelle et proportionnelle à la taille théorique du monomère correspondant prouve que chaque bande représente une association d'un nombre déterminé de monomères. On signalera enfin que la bande de plus petit poids moléculaire (double flèche continue) peut être un monomère ou un multimère car l'électrophorèse native ne permet pas d'estimation précise du poids. La présence des multimères n'a pas été retrouvée pour les formes dépourvues du motif de trimérisation (données non montrées).

3 Sélection des formes activant le mieux les cellules bovines

Nous avons vérifié l'activité des ligands produits en cellules de mammifères dans les 2 tests fonctionnels décrits dans le matériel et méthodes et déjà utilisés pour les productions en bactéries. Nous remarquerons ici que le 2^{ème} test fonctionnel (activation des lymphocytes B bovins) n'est pas utilisé comme test de screening mais comme moyen supplémentaire de valider les formes présélectionnées par le test MCP-1.

3.1 Les protéines couplées au GST

3.1.1 Preuve d'une activité diminuée par la fusion avec le GST

La figure 49 A montre la production de MCP-1 dans les surnageants de cellules endothéliales bovines après stimulation avec du LPS ou des surnageants de Cos-7 transfectées avec les plasmides vides ou codant pour les 4 formes de CD40L ou les 4 formes de GST-CD40L. La stimulation induite par le LPS sert de contrôle positif et atteste de la bonne réactivité des cellules endothéliales de ce test, le milieu RPMI seul indique le niveau de production basal. On remarque que si chacune des 8 formes induit une stimulation nettement supérieure à celle du contrôle vide, en revanche, les formes couplées au GST sont significativement ($p \leq 0,001$) moins efficaces que leurs homologues non couplés.

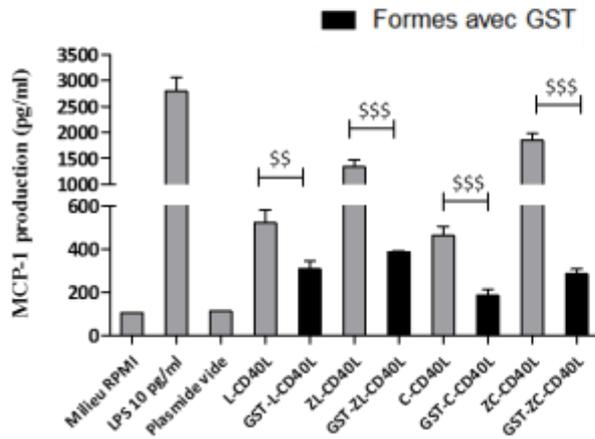
3.1.2 Explication possible

Il est envisageable que la GST, par sa taille importante puisse diminuer la fixation du ligand sur son récepteur. On remarque d'ailleurs sur la figure 49 A que la forme GST-C-CD40L est moins efficace que toutes les autres. Or cette forme est celle dans laquelle la proportion de la masse de GST par rapport à la masse totale est la plus importante. En effet, il s'agit d'une part de la plus petite séquence de CD40L testée et d'autre part de la forme où la séquence de trimérisation est absente. Il est donc possible que, pour cette forme, la GST encombre un nombre important de sites nécessaires à l'activité du CD40L, du moins plus important que pour les formes plus longues ou éloignées de la GST par la séquence de trimérisation qui sépare les 2 protéines. Sur la figure 49 A, il semble également que plus la forme couplée au GST est courte, moins elle est active, ce qui corrobore cette hypothèse. De plus, comme nous l'avons déjà vu sur la figure 46, la GST empêchait nettement la fixation de l'anticorps de détection du CD40L. L'analyse de Singh et collaborateurs (1998) du CD40L humain qui montre que la boucle au niveau de la lysine 143 est cruciale dans la liaison avec le récepteur CD40 et qu'elle est proche de la partie N terminale corrobore cette hypothèse. On remarque au passage que cette boucle fait partie de la séquence reconnue par l'anticorps anti-CD40L utilisé, son recouvrement par la GST empêcherait donc à la fois la fixation du récepteur et de l'anti-CD40L. Il y a donc une grande probabilité pour que la GST masque une partie du site actif du CD40L et empêche son fonctionnement. Les formes couplées au GST ont donc été abandonnées.

3.2 Formes avec et sans motif de trimérisation

Si nous retournons une fois de plus à la figure 49 A, on remarque que les formes avec motif de trimérisation semblent stimuler les cellules endothéliales plus fortement que les formes simples. Nous avons décidé de vérifier ce phénomène dans les 2 tests fonctionnels disponibles afin d'éliminer les formes les moins efficaces.

A



B

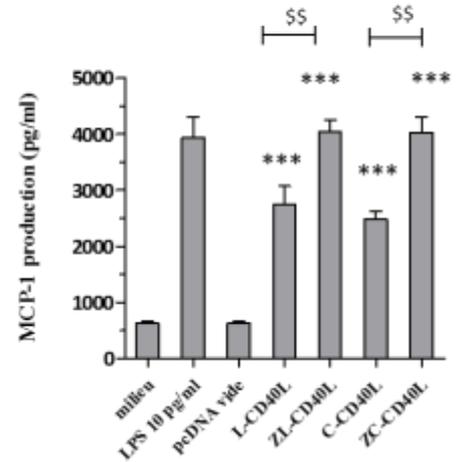


Figure 49: Mesure de la production de MCP-1 des cellules BAEC stimulées avec les protéines recombinantes produites en cellules Cos-7. Figure A. De gauche à droite, la stimulation induite par les contrôles milieu seul, LPS, plasmide vide, puis les 4 formes CD40L (en gris) avec leur forme jumelle respective couplée au GST (en noir). Les \$\$ représentent une différence significative ($p=0,001$ dans le test de student). Les \$\$\$ représentent une différence très significative ($p\leq 0,0001$ dans le test de student). La figure B montre l'effet des formes couplées au motif de trimérisation (Z) sur la production de MCP-1. \$ représente un effet significatif des formes avec Z par rapport aux formes sans Z. Le * est utilisé pour comparer à l'effet du plasmide vide. Les \$\$ représentent une différence significative ($p\leq 0,0042$ dans le test de Student). Les *** représentent une différence très significative ($p\leq 0,0002$ dans le test de Student). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 4 puits de culture analysés en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

3.2.1 Comparaison des formes par le test de stimulation des cellules endothéliales

La figure 49 B compare les productions de MCP-1 des cellules endothéliales bovines stimulées avec les surnageants de cellules Cos7 transfectées avec les plasmides vides ou codant pour les 4 formes de CD40L associées ou non au motif de trimérisation. La stimulation induite par le LPS sert de contrôle positif et atteste de la bonne réactivité des cellules endothéliales de ce test, le milieu RPMI seul indique le niveau de production basal. On note que tous les CD40L stimulent significativement plus les cellules que le contrôle vide. On remarque ensuite que les formes avec motif de trimérisation induisent une production de MCP-1 significativement plus élevée ($p \leq 0,0042$ dans le test de Student) que les autres formes. Ce nouveau résultat semble confirmer l'hypothèse d'une plus grande efficacité des formes associées à l'isoleucine.

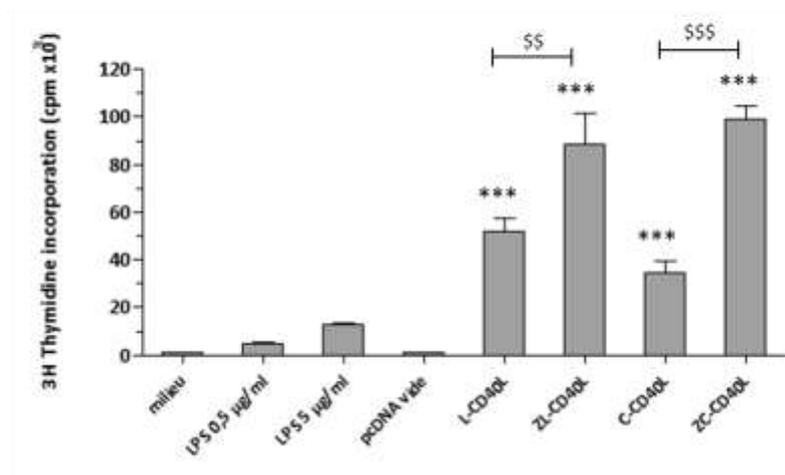
3.2.2 Comparaison des formes par le test de prolifération-agrégation des lymphocytes B

Les surnageants de Cos transfectées avec les plasmides codant pour CD40L ont ensuite été soumis au test de stimulation des lymphocytes B. Les lymphocytes B bovins ont été isolés comme décrit dans le matériel et méthodes puis cultivés pendant 72 h en présence d'IL-4 et de surnageants de Cos-7 contenant différentes formes de CD40L puis pendant 18 h en présence de thymidine tritiée. La figure 50 A montre la prolifération, évaluée grâce à l'incorporation de thymidine tritiée, de ces lymphocytes B ainsi cultivés. Deux doses différentes de LPS sont utilisées comme contrôle positif global de l'expérience. On remarque une fois de plus que toutes les formes induisent une prolifération très significativement supérieure ($p < 0,0001$) à celle induite par le contrôle plasmide vide. Cette fois encore, le test est significativement en faveur ($p < 0,001$) des formes avec motif de trimérisation. La supériorité des CD40L fusionnés à l'isoleucine, toujours reproductible et ce dans 3 tests d'activation différents nous a finalement incité à ne conserver que ces formes. La figure 50 B permet quant à elle de visualiser l'agrégation provoquée par la stimulation des lymphocytes B avec CD40L. On voit sur ces photographies de microscopie optique que les 4 formes de CD40L induisent cette agrégation (présence de gros amas sphériques). Le LPS, même à très forte dose ($5 \mu\text{g/ml}$), n'induit aucune agrégation. Celle-ci n'est donc due qu'à la stimulation spécifique du récepteur CD40.

4 Choix du plasmide d'expression

Nous avons cloné les CD40L dans 2 vecteurs d'expression différents : le pcDNA3.1⁺ et le pVax. En réalité, nous avons commencé par le pcDNA3.1⁺ puis essayé d'autres plasmides (que nous ne détaillons pas dans ce travail) au moment où nous n'obtenions rien ni dans les culots ni dans les surnageants. La première apparition de la protéine dans le culot a été obtenue dans un de ces autres plasmides mais nous avons immédiatement compris que ce succès n'était pas dû au plasmide mais à l'inhibiteur du protéasome utilisé pour la première fois. Nous avons alors continué les clonages dans le pcDNA3.1⁺ avec lequel nous avons amélioré la production jusqu'au niveau actuel, c'est-à-dire avec suffisamment de protéines dans le surnageant pour qu'elles soient visibles en western blot. Ces protéines étaient, de plus, actives dans les 2 tests fonctionnels. Une fois ces analyses *in vitro* devenues satisfaisantes, nous avons cloné les 8 formes de ligand dans le plasmide pVAX censé favoriser la vaccination ADN. La figure 51 compare l'efficacité des protéines produites en pVAX par rapport à celles produites en pcDNA. Seules les formes avec motif de trimérisation et non couplées au GST sont montrées. Comme sur les figures 46, 49 et 50, le LPS est utilisé comme contrôle positif global de l'expérience et induit une production de MCP-1 significativement supérieure à celle des contrôles négatifs. Les surnageants issus des transfections par les plasmides pcDNA (en gris) ou pVAX (en noir) induisent une stimulation significativement plus forte des cellules endothéliales que les surnageants issus des transfections par les pcDNA et pVAX vides, contrôles négatifs. Par contre, lorsque l'on compare les stimulations par les surnageants de transfections issus des plasmides pcDNA et pVAX, on constate une efficacité identique. On a en effet aucune différence significative entre les pVAX et pcDNA des formes courtes et une différence tout juste significative ($p=0,0468$) entre les formes longues. Le plasmide pcDNA3.1⁺ a donc été abandonné au profit du pVAX plus prometteur pour les tests *in vivo* futurs. Il convient de signaler que toutes les expériences décrites dans les figures 46, 49 et 50 ont été à nouveau réalisées pour les CD40L clonés en pVAX et ont donné des résultats identiques. Le type de plasmide n'a donc pas d'impact sur la fonction de notre CD40L *in vitro*. Une légère différence a néanmoins été observée au niveau du rendement de la production en cellules Cos-7, avec un avantage pour le pcDNA3.1⁺ (donnée non montrée nettement observée en western blot). Ce phénomène était néanmoins prévisible, le pcDNA contenant le promoteur précoce et l'origine de réplication du SV40 et les cellules Cos-7 exprimant l'antigène T du SV40.

A



B

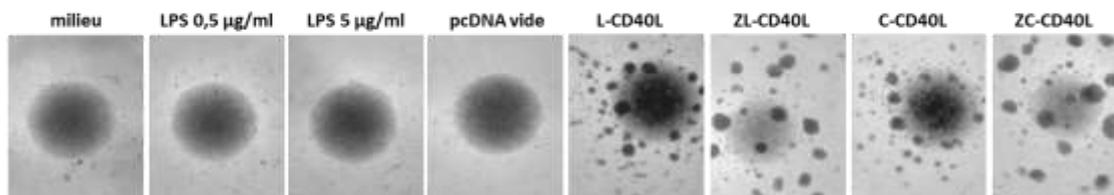


Figure 50. Activation des lymphocytes B bovins par les CD40L recombinants produits en cellules Cos-7. A. Prolifération après stimulation avec, de gauche à droite: milieu, 0,5 µg de LPS, 5 µg de LPS, surnageants de cellules Cos-7 transfectées avec des plasmides vides puis codant pour L-CD40L, ZL-CD40L, C-CD40L, et ZC-CD40L. Les *** représentent une différence significative ($p \leq 0,0009$) dans le test de Student. Les données représentent les valeurs moyennes \pm SD de 6 puits de culture et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. B. Agrégation des lymphocytes B stimulés comme en A. Les \$\$ représentent une différence significative ($p = 0,0018$ dans le test de Student). Les *** et \$\$\$ représentent une différence très significative ($p \leq 0,0001$ dans le test de Student). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 6 puits de culture et sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

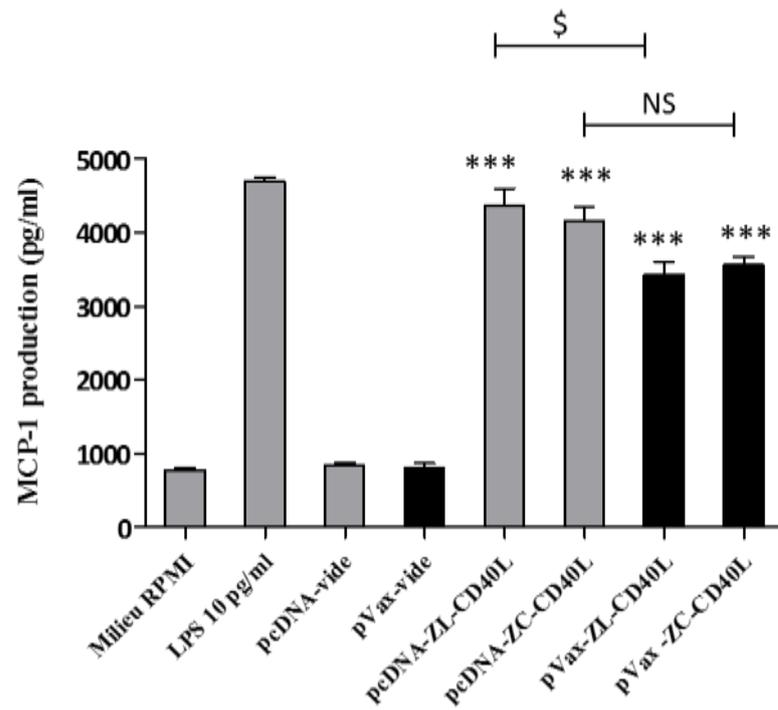


Figure 51. Comparaison de la production de MCP-1 induite par les 2 formes de CD40L avec motif de trimérisation en pcDNA (gris) et en pVax (noir). De gauche à droite, la stimulation induite par le milieu seul, le LPS, le pcDNA vide, le pVax vide puis les 2 formes longues, puis enfin les 2 formes courtes en pcDNA et pVax. Le \$ représente une différence significative ($p=0,0468$ dans le test de student). Les *** représentent une différence très significative ($p\leq 0,0001$ dans le test de Student). Les données représentent les valeurs moyennes \pm SD de 2 puits de culture analysés chacun en duplicat et sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

CHAPITRE 3 : EVALUATION DE LA REPONSE INDUITE PAR L'INJECTION SIMULTANEE DE STAPHYLOCOQUES TUES ET DE GST-CD40L CHEZ LE BOVIN

1 Production d'une dose raisonnable d'adjuvant purifié

Nous avons choisi la dose à injecter sur base de ce qui était utilisé notamment chez l'homme où 0,1 à 0,3 mg de CD40L/kg est une dose moyenne lorsqu'on recherche un effet systémique (Vonderheide *et al.*, 2001). Ainsi, et tenant compte de la taille de la vache, des différences métaboliques avec l'homme et de l'effet principalement local recherché, nous avons fixé la dose totale à 30 à 50 mg par immunisation et par génisse, divisé en 2 zones d'injection. Au moment où nous avons décidé de réaliser ces immunisations, le rendement optimal obtenu était de 1 mg de GST-CD40L par colonne de purification. C'est là que nous avons mis au point le dernier protocole de production-purification détaillé dans le matériel et méthode qui a permis d'obtenir 4 à 5 mg de GST-CD40L par colonne de purification. En utilisant 10 à 12 colonnes simultanément, il était désormais possible de produire jusqu'à 50 mg de protéine recombinante par session de purification soit 100 mg par semaine.

2 Informations apportées par le premier test *in vivo*

La première série d'immunisations comprenait 3 injections réparties sur 6 semaines, près du nœud lymphatique précrural, de GST + HKSA à 2 génisses et de GST-CD40L + HKSA à 2 autres génisses. Elle a été réalisée sur les génisses du groupe B et n'a pas démontré d'effet net du CD40L *in vivo*. Le test a cependant apporté quelques informations quant aux réponses immunitaires que pouvait induire la dose choisie de HKSA. Les informations les plus intéressantes sont détaillées ci-dessous.

2.1 Symétrie sagittale des nœuds lymphatiques du bovin

Les mesures de poids réalisées sur les nœuds lymphatiques précruraux et préscapulaires des 4 génisses du groupe B ont apporté une information rassurante pour la suite de l'expérience. En effet, comme le montre la figure 52, les ganglions droits et gauches semblent identiques à l'état basal. De plus, tant que le produit injecté est le même, la réponse des 2 ganglions est la même. Le ganglion controlatéral pourra donc tout à fait être utilisé comme contrôle dans la seconde expérience sur le groupe C.

2.2 Réponse humorale

La génisse du groupe A n'a pas reçu de traitement et a juste subi des prises de sang pour doser ses anticorps contre HKSA. Pour rappel, les 2 génisses B « GST » ont reçu 1 injection de la première préparation contrôle (2.10^{10} CFU de HKSA associé à 25 mg de GST, le tout re-suspendu dans 62 ml de tampon d'élution) dans chaque flanc au jour 1, au jour 21 et au jour 42. Les 2 génisses B « GST-CD40L » ont reçu la première préparation active (2.10^{10} CFU de HKSA associé à 25 mg de GST-CD40L, le tout re-suspendu dans 62 ml de tampon d'élution) selon le même procédé. Le sérum des génisses a été prélevé avant la première immunisation, 7 jours après la deuxième immunisation et 7 jours après la troisième. La figure 53 montre l'augmentation de la réponse humorale contre HKSA au cours du protocole expérimental. La figure 53 A donne les ratios des concentrations en IgG sériques spécifiques de HKSA au J28 et au J49 par rapport au J0 pour la génisse du groupe A et les 4 génisses du groupe B. On remarque que les génisses du groupe B ont développé une réponse humorale composée d'IgG spécifiques de HKSA contrairement à la génisse A non immunisée. On ne constate cependant pas de différence significative entre les génisses traitées avec GST-CD40L et celles traitées avec le contrôle GST. On observe le même résultat pour les IgG2 spécifiques de HKSA sur la figure 53 B.

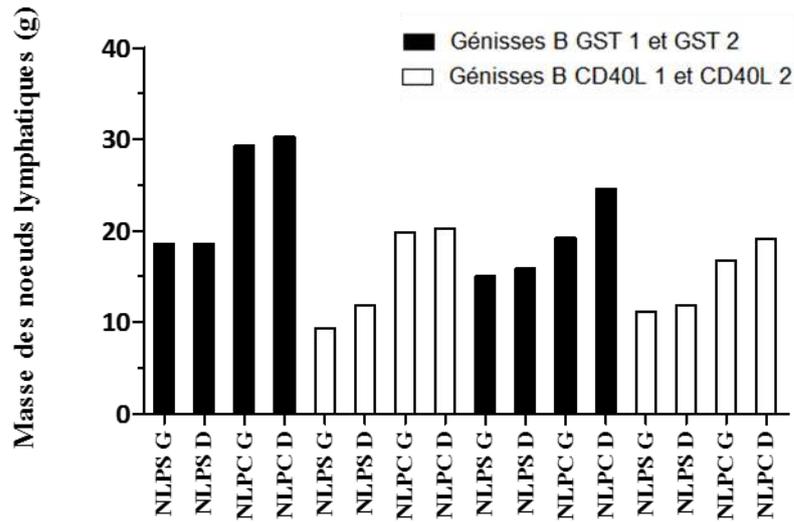


Figure 52: Relevé des masses, exprimées en g, des 2 NLPS contrôles et des 2 NLPC des 4 génisses du groupe B le jour du sacrifice. De gauche à droite, le NLPS gauche, le NLPS droit, le NLPC gauche et le NLPC droit de la première génisse B GST, puis ainsi de suite pour la première génisse B CD40L puis la seconde génisse B GST et enfin la seconde génisse B CD40L.

2.3 Réponse cellulaire locale

Les nœuds lymphatiques précuraux (NLPC) ainsi que les nœuds lymphatiques préscapulaires (NLPS) non injectés (servant de contrôle négatif intra vache) des 4 génisses du groupe B ont été récoltés au J49 et analysés. Aucune différence significative n'a été constatée entre le rapport des poids des NLPC/ NLPS des génisses contrôles B GST et celui des génisses B CD40L (figure 54 A). De même, les rapports NLPC/NLPS de comptes cellulaires totaux ainsi que les proportions de LTCD4⁺ et de LTCD8⁺ n'étaient pas différents entre GST et CD40L (données non montrées). Enfin, comme on le voit sur la figure 54 B, la re-stimulation *in vitro* avec HKSA des cellules des NL récoltés a montré que les cellules des NLPC proliféraient 4 à 6 fois plus que les cellules des NLPS, mais toujours sans différences entre GST et CD40L. Tous ces résultats prouvent que les injections ont bien entraîné une réponse contre HKSA, mais que cette réponse n'a pas été plus forte pour les génisses CD40L que pour les génisses contrôle GST.

3 Compréhension du problème

Cet échec peut avoir 3 explications. Soit (1) ce CD40L n'est pas actif *in vivo*, soit (2) quelque chose l'empêche d'atteindre les cellules immunitaires (biodisponibilité nulle), soit (3) il a une efficacité légère mais des variations dans le rapport NLPC/NLPS de chaque génisse (effet génisse) sont suffisamment fortes à l'état basal pour masquer cette efficacité. Si l'on parvient à éliminer les problèmes (2) et (3) on peut valider ou invalider l'hypothèse (1). Ce sera l'objet des 2 points suivants.

3.1 Elimination de « l'effet génisse »

Pour se débarrasser du problème (3) il fallait pouvoir tester le GST-CD40L et le contrôle GST sur la même génisse. Cela était théoriquement possible puisque nous nous intéressions en priorité à l'effet local. Il restait cependant un doute si l'on injectait d'un côté de la génisse le contrôle et de l'autre le CD40L : le CD40L injecté pouvait-il circuler et atteindre le nœud lymphatique controatéral ? On comprend aisément que, dans ce cas, la réponse risquait d'être la même dans les 2 nœuds lymphatiques et que l'expérience serait alors inutile.

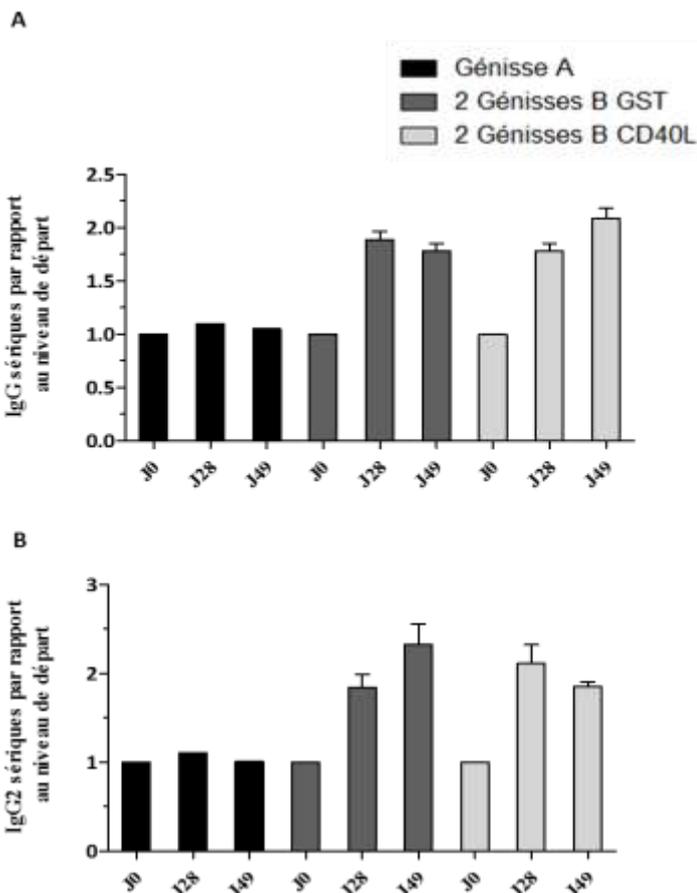


Figure 53: Ratio des concentrations en anticorps sériques contre HKSA au J28 et au J49 par rapport au J0 pour la génisse du groupe A et les 4 génisses du groupe B. La figure A donne les ratios pour les IgG spécifiques. De gauche à droite, les ratios aux jours 0, 28 et 49 pour la génisse A, les ratios aux jours 0, 28 et 49 pour les Génisses B GST et les ratios aux jours 0, 28 et 49 pour les Génisses B CD40L. La figure B donne les mêmes informations appliquées aux IgG2 spécifiques. Les données représentent les moyennes \pm SD de 2 génisses.

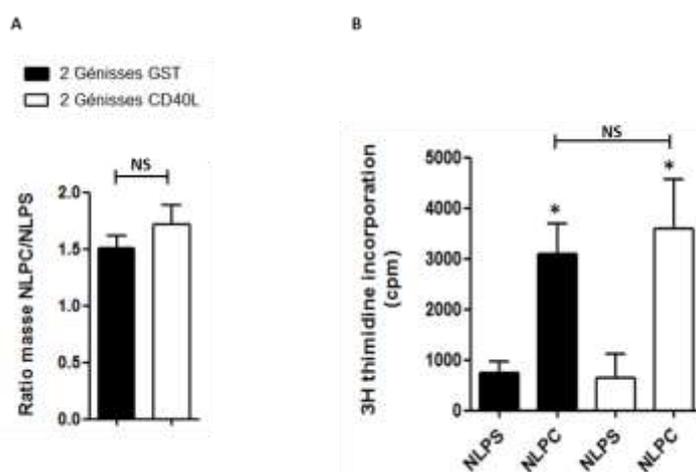


Figure 54. Ratios de masse NLPC/ masse NLPS des génisses B GST et B CD40L et proliférations cellulaires *in vitro*. La figure A montre les ratios masse NLPC/ masse NLPS des génisses B GST (noir) et B CD40L (blanc). La figure B compare les proliférations après stimulation *in vitro* des cellules issues des NLPC des génisses vaccinées avec GST (noir) ou avec GST-CD40L (blanc). Les proliférations des cellules issues de leurs NLPS respectifs sont utilisées comme contrôle interne. Les * représentent une différence significative ($p=0,045$ dans le test de Student) par rapport au contrôle NLPS. Les données représentent les moyennes \pm SD de 2 génisses.

Cependant, comme dans le groupe B, la prolifération après restimulation avec HKSA *in vitro* des ganglions préscapulaires contrôles était 4 à 6 fois plus faible que celle des ganglions précuraux déjà stimulés *in vivo*, nous savions que les antigènes injectés au niveau précural n'avaient pas ou peu atteint les ganglions préscapulaires. Nous avons alors supposé qu'il pouvait en être de même pour l'adjuvant GST-CD40L et avons finalement décidé d'injecter à gauche le CD40L⁺ HKSA et à droite le contrôle GST⁺ HKSA pour chacune des 3 génisses restantes (groupe C).

3.2 Hypothèse de la biodisponibilité nulle

La très grande efficacité de notre CD40L sur les cellules bovines lors des tests *in vitro* semblait peu compatible avec l'absence totale d'effet observé *in vivo*. Nous avons alors pensé que le GST-CD40L n'arrivait probablement pas à atteindre les cellules immunitaires cibles. Peut-être était-il détruit ou séquestré sur le site d'injection sans pouvoir rejoindre le flux lymphatique. Deux hypothèses étaient alors envisageables : la destruction par le système immunitaire ou une précipitation pure et simple du GST-CD40L devenu insoluble pour une raison inconnue.

3.2.1 Hypothèse de la destruction par le système immunitaire

L'opsonisation de toutes les protéines GST-CD40L injectées par des anticorps anti-GST paraissait peu probable car la vache ne peut logiquement pas posséder à l'état naïf une quantité d'anticorps anti-GST suffisante. Le phénomène aurait dû être marginal et silencieux lors de la première injection et même si cela s'était produit à la seconde injection, un effet du GST-CD40L aurait dû persister jusqu'au sacrifice.

3.2.2 Hypothèse de la précipitation au niveau du site d'injection

Cette hypothèse, par contre était de loin la plus plausible, surtout si l'on se souvient des problèmes de solubilité rencontrés tout au long du travail.

3.2.2.1 Fondements théoriques et précision de l'hypothèse

Une fois injecté, le GST-CD40L est théoriquement dans le compartiment extracellulaire, plus précisément le liquide interstitiel, maintenu à pH 7,4 par le tampon bicarbonate et contenant 150 mM de NaCl et 20g albumine /l. Nous savions déjà que le rendement de production du GST-CD40L était diminué de plus de 50% lorsqu'on réalisait la purification sur colonnes d'affinité pour la GST à pH 7 (figure 56 A) et que de manière globale la protéine supportait mal les diminutions de pH. Or, comme nous l'avons expliqué dans le matériel et méthodes, la protéine

est stockée dans un tampon Tris faiblement concentré (20 mM) à pH 8,6. Le tampon de stock étant faiblement concentré, il est probablement supplanté par le tampon du milieu interstitiel lors de l'injection et la protéine se retrouve très rapidement à pH 7,4. Il faut signaler que cela est un choix délibéré, visant à éviter de perturber l'homéostasie et le confort de la génisse lors de l'injection. La perte de 50% de la protéine ne paraît pas dramatique à priori, cependant la dynamique des fluides dans les compartiments liquidiens impliquait la prise en compte d'un facteur supplémentaire : la concentration du ligand. Nous avons émis l'hypothèse que la majorité du tampon constituant le vaccin injecté était sans doute trop vite réabsorbé par le compartiment lymphatique et sanguin. Seuls les antigènes et les protéines recombinantes, logiquement moins diffusibles, restaient alors sur place. Cela ne posait probablement pas de problème pour l'antigène HKSA qui restait disponible dans la zone d'injection, mais était beaucoup plus gênant pour le GST-CD40L qui, dépassant sa concentration maximale de solubilité, devait précipiter et devenir inefficace.

3.2.2.2 Vérification

Un échantillon du pool de GST-CD40L, de concentration 0,4 mg/ml et de pH 8,6, prêt à être incorporé au mélange vaccinal a subi les modifications expérimentales expliquées dans le matériel et méthodes afin de réaliser une modélisation de la solubilité du ligand après injection. Le résultat est donné par la figure 55. On remarque qu'à pH 8,6, aucune protéine ne précipite quelle que soit la concentration ou la présence de protéine porteuse (BSA). A pH 5,6, par contre, la totalité du GST-CD40L non dilué (0,4 mg/ml) précipite (98%). Il faut signaler que cette valeur n'est pas seulement relative, en effet absolument tout le GST-CD40L était précipité car le dosage par méthode de Bradford du surnageant de cette condition donnait exactement 0,000 mg/ml. En revanche, lorsque, tout en restant à pH 5,6, on passe aux conditions diluées ou diluées avec protéine porteuse, on constate que la précipitation diminue : 85 % de précipitation pour la condition diluée et 72 % pour celle diluée avec protéine porteuse. Mais les résultats les plus intéressants pour la vaccination sont bien sûr ceux obtenus au pH que le GST-CD40L doit normalement rencontrer sur le lieu de l'injection, c'est-à-dire 7,4. Dans ce cas, alors que le GST-CD40L non dilué précipite à près de 57%, seul 37% du GST-CD40L dilué 4 fois et surtout seulement 16% de celui dilué avec protéine porteuse précipitent. Le résultat de ce modèle semble confirmer notre intuition en apportant la preuve qu'à la concentration de travail, la protéine déjà purifiée précipite de plus de moitié lorsqu'on la place au pH physiologique. En effet, jusqu'ici nous n'avions vérifié l'effet délétère d'une diminution de pH que lors de l'étape d'éluion sur les colonnes de purification. Il n'était pas certain que cet effet se retrouverait pour un GST-CD40L ayant terminé le processus de purification. Comme c'est bien le cas, cela appuie l'hypothèse faite

RESULTATS

plus haut selon laquelle si la concentration de GST-CD40L augmentait au site d'injection suite à la réabsorption rapide du tampon injecté, il précipiterait d'autant plus. En effet, si la solubilité est augmentée par la dilution, alors la diminution de la solubilité par concentration semble à priori logique. L'efficacité nulle constatée pourrait donc s'expliquer par le fait que nous n'ayons alors pas obtenu 43 % (*i.e.* 100-57) de GST-CD40L non précipité et actif au site d'injection, mais une quantité proche de 0, à cause de la concentration par résorption du tampon.

Les preuves fournies par cette expérience combinées aux informations déduites de la tentative d'immunisation des génisses du groupe B nous ont orientés vers l'amélioration majeure à apporter à la formulation du vaccin. La nouvelle formule devait diminuer au maximum la précipitation de la protéine induite par la diminution du pH et par l'augmentation de la concentration au-delà du seuil d'insolubilité. Pour cela, elle devait être stabilisée par une protéine porteuse telle que la BSA et être diluée dans un grand volume afin de rester peu concentrée même après réabsorption du tampon injecté par les tissus. Plus longtemps la protéine resterait diluée, plus longtemps elle serait soluble et active et en mesure de se déplacer et de stimuler les cellules immunitaires.

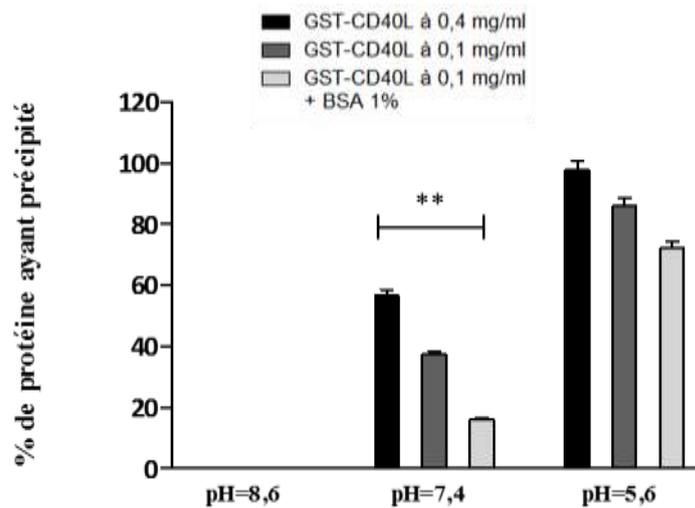


Fig 55: Pourcentage de précipitation du GST-CD40L en fonction du pH, de la concentration et de la présence de protéines porteuses. De gauche à droite, les protéines sont concentrées à 0,4mg/ml, 0,1mg/ml ou 0,1mg/ml avec 1% de BSA. Ces 3 conditions sont testées (toujours de gauche à droite) pour un pH de 8,6, puis pour un pH de 7,4 puis enfin 5,6. Les ** représentent une différence significative ($p=0,001$ dans le test de Student). Les données présentées sont les valeurs moyennes \pm SD de 2 dosages indépendants de chaque condition analysée en triplicat et sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

4 Modification de la formule et du protocole vaccinal

Les conclusions du point précédent ont permis la préparation de la seconde formule vaccinale détaillée dans le matériel et méthodes. Celle-ci contient ainsi 1% de BSA et seulement 7 mg de GST-CD40L dans un volume de 70 ml au lieu de 25 mg dans 62 ml. Comme la concentration en ligand a été volontairement divisée par 4 mais que nous voulions injecter une quantité totale proche, nous avons dû multiplier les injections : au final, nous avons injecté le vaccin pendant 3 jours consécutifs lors des 2 périodes d'immunisation des génisses du groupe C.

5 Preuve de l'efficacité *in vivo* de l'adjuvant GST-CD40L produit

Comme expliqué précédemment, nous avons finalement injecté à gauche le GST-CD40L⁺ HKSA et à droite le contrôle GST⁺ HKSA pour les 3 génisses du groupe C. Dès le 3^e jour du protocole, un effet du GST-CD40L semblait déjà apparaître : le nœud lymphatique GST-CD40L gauche semblait doublé de volume alors que le contrôle GST droit restait inchangé. Cette constatation encourageante, même si peu précise, s'est répétée invariablement pour les 3 génisses. On a également remarqué que l'adénomégalie persistait pendant 8 jours puis disparaissait jusqu'à l'injection suivante.

5.1 Réponse humorale

Le but de l'évaluation de la réponse humorale spécifique de HKSA tout au long du protocole des génisses du groupe C n'était pas de mettre en évidence un effet du CD40L par rapport au contrôle GST puisque chaque génisse avait reçu les 2 traitements simultanément. Il s'agissait simplement de vérifier que l'immunisation avait engendré une réponse, tel un contrôle positif général de l'expérience. La figure 56 montre l'augmentation des taux sériques d'IgG (figure A) et d'IgG2 (figure B) par rapport au taux basal mesuré avant le début du protocole pour 2 dates particulières de l'expérience. De manière générale, les taux sériques ont été multipliés par 2, tout comme l'avaient été ceux des génisses du groupe B. Une immunisation a donc bien eu lieu suite aux injections réalisées.

5.2 Confirmation de l'adénomégalie

Lors de la récolte au jour 30, des nœuds lymphatiques des génisses du groupe C, l'adénomégalie suspectée du ganglion GST-CD40L a été confirmée. La figure 57 A compare les masses des NLPC issus du site d'injection ayant reçu GST (en noir) ou GST-CD40L (en blanc) pour les 3 génisses. On constate que chaque NLPC du côté ayant reçu GST-CD40L est environ 2 fois plus lourd que son NLPC contrôle. Les différences sont significatives avec $p=0,0356$ dans le test pairé de Student. Le volume nettement augmenté du ganglion GST-CD40L par rapport au ganglion GST, montré par la figure 57 B (biopsie de la génisse C2, représentative des 3 génisses C), prouve que les différences observées par palpation pendant le protocole étaient bien objectives et fiables.

5.3 Prolifération cellulaire *in vivo*

Cellules totales

Les comptes cellulaires totaux ont été réalisés comme décrit dans le matériel et méthodes et répertoriés sur la figure 58 A. Sans grande surprise, la quantité totale de cellules est restée quasi proportionnelle à la masse des ganglions soit 2 fois plus en moyenne pour le ganglion GST-CD40L. Cette différence entre ganglion GST et GST-CD40L était significative avec $p<0,0001$ dans l'analyse ANOVA II.

Lymphocytes T

La proportion de lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ parmi les cellules ganglionnaires totales a été analysée par FACS selon la technique décrite dans le matériel et méthodes. Le nombre total de LTCD4⁺ et LTCD8⁺ a ensuite été extrapolé grâce au compte cellulaire total de chaque nœud lymphatique. La figure 58 C montre une augmentation significative ($p<0,0001$; ANOVA II) du nombre de LTCD8⁺ dans les NLPC GST-CD40L par rapport aux NLPC contrôles GST. En moyenne, le nombre de LTCD8⁺ dans les ganglions GST-CD40L a augmenté 1,7 x plus que dans les ganglions contrôles GST. La figure 58 D montre une augmentation presque identique pour les LTCD4⁺.

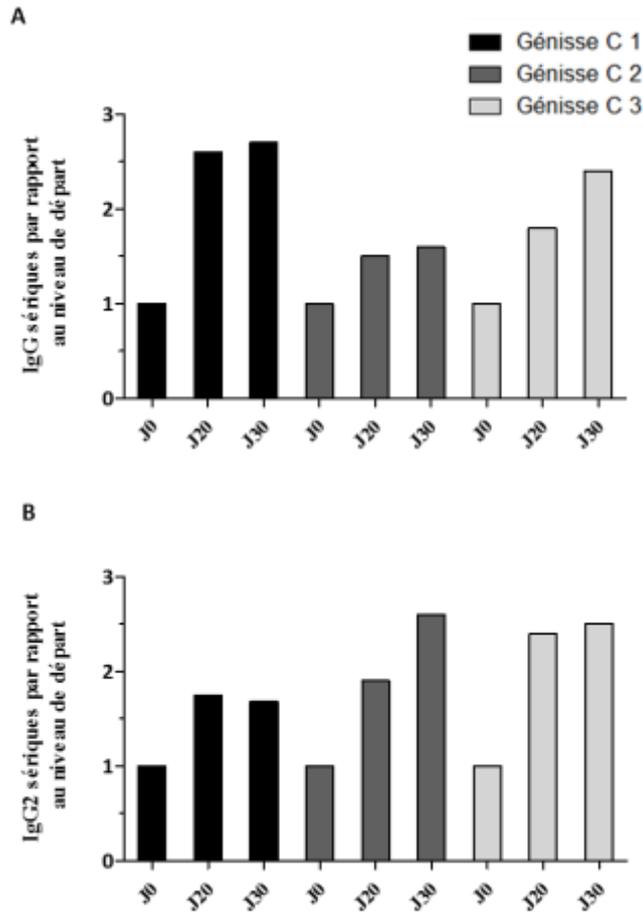


Figure 56: Ratios des concentrations en anticorps sériques contre HKSA au J20 et au J30 par rapport au J0 pour les 3 génisses du groupe C. La figure A donne les ratios pour les IgG spécifiques. De gauche à droite, les ratios aux jours 0, 20 et 30 pour les génisses C1, C2 et C3 respectivement. La figure B donne les mêmes informations appliquées aux IgG2 spécifiques.

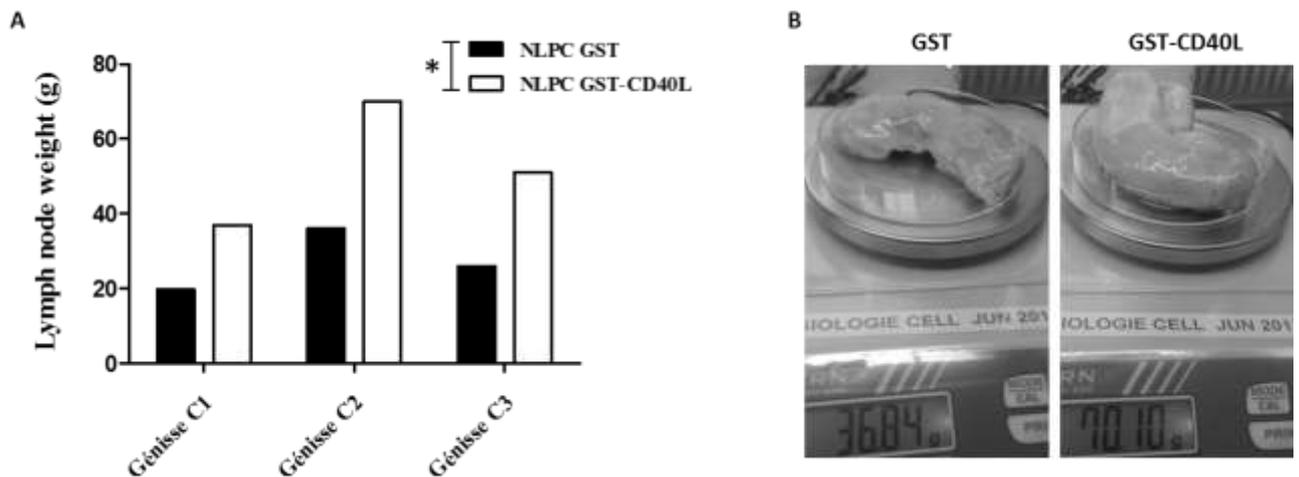


Figure 57: Comparaison des masses des NLPC du côté GST et des NLPC du côté GST-CD40L. La figure A compare les masses mesurées pour les NLPC GST (noir) et GST-CD40L (blanc) pour les génisses C1, C2 et C3 respectivement de gauche à droite. Le * représente une différence significative ($p=0,0356$ dans le test païré de Student). La figure B illustre par une photo des NLPC de la génisse C2 la grande différence de taille et de masse observée entre le NLPC GST et le NLPC GST-CD40L.

5.4 Prolifération cellulaire après re-stimulation *in vitro*

Cellules totales

Les cellules ganglionnaires totales ont été remises en culture et re-stimulées ou non avec HKSA comme décrit dans le matériel et méthodes. Après 3 jours, la prolifération a été évaluée grâce à l'incorporation de thymidine tritiée. La figure 58 B montre la prolifération moyenne obtenue pour chaque type de nœud lymphatique (GST-CD40L ou contrôle GST) pour chacune des 3 génisses. Nous remarquons que si les valeurs absolues de ces proliférations diffèrent très fortement en fonction des génisses, en revanche, le rapport de la prolifération de la condition GST-CD40L sur la condition GST est stable et toujours proche de 2. La différence entre ganglion GST et GST-CD40L était dans ce cas également significative avec $p < 0,0001$ dans l'analyse ANOVA II. De plus, un contrôle interne à chaque expérience a été utilisé : les NLPS non stimulés *in vivo* ont été soumis au même traitement et ont montré des proliférations toujours 5 fois moins fortes que celles du ganglion GST (donnée non montrée). Enfin, une technique alternative d'évaluation de la prolifération globale par marquage au CFSE a confirmé ces premiers résultats (données non montrées). On peut donc conclure que l'expérience de re-stimulation *in vitro* des cellules ganglionnaires totales a bien fonctionné et que les cellules issues des ganglions injectés avec GST-CD40L prolifèrent 2 fois plus que celles issues des ganglions injectés avec le contrôle GST lorsqu'elles sont re-stimulées spécifiquement avec l'antigène HKSA. Nous signalerons enfin que des re-stimulations avec un autre antigène (ovalbumine grade 3, 125µg/ml) que celui injecté *in vivo* n'ont pas induit de prolifération *in vitro* (figure 59). La re-stimulation *in vitro* avec l'antigène vaccinal induit donc une réponse spécifique plus importante lorsque le vaccin a été réalisé avec l'adjuvant CD40L qu'avec l'adjuvant contrôle GST.

Lymphocytes T

La figure 60 A donne le rapport de la prolifération des LTCD8⁺ du ganglion CD40L sur celle du ganglion GST mesuré par l'analyse de l'intensité du CFSE des lymphocytes cultivés en présence de HKSA pendant 4 jours comme décrit dans le matériel et méthodes. On remarque que la multiplication des LTCD8⁺ est 2 fois plus importante en moyenne pour les ganglions CD40L que pour les contrôles GST des 3 génisses du groupe C. La figure 60 B montre un rapport semblable pour les LTCD4⁺. Ceux-ci prolifèrent 2 à 3 fois plus lorsqu'ils sont issus du ganglion stimulé *in vivo* avec GST-CD40L. La re-stimulation *in vitro* avec l'antigène vaccinal induit donc une réponse T plus importante lorsque le vaccin a été réalisé avec l'adjuvant CD40L qu'avec l'adjuvant contrôle GST.

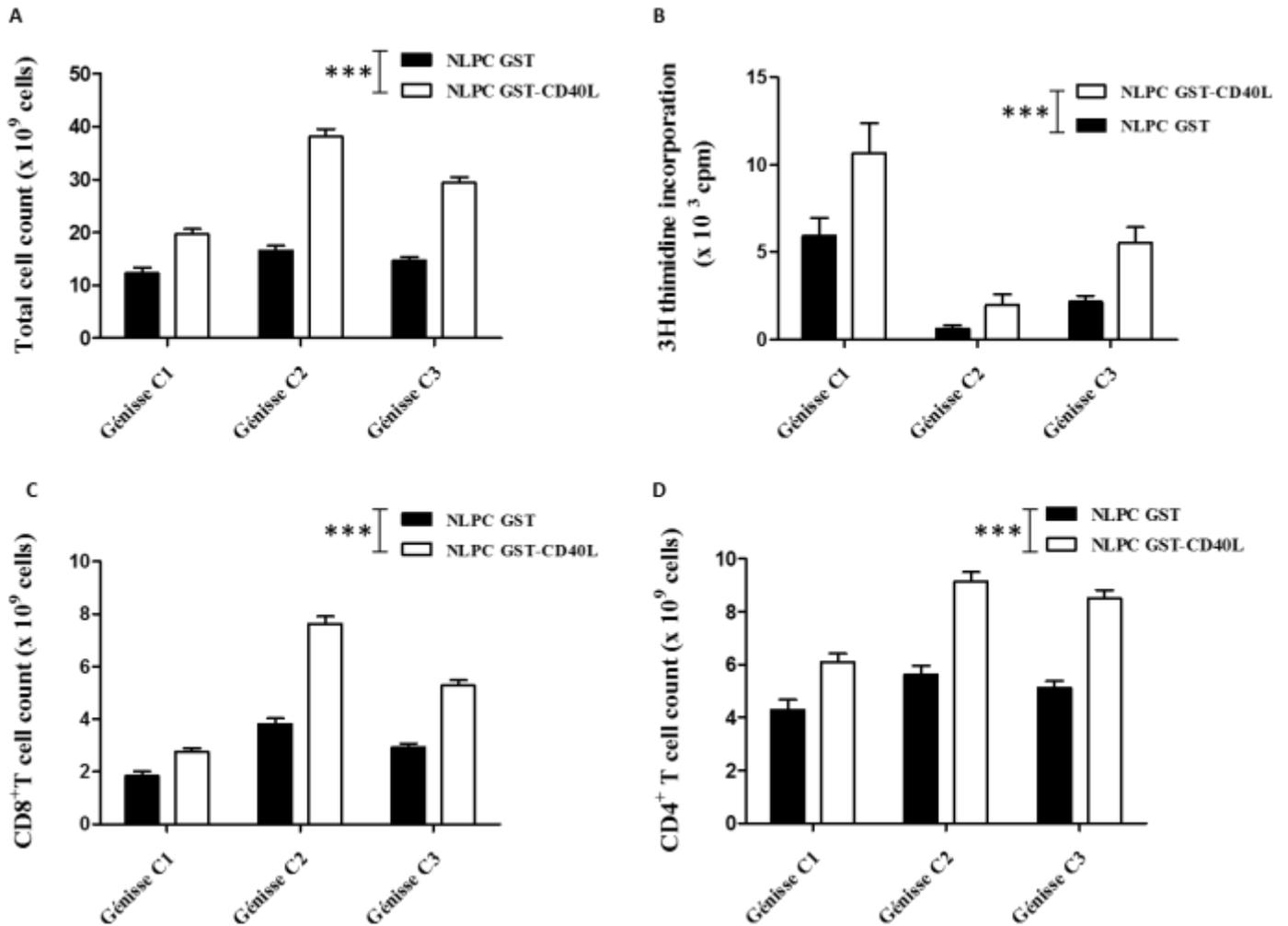


Figure 58. Réponse cellulaire induite dans les noeuds lymphatiques après immunisation des génisses avec les protéines GST-CD40L combinées à l’HKSA. Trois génisses ont été immunisées aux jours 1, 2, 3, 21, 22 et 23 par injections sous cutanées dans la région du noeud lymphatique précurral (NLPC). Les génisses ont reçu le mélange GST + HKSA (NLPC droit) ou GST-CD40L + HKSA (NLPC gauche). Sept jours après la dernière injection, les génisses ont été sacrifiées et les NLPCs récoltés pour analyses. Les résultats concernant les NLPCs traités avec le contrôle GST sont présentés en noir et ceux des NLPCs traités avec GST-CD40L en blanc. A. Compte cellulaire total. B. les cellules des NLPCs ont été mises en culture à 37°C et stimulées ou non avec 5.10⁶ CFU/ml de HKSA pendant 90 heures. La thymidine tritiée a été ajoutée lors des 18 dernières heures et la prolifération a été évaluée par mesure de l’incorporation de thymidine avec un compteur β. C. le nombre total de LTCD8⁺ et de LTCD4⁺ des NLPC ont été réalisés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés comme la moyenne ± SD. Les *** représentent une différence significative (p≤0,0001) dans les tests ANOVA II.

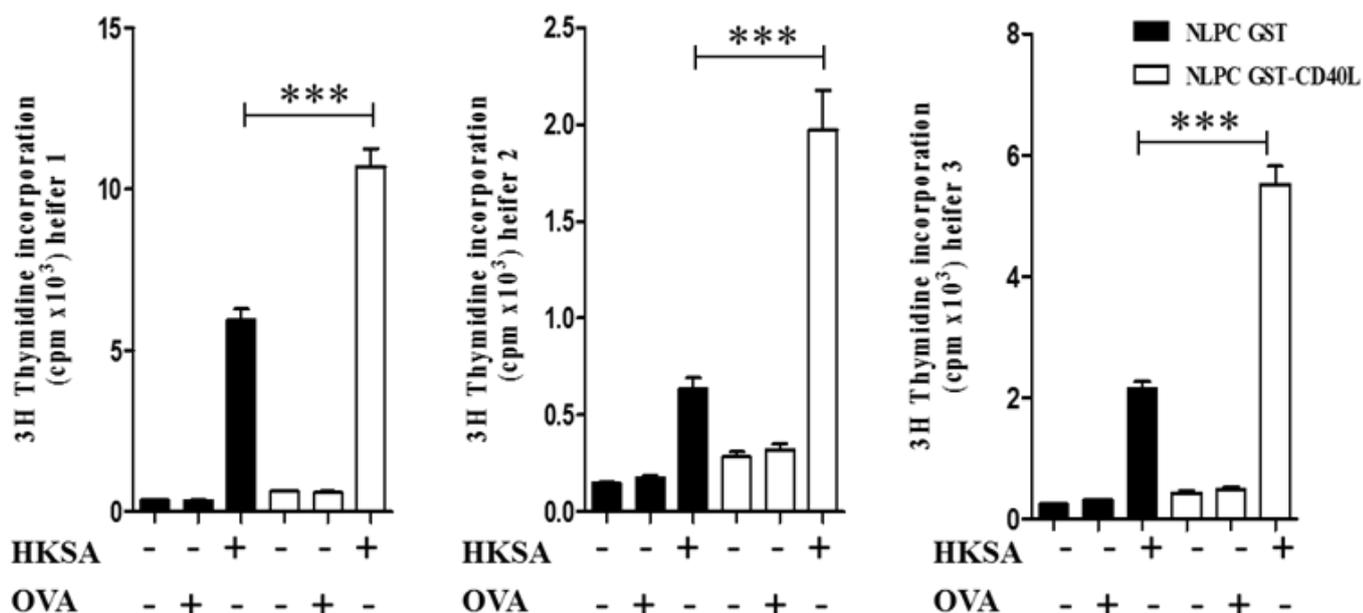


Figure 59. Spécificité de l’immunisation induite par le vaccin. Les cellules récoltées comme précédemment ont été restimulées avec le milieu seul, l’ovalbumine ou l’HKSA. De gauche à droite, les proliférations induites par ces stimulations pour les cellules issues des NLPC GST (en noir) ou CD40L (en blanc) des génisses C1, C2 et C3 respectivement. Globalement, les résultats obtenus dans les NLPC GST-CD40L étaient significativement différents de ceux des NLPC GST ($p < 0,001$; type 2 ANOVA).

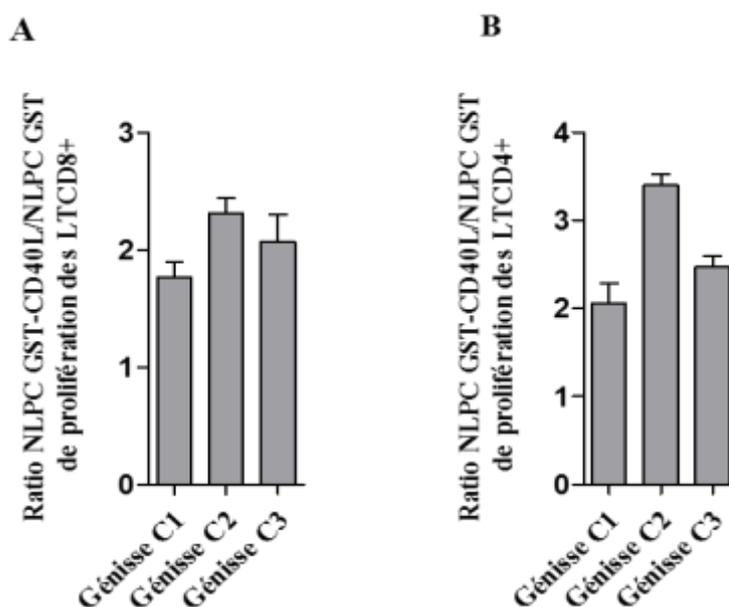


Figure 60: Proportion de LTCD8⁺ et LTCD4⁺ ayant proliféré après restimulation avec HKSA *in vitro*. La mesure réalisée au départ est la proportion de cellules ayant proliféré (détectée par une diminution de leur concentration en CFSE) parmi la population de lymphocytes T d’intérêt (CD4⁺ ou CD8⁺). Cette proportion mesurée dans le NLPC GST-CD40L a été divisée par la proportion trouvée pour le NLPC GST. La figure A expose les ratios concernant les LTCD8⁺ et la figure B ceux des LTCD4⁺ des 3 génisses du groupe C. Les résultats représentent la moyenne \pm SD du rapport entre les cellules en prolifération dans le NLPC GST-CD40L et celles en prolifération dans le NLPC GST. Les résultats obtenus dans les NLPC GST-CD40L étaient significativement différents de ceux des NLPC GST ($p < 0,001$; test t de Student).

5.5 Effet sur la réponse cytotoxique spécifique

Des tests de dégranulation (non détaillés dans le matériel et méthodes) des lymphocytes TCD8⁺ triés par FACS ont été réalisés mais n'ont pas donné de résultats suffisamment répétables. L'induction d'une réponse cytotoxique spécifique de HKSA proprement dite n'a donc pas pu être démontrée. Cependant, comme nous l'avons vu sur la figure 58, la prolifération *in vivo* des lymphocytes TCD8⁺ a bien eu lieu et a été 1,7 fois plus forte dans le ganglion CD40L que dans le ganglion GST. De plus, la re-stimulation *in vitro* des lymphocytes avec HKSA a été 2 fois plus efficace sur les LTCD8⁺ issus des génisses CD40L que sur ceux des génisses contrôles (figure 60). Par rapport à l'adjuvant contrôle, l'adjuvant CD40L est donc plus efficace à la fois pour augmenter la multiplication des lymphocytes TCD8⁺ lors de la vaccination et pour induire l'apparition de LTCD8⁺ capables de réagir plus fortement à un second contact avec l'antigène. Il est, dans ces conditions, probable que le CD40L injecté ait favorisé l'apparition de LTCD8⁺ spécifiques de HKSA.

5.6 Diminution de la réponse immune spécifique?

La mise au point de tests de dégranulation n'a pas permis de détecter d'augmentation de l'activité cytotoxique, cependant elle nous a amené à stimuler les cellules ganglionnaires en culture avec des activateurs non spécifiques tel l'anticorps anti-TCR (anti-CD3). Après abandon des tests de dégranulation, nous avons continué à utiliser l'anticorps anti-CD3 dans des tests de prolifération *in vitro* des cellules ganglionnaires (voir matériel et méthodes). Ces stimulations aspécifiques ont révélé un effet imprévu de la vaccination avec l'adjuvant CD40L. La figure 61 A montre la prolifération des cellules ganglionnaires totales issues des NLPC des 3 génisses du groupe C après stimulation *in vitro* avec des anti-CD3. On voit que la moyenne de prolifération induite par l'isotype IgG1, contrôle négatif de l'expérience est quasi nulle. On remarque que la stimulation du CD3 induit par contre une prolifération très significative des cellules ganglionnaires totales ($p < 0,0001$) pour l'ensemble des NLPC des 3 génisses. On note de plus que la prolifération est systématiquement significativement ($p < 0,0001$; ANOVA II) plus faible pour les cellules issues des ganglions GST-CD40L que pour les ganglions GST. La figure 61 B montre la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, triés par FACS, issus des NLPC des 3 génisses du groupe C après stimulation *in vitro* avec des anti-CD3. On constate que les LTCD4⁺ issus des ganglions GST-CD40L prolifèrent également significativement ($p < 0,0001$; ANOVA II) moins que ceux issus des ganglions GST. La figure 61 C enfin présente les mêmes conditions que la figure 61 B appliquées aux LTCD8⁺ triés. On remarque que la prolifération des CD8 issus des ganglions GST-CD40L est aussi significativement ($p = 0,044$; ANOVA II) plus faible que celle des LTCD8⁺ issus

RESULTATS

des ganglions GST. Il semble donc que la vaccination avec l'adjuvant CD40L rende les cellules moins sensibles à une stimulation aspécifique ultérieure telle celle fournie par un activateur général du TCR. Dans la mesure où cela se fait parallèlement à une augmentation de la réponse spécifique, ce résultat est encourageant.

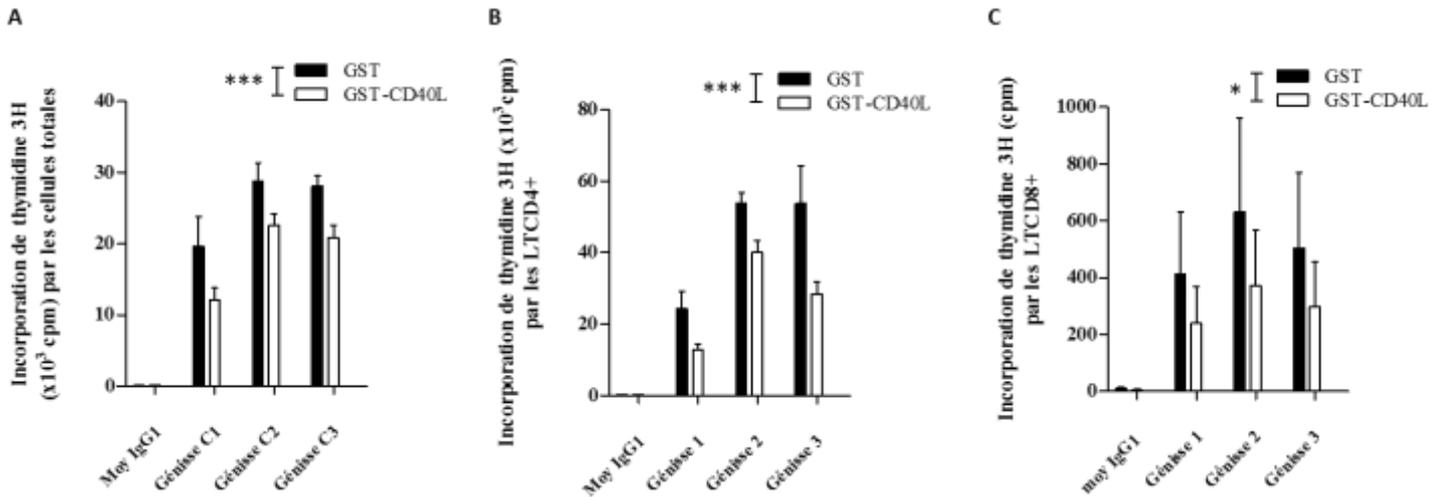


Figure 61 : Prolifération des cellules issues des NLPC des 3 génisses du groupe C après stimulation *in vitro* avec des anti-CD3. La figure A montre la prolifération des cellules ganglionnaires totales. A gauche, les 2 conditions représentées par la légende « Moy IgG1 » représentent les moyennes des proliférations induites par l’isotype contrôle IgG1 respectivement sur l’ensemble des cellules issues des ganglions GST et GST-CD40L. Ensuite, de gauche à droite, sont représentées les proliférations des cellules issues des ganglions GST puis GST-CD40L de la génisse C1, C2 et C3 respectivement. La figure B montre la prolifération des lymphocytes TCD4 triés par FACS. De gauche à droite, les conditions sont identiques à celles décrites pour la figure A. La figure C montre la prolifération des LTCD8⁺ triés par FACS et se lit comme les 2 figures précédentes. Les *** représentent une différence significative ($p \leq 0,0001$ dans l’ANOVA II). Les * représentent une différence significative ($p = 0,044$ dans l’ANOVA II). Les données représentent les moyennes \pm SD de 6 puits de culture.

6 Résultats du test de protection vaccinale

Tout d'abord, comme le montre la figure 62, nous avons observé une réaction post vaccinale lors de la 3^e série d'injections au jour 44 : le groupe GST-CD40L a eu une fièvre modérée, mais significative. Cela prouve que le CD40L a bien exercé son effet pro inflammatoire.

Après le challenge bactérien, nous avons évalué les signes de mammite clinique. Pour cela nous avons établi un score global sur base de l'inflammation visible de la mamelle, de la présence de caillots dans le lait ainsi que du nombre de quartiers atteints. On voit sur la figure 63 A que les symptômes des vaches vaccinées ont été très significativement réduits mais aucune différence n'a été constatée pour l'effet spécifique de CD40L. Aucune augmentation de température rectale n'a été constatée dans aucun des 3 groupes (figure 63 B).

Lors de l'évaluation des paramètres de mammite subclinique, 2 effets significatifs ont été observés. Le premier est la diminution de la charge bactérienne dans la condition GST contrôle (figure 64 A). Le second est la concentration en cellules somatiques, significativement plus faible à partir du 6^e jour suivant le challenge pour les 2 groupes vaccinés (figure 64 B).

De manière générale, aucune amélioration n'a été apportée par l'adjuvant GST-CD40L par rapport à l'adjuvant contrôle GST.

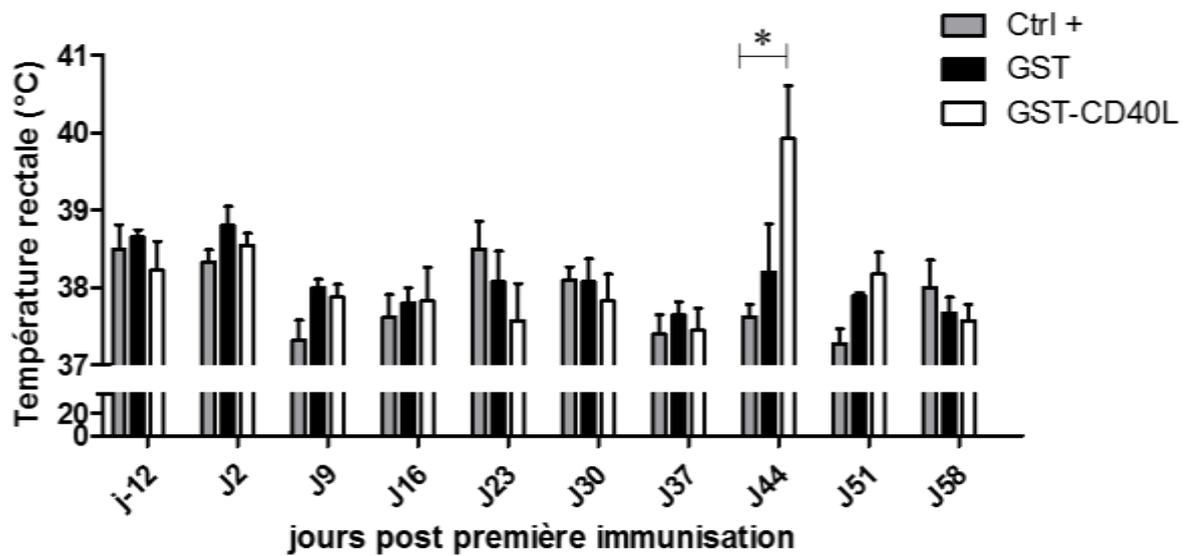


Figure 62. Relevé hebdomadaire des températures rectales avant et pendant la période d’immunisation. En gris les vaches non immunisées servant de contrôle positif pour l’infection (Ctrl+). En noir les vaches immunisées avec HKSA + adjuvant contrôle GST. En blanc les vaches immunisées avec HKSA + adjuvant actif GST-CD40L. Le * représente une différence significative entre les vaches non immunisées et la condition HKSA + adjuvant actif GST-CD40L ($p= 0,0163$; test de Student).

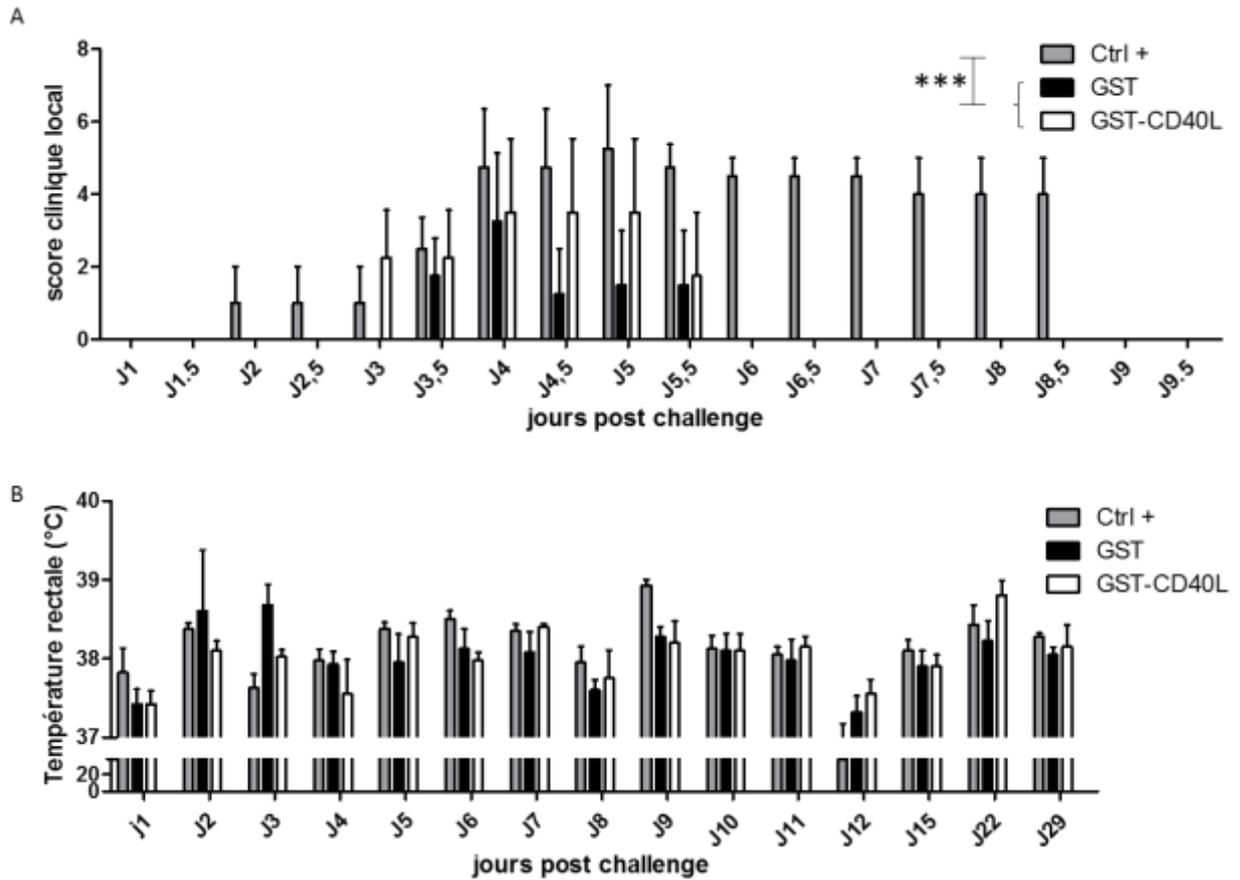
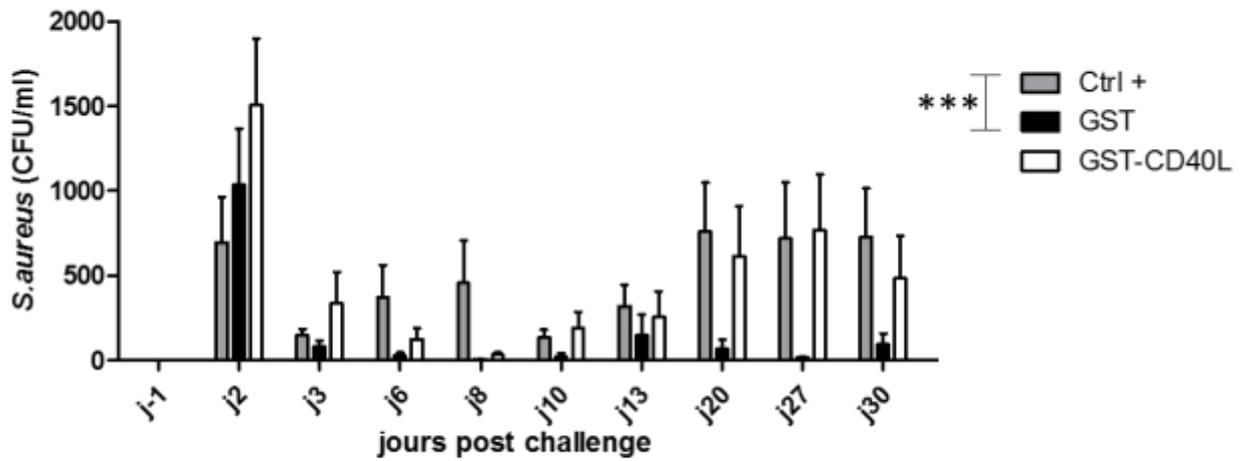


Figure 63. Signes de mammite clinique observés après l’inoculation intra mammaire de *S. aureus* aux 3 groupes de vaches. En gris les vaches non immunisées servant de contrôle positif pour l’infection (Ctrl+). En noir les vaches immunisées avec HKSA + adjuvant contrôle GST. En blanc les vaches immunisées avec HKSA + adjuvant actif GST-CD40L. **A.** Score clinique évalué 2 fois par jour. **B.** Températures rectales. Les *** représentent une différence significative ($p < 0,0001$; ANOVA 2)

A



B

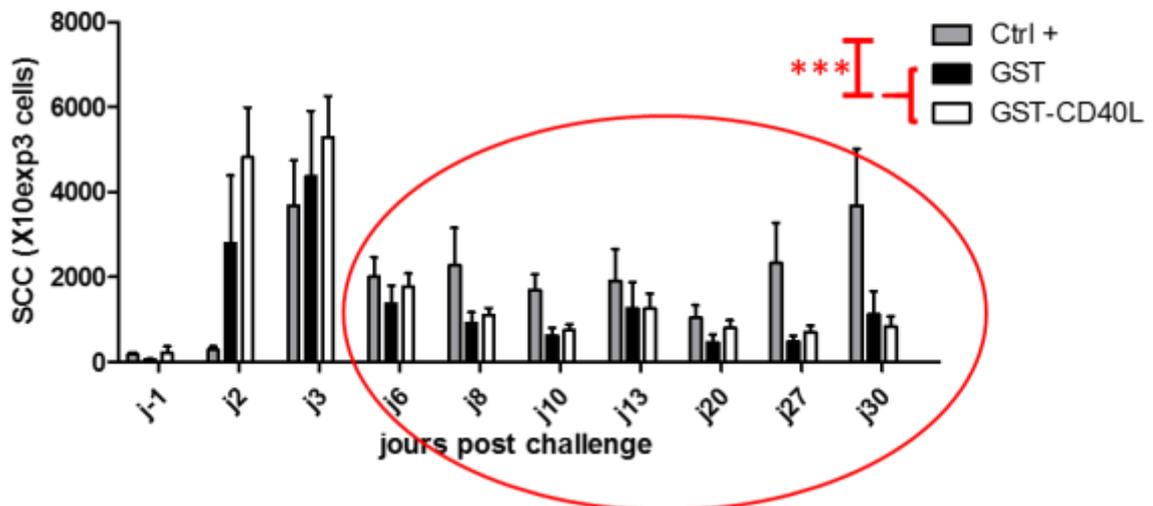


Figure 64. Paramètres de mammites subcliniques mesurés après l'inoculation intra mammaire de *S. aureus* aux 3 groupes de vaches. En gris les vaches non immunisées servant de contrôle positif pour l'infection (Ctrl+). En noir les vaches immunisées avec HKSA + adjuvant contrôle GST. En blanc les vaches immunisées avec HKSA + adjuvant actif GST-CD40L. **A.** Charge bactérienne du lait en CFU/ml. **B.** Comptes cellulaires individuels (SCC). Les *** représentent une différence significative ($p=0,0003$ pour la condition GST versus Ctrl+ et $p=0,0006$ pour la condition GST-CD40L versus Ctrl+ ; ANOVA 2).

DISCUSSION

1 Résumé du travail

Nous avons décidé de lutter contre les mammites bovines causées par *S. aureus* au moyen d'un vaccin utilisant un adjuvant particulier : le CD40L. Cette stratégie est en effet connue pour favoriser le développement d'une réponse CTL spécifique de l'antigène vaccinal administré. Elle pourrait donc permettre l'élimination des cellules épithéliales mammaires infectées par *S. aureus* et diminuer les dommages inhérents aux mammites persistantes causées par ce pathogène. Nous avons produit plusieurs formes moléculaires de CD40L bovins recombinants. Deux techniques ont été utilisées : la production dans un système bactérien et la production par des cellules de mammifères.

Pour la production en bactéries, nous avons dû modifier la structure de nos protéines recombinantes afin de les rendre solubles dans les tampons biologiques. A cet effet, nous avons fusionné la séquence correspondant au domaine d'homologie des TNFs du CD40L à la protéine GST. Les protéines de fusion ont alors été purifiées par chromatographie d'affinité avant d'être étudiées *in vitro*. Nous avons ainsi vérifié leur pureté et leur capacité à lier et à stimuler le récepteur CD40 des cellules bovines. Pour cela, nos GST-CD40L ont été incubés avec des cellules Cos-7 transfectées avec un plasmide codant pour CD40, des cellules endothéliales bovines, des PBMC ou des lymphocytes B bovins. Lors de cette étape, un problème de pollution par les endotoxines a été détecté et résolu par l'introduction du détergent Triton dans le procédé de purification. Nous avons alors relevé un effet significatif de notre CD40L à partir de 2ng/ml. La spécificité de l'effet a été vérifiée grâce à l'utilisation de contrôles négatifs tels la protéine dénaturée par l'ébullition ou encore la protéine contrôle GST produite et purifiée de la même manière. Nous avons également confronté nos GST-CD40L aux CD40L existants dans le commerce pour d'autres espèces. Ces derniers se sont montrés peu, voire pas du tout capables d'activer les cellules bovines contrairement à nos protéines de fusion. Ils présentaient de surcroît une forte pollution par les endotoxines révélatrice d'un niveau de purification médiocre. Nous avons ensuite précisé certaines caractéristiques structurelles de nos GST-CD40L tel l'arrangement en multimères ainsi que les conditions physico-chimiques nécessaires à leur stabilité. Enfin, une fois l'évaluation *in vitro* terminée avec succès, l'efficacité *in vivo* a été mesurée : des génisses ont été immunisées avec les GST-CD40L en combinaison avec des *S. aureus* tués par la chaleur

(HKSA). L'immunisation s'est révélée efficace et parfaitement répétable : les ganglions lymphatiques issus des immunisations avec GST-CD40L + HKSA présentaient une cellularité ainsi qu'une réactivité lors des tests *in vitro* 2 fois supérieures à celles des ganglions contrôles issus des immunisations avec GST + HKSA. Les mêmes différences ont été observées pour les lymphocytes TCD8⁺ et TCD4⁺. Enfin, suite aux résultats encourageants obtenus lors du test *in vivo* sur les génisses, nous avons décidé de vérifier si la stimulation immunitaire observée induisait une protection contre l'infection expérimentale avec *S. aureus*. Malheureusement, si l'immunisation avec l'adjuvant GST-CD40L associé à HKSA a permis de réduire significativement les mammites cliniques ainsi que les comptes de cellules somatiques du lait, en revanche, il n'a apporté aucune amélioration par rapport à l'effet de l'adjuvant contrôle GST.

Pour la production en cellules de mammifères, nous avons suivi un procédé semblable, même si dans ce cas, la fusion avec la GST s'est révélée inutile et contreproductive. Les CD40L produits de cette manière ont montré une efficacité *in vitro* et des capacités de multimérisation supérieures aux GST-CD40L produits en bactéries. La quantité produite était par contre beaucoup plus faible et ces protéines n'ont pas pu être testées *in vivo*. Cette dernière technique vise en fait une voie vaccinale encore largement expérimentale qui consiste en l'injection de plasmides codant pour la protéine d'intérêt directement aux animaux, c'est la vaccination ADN expliquée plus haut.

2 Evaluation de la stratégie thérapeutique

2.1 Stimulation des CTLs par CD40L

La persistance des infections à *S. aureus* étant fortement liée à sa survie intracellulaire, nous avons naturellement orienté notre stratégie de traitement vers la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques. Cette stratégie avait de plus déjà montré son efficacité dans la lutte contre plusieurs pathogènes intracellulaires chez le bovin ainsi que certaines évidences d'un effet protecteur contre *S. aureus* (voir introduction).

Nous remarquerons que la réponse CTL visée n'est pas la seule voie permettant de se débarrasser des pathogènes intracellulaires. L'activation des cellules phagocytaires, principalement les macrophages lors de la réponse Th1, est également une voie de lutte efficace contre *S. aureus*

DISCUSSION

(Hultgren *et al.*, 1998 ; Zhao *et al.*, 1998 ; Verdrengh et Tarkowski, 2000). Elle n'élimine cependant que les bactéries phagocytées et non les formes de résistance internalisées dans les MECs. De plus, si les macrophages représentent la population majoritaire dans la glande mammaire saine, en revanche, lors de mammite, leur proportion chute au profit des neutrophiles. La réponse Th1, bien qu'importante, constitue donc probablement une défense insuffisante. Si elle n'est pas au centre de notre étude, cette voie n'est toutefois pas oubliée, puisque, nous l'avons vu, le CD40L en est un activateur efficace.

Connus depuis des décennies comme éléments majeurs de la défense innée contre *S. aureus* (Mandell, 1975), les neutrophiles ont récemment été impliqués dans la réponse adaptative contre ce pathogène. Ainsi, les patients atteints de la maladie granulomateuse chronique, présentant des déficiences dans la voie des *reactive oxygen species* sont plus sensibles aux infections par *S. aureus*, de même que ceux déficients en Th17 (syndrome de Job). Or, les Th17 produisent de l'IL-17 nécessaire au recrutement et à l'activation des neutrophiles. Le rôle crucial des Th17 dans la protection contre *S. aureus* a été démontré en 2010 chez la souris par Cho et collaborateurs. De même, les *NK cells*, les *NKT cells* et les lymphocytes $T\gamma\delta$ sont impliqués dans la défense contre *S. aureus*, notamment via la sécrétion d'IL-17 (Miller et Cho, 2011). De nombreuses autres évidences laissent aujourd'hui penser que la réponse Th17 est cruciale pour l'élimination de *S. aureus* (Lin *et al.*, 2009 ; Joshi *et al.*, 2012 ; Spellberg et Daum, 2012 ; Bagnoli *et al.*, 2012 ; Archer *et al.*, 2013 ; Gil *et al.*, 2014). D'un autre côté, il est maintenant démontré que le CD40L soluble induit directement l'activation des neutrophiles (Vanichakarn *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008), ce qui peut probablement pallier le manque d'intérêt accordé aux Th17 dans notre travail. Les *NK cells* peuvent de plus être activées par les cellules dendritiques stimulées avec CD40L (Gustafsson *et al.*, 2008).

Concernant la stimulation immunitaire attendue avec notre méthode, nous remarquerons tout de même que des données défavorables existent. Ainsi, comme expliqué dans l'introduction, la stimulation excessive du CD40 peut induire la différenciation immédiate en plasmocytes et empêcher la formation du centre germinatif et de lymphocytes B mémoires (Erickson *et al.*, 2002). Dans le même ordre d'idées, il a parfois été relevé une forte réponse B associée à une absence de réponse T suite à la stimulation iatrogène du CD40. Dans ce cas, les auteurs ont émis l'hypothèse que le CD40L administré agissait en concurrence avec les lymphocytes T pour la stimulation des lymphocytes B. Les lymphocytes T helper moins sollicités se développaient alors moins (Jenkins, 1994 ; Manoj *et al.*, 2003 ; Gares *et al.*, 2006). De plus, de nouvelles études montrant un potentiel effet immunodépresseur du CD40L sont apparues (Huang *et al.*, 2012 ; Jenabian *et al.*, 2014). Il semble cependant raisonnable de considérer le caractère marginal de ces dernières.

Il existe enfin d'autres moyens de stimuler la réponse CTL, tel les adjuvants à base de complexes immunostimulants (ISCOMs) (Takahashi *et al.*, 1990 ; Morein et Bengtsson, 1998) ou des ligands des TLRs, surtout TLR 3, 7 et 9 (Akira et Hemmi, 2003 ; Schwarz *et al.*, 2003 ; Schulz *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2009). Le domaine des nanoparticules, dont font partie les ISCOMs présente aujourd'hui quelques nouvelles techniques capables de stimuler la réponse CTL. C'est le cas de l'injection de microsphères exposant des épitopes restreints au CMH I (Rubsamen *et al.*, 2014).

2.2 Choix du CD40L soluble

Il existe 2 autres outils capables d'activer le CD40 : les anticorps anti-CD40 agonistes et les peptides imitant un trimère de CD40L.

Les anticorps présentent généralement une meilleure solubilité que les protéines recombinantes. Cependant, les anti-CD40 ne présentent pas systématiquement une activité agoniste et cette caractéristique est même difficile à obtenir. De plus, les anticorps appartiennent obligatoirement à une espèce différente de l'espèce cible et une immunisation contre ceux-ci peut survenir s'ils sont utilisés de manière répétée. Une bovinisation de l'anticorps serait alors nécessaire, ce qui complique fortement la mise au point de cet adjuvant. De même, l'utilisation de la vaccination ADN pour administrer un anti-CD40 semble aujourd'hui peu réaliste. Enfin, même lorsque l'anti-CD40 est agoniste, l'effet n'est pas toujours identique à l'activation naturelle induite par un CD40L. Par exemple, les anti-CD40 ne semblent pas capables d'induire le recrutement de TRAF6 et la production d'IL-6 (Baccam et Bishop, 1999 ; Hostager, 2007 ; Bishop *et al.*, 2012).

Les peptides, quant à eux, ont été mis au point en 2005 par Fournel et collaborateurs. Ils ont un poids moléculaire avoisinant 3 kDa et présentent un axe de symétrie d'ordre 3 (C3) comme le trimère de CD40L. Leur efficacité fonctionnelle a été vérifiée *in vitro* par cette même équipe. En 2007, Habib et collaborateurs testent le peptide chez la souris et observent une forte réduction de la charge parasitaire et de l'immunosuppression suivant le challenge avec *Trypanosoma cruzi* ainsi qu'une survie accrue. Cette technique récente, bien que prometteuse ne semble pas avoir été développée par la suite. De plus, nous ne pouvions pas l'appliquer à la vaccination ADN étant donné la présence d'étapes de synthèse chimique indispensables et avons alors décidé de ne pas l'utiliser.

2.3 Présence du GST

La protéine GST s'est avérée très efficace pour augmenter la solubilité de notre CD40L produit en bactéries. Sa séquence est celle du ver *Shistosoma japonicum* et présente donc un potentiel

antigénique important. Cependant, lors des essais *in vivo*, ce potentiel antigénique ne s'est pas manifesté ou du moins ne semble pas avoir interféré avec l'expérience. En effet, le GST-CD40L a induit une réponse nette, bien supérieure à celle de la GST seule. Une adénomégalie a ainsi été systématiquement constatée 48 heures après chacune des 2 immunisations avec GST-CD40L + HKSA mais jamais après les immunisations avec GST + HKSA. Cela montre d'une part que l'éventuelle réponse anti-GST n'empêche pas l'action du GST-CD40L et d'autre part que son intensité est négligeable par rapport à celle de la réponse induite par la stimulation du CD40. Enfin, les protéines recombinantes produites en cellules Cos-7 et destinées à la vaccination ADN sont solubles et très efficaces sans GST. La vaccination ADN étant le but final du projet vaccinal, cela nous libère du potentiel effet secondaire de la GST.

2.4 Antigène HKSA

La bactérine de *S. aureus* est un antigène grossier et son association avec la formule épurée de l'adjuvant CD40L semble incohérente. L'utilisation de cet antigène est malgré tout un choix délibéré car nous ne connaissons pas d'antigènes de *S. aureus* capables d'induire une immunisation vraiment efficace. Nous avons pourtant vu que de bons résultats ont été obtenus avec des vaccins sous unitaires, chez la souris. Cependant, c'est la multiplication des cibles antigéniques qui semble garantir la meilleure protection chez les animaux de laboratoire et pourrait représenter une approche vaccinale prometteuse chez l'homme (Stranger *et al.*, 2006 ; Holtfreter *et al.*, 2010 ; Verkaik *et al.*, 2011 ; Bagnoli *et al.*, 2012). Bien qu'induisant une réponse immune moins ciblée, la bactérine présente au moins 3 avantages par rapport aux vaccins sous-unitaires. Tout d'abord, elle permet d'immuniser contre tous les antigènes potentiels communs de *S. aureus*. Ensuite, elle apporte un adjuvant naturel : les acides teichoïques et lipoteichoïques capables d'activer le TLR2. Or, la présentation croisée des antigènes conjugués aux agonistes de TLR2 est facilitée (Shen *et al.*, 2014). Enfin, elle facilite l'introduction de multiples souches dans le vaccin puisqu'il suffit d'inactiver ces dernières et de les mélanger. Finalement, l'inconvénient principal de cette technique est peut-être l'impossibilité de coupler CD40L et antigène sur une même molécule. En effet, plusieurs études ont montré une meilleure immunisation lors de l'utilisation d'antigènes fusionnés au CD40L par rapport à l'administration d'un mélange vaccinal classique (Manoj *et al.*, 2003 ; Gares *et al.*, 2006). La fusion covalente classique peut être remplacée par des interactions streptavidine-biotine pour associer anticorps anti-CD40 et antigènes (Chen *et al.*, 2012). La fusion avec l'antigène peut permettre d'augmenter l'immunogénicité d'un vaccin atténué (Lin *et al.*, 2009). Cependant, le bénéfice apporté par la fusion n'est pas systématique et d'autres études montrent des résultats contradictoires (Cao *et al.*, 2010). Dans le même registre, l'administration de l'antigène et du CD40L non fusionnés dans le

DISCUSSION

même plasmide ou dans 2 plasmides distincts n'a pas révélé de différences d'efficacité (Auten *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le choix de l'antigène par rapport au but d'induction de la réponse CTL spécifique de *S. aureus*, nous n'avons pas d'informations précises. Nous signalerons qu'une équipe travaillait sur ce projet chez la vache laitière en 2010 (Mullarky *et al.*, 2010). Cependant, si cette équipe put isoler, chez la vache laitière atteinte de mammite à *S. aureus*, des lymphocytes TCD8+ mémoire spécifiques de ce pathogène, l'antigène précisément à l'origine de ces lymphocytes est toujours inconnu. Nous remarquerons ici qu'une autre équipe a mis en évidence des antigènes induisant la prolifération *in vitro* des LTCD4+ issus de veaux immunisés avec HKSA. Ce travail n'était sans doute pas exhaustif mais aurait permis de découvrir 13 antigènes intéressants (Lawrence *et al.*, 2012). Il ne concerne cependant pas les LTCD8+.

Enfin, puisque l'utilisation de HKSA pour immuniser contre des *S. aureus* intracellulaires peut sembler peu intéressante, j'apporterai, à la lumière de l'étude de Tuchscher et collaborateurs de 2011 une justification précise. Cette équipe a en effet montré que le phénotype SCV de *S. aureus* était un statut transitoire et réversible. Les *S. aureus* devenaient SCV suite à certaines conditions ayant cours lors d'infections chroniques, puis de temps à autre retrouvaient un phénotype classique. Ils pouvaient d'ailleurs, à cette occasion, déclencher une nouvelle phase d'infection aiguë, puis redevenaient SCV de manière cyclique. L'immunisation avec les HKSA peut donc tout à fait s'avérer efficace, du moins pendant les phases de sortie de *S. aureus* sous sa forme classique. Il n'a par ailleurs pas été remarqué de variations antigéniques importantes entre les 2 phénotypes, excepté une expression accrue de l'adhésine *fnbpA*, et il reste probable que des épitopes identiques à ceux présents sur les bactéries soient présentés par le MHC I des cellules épithéliales infectées.

2.5 Dose

La dose de CD40L nécessaire a été évaluée principalement sur la base des essais cliniques réalisés chez l'homme (Vonderheide *et al.*, 2001). En effet, de manière générale, les prédictions basées sur les extrapolations allométriques de la clairance plasmatique à partir des doses utilisées chez les animaux de laboratoire ne sont pas fiables pour les grands animaux (Mahmood *et al.*, 2005 ; Mahmood, 2007). La dose utilisée chez Vonderheide était de 0,05 à 0,15 mg/kg, soit, appliqué à la vache, une dose de 25 à 75 mg. Cependant, dans cette étude chez l'homme, le but était principalement la destruction directe des tumeurs, ce qui requiert une dose plus forte que pour la stimulation immunitaire que nous recherchons. Une dose de 20 mg délivrée lors de chacune des 2 périodes d'immunisation nous semblait dès lors raisonnable. Cette dose plus faible a par ailleurs

DISCUSSION

permis d'éviter les effets secondaires constatés dans l'étude de Vonderheide et s'est finalement montrée très efficace.

La dose d'HKSA a été évaluée d'après l'étude de Camussone et collaborateurs en 2012, dans laquelle les génisses reçoivent 2 injections de 10^9 CFU de bactéries par voie sous cutanée. Nous avons utilisé une dose légèrement supérieure ($7 \cdot 10^9$ CFU) en se basant également sur les conclusions de Lawrence et collaborateurs en 2012 car ceux-ci n'avaient observé une immunisation qu'à partir de 10^{10} CFU par voie sous cutanée.

2.6 Robustesse économique du vaccin

La production de protéines recombinantes actives et dépourvues d'endotoxines est un procédé coûteux. Les quantités que nous avons utilisées pour immuniser les bovins dans ce travail représentent un budget incompatible avec la politique économique de l'élevage laitier. De plus, bien que notre CD40L soit parfaitement stable à -80°C et conserve une efficacité optimale après plusieurs années de conservation, le maintien de la congélation semble indispensable ce qui ajoute encore des frais. Nous avons cependant déjà envisagé des solutions pour améliorer la rentabilité de ce vaccin. La première est, comme nous l'avons déjà dit d'administrer le CD40L en vaccination ADN. En effet, les plasmides sont des structures très stables, peuvent être facilement déshydratés sans subir de dommages et ainsi être stockés à température ambiante. La purification est également plus simple et la masse de plasmide à injecter moindre, que pour les protéines. Bien que la technique actuelle de la vaccination ADN soit encore peu efficace pour les animaux de grande taille, elle devrait vraisemblablement le devenir dans les prochaines années. De plus, nous avons déjà produit plusieurs plasmides codant pour différentes formes de CD40L destinés à la vaccination ADN et ceux-ci ont montré une efficacité redoutable *in vitro*. Ainsi, dès qu'une technique efficace d'administration des vaccins ADN sera disponible, nous réconcilierons notre vaccin avec les impératifs économiques. La seconde stratégie pour réduire le coût par vache serait une utilisation ciblée voire curative plutôt que la vaccination préventive de l'ensemble du troupeau. Le surcoût se répercuterait alors seulement sur les animaux à risque ou malades. Enfin, une administration localisée au niveau de la mamelle pourrait également permettre de réduire la dose efficace.

2.7 Choix du plasmide pVAX pour la vaccination ADN

Comme nous l'avons vu *in vitro*, les CD40L produits à partir de pVAX activent aussi efficacement les cellules bovines que ceux issus des plasmides pcDNA3.1⁺. Le rendement de production reste cependant inférieur lors de la production en cellules Cos-7. Le pVAX semble donc désavantagé.

DISCUSSION

En réalité, cette différence devrait disparaître lors de l'utilisation *in vivo* et le pVAX manifestera (théoriquement) sa supériorité lors de la vaccination ADN. En effet, en dehors des cellules Cos qui expriment l'antigène T du SV40 et facilitent la réplication épisomale des pcDNA3.1⁺ (grâce à l'origine de réplication du SV40), les 2 plasmides ont le même rendement. De plus, si pVAX et pcDNA3.1⁺ possèdent tous 2 le promoteur inoffensif du CMV, en revanche, le pcDNA3.1⁺ contient également le promoteur précoce du SV40. Celui-ci ayant un fort pouvoir oncogène, il est préférable de ne pas l'utiliser *in vivo* (Flingai *et al.*, 2013). Enfin, le pVAX est presque 2 fois plus petit que le pcDNA3.1⁺. Cette faible taille devrait faciliter la transfection et conférer un avantage au pVAX.

3 Evaluation de la technique expérimentale

3.1 Qualité de l'adjuvant vaccinal produit

3.1.1 Faiblesses

Notre GST-CD40L est sensible aux variations de pH. Le pH a en effet un impact majeur sur sa solubilité. Le GST-CD40L est stable avec une solubilité maximale au-dessus de pH 8,5. En dessous, la solubilité diminue et n'est plus que de 50% à pH 7.4. Comme nous l'avons vu, la précipitation de la protéine au pH physiologique peut être diminuée par dilution, mais cela augmente le volume à injecter.

Nous n'avons pas tenté de déshydrater notre GST-CD40L qui reste donc pour l'instant plus difficile à transporter que les protéines commerciales.

3.1.2 Points forts

Les principales qualités de notre CD40L sont une activité fonctionnelle bien supérieure aux CD40L commerciaux et de la littérature, une absence totale d'endotoxines et une conservation optimale par congélation.

3.1.2.1 Efficacité supérieure aux autres CD40L existants

Les CD40L commerciaux prédisent un effet autour de 100 ng/ml alors que nous avons une activation significative des cellules endothéliales bovines dès 2 ng/ml. De plus, lors des tests de

DISCUSSION

prolifération des lymphocytes B, les CD40L de la littérature montrent respectivement (Mazzei *et al.*, 1995 ; McGrew *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1999; Haswell *et al.*, 2001 ; Boeglin *et al.*, 2011) une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée de 3,5, 15, 20, 6 et 5 fois le niveau basal pour la plus forte dose testée (10 000 ng/ml) alors que nous obtenons cette activation dès 200 ng/ml. De plus, à 5000 ng/ml nous atteignons 100 fois le niveau basal. De même, des études plus récentes n'utilisant pas la thymidine tritiée mais le compte cellulaire ne montrent qu'une très faible prolifération après 3 jours de stimulation des lymphocytes B avec CD40L (Naito *et al.*, 2013). Nous remarquerons que les études qui comparent l'activation des lymphocytes B par CD40L à celle induite par le LPS montrent une prolifération plus forte avec le LPS qu'avec CD40L (Zamorano *et al.*, 2001). A l'inverse la prolifération induite par notre CD40L est 5 fois supérieure au maximum atteint avec le LPS quelle que soit la dose de ce dernier. Certaines études montrent des niveaux de prolifération proches des nôtres, mais il s'agit généralement de stimulations réalisées avec des CD40L membranaires au moyen de fragments de cellules et de cocultures cellulaires (O'Nions *et al.*, 2004 ; Good *et al.*, 2006) ou sans évaluation de la quantité de CD40L utilisée (Wortis *et al.*, 1995).

De plus, certaines molécules commerciales tels les CD40L de souris ou humain d'Enzo lifesciences sont, d'après cette même firme, très faiblement activateurs des lymphocytes B et ne fonctionnent qu'en ajoutant un *cross-linker*. Nous avons également remarqué que les proliférations inférieures à 20 fois le niveau basal pouvaient être obtenues simplement avec des doses de 1000 à 5000 ng/ml de LPS. Les activations médiocres constatées pour certains CD40L pourraient ainsi signifier que leurs effets ne sont dus qu'aux endotoxines.

Enfin, notre CD40L est également très efficace sur les lymphocytes B en l'absence de toute co-stimulation (notamment dans les cultures sans IL-4). Dans la littérature en revanche, l'efficacité du CD40L seul est généralement très faible.

Nous remarquerons cependant qu'il existe depuis peu un CD40L hexamérique commercialisé par Enzo lifescience qui semble activer efficacement le CD40 humain, sans ajout du *cross-linker* (Zaccard *et al.*, 2015).

3.1.2.2 Absence d'endotoxines

La présence d'endotoxines n'a pas pu être détectée dans notre CD40L purifié, même pour de très fortes concentrations de protéines. Nous devons ce résultat à la captation du LPS par le détergent Triton tout au long du processus de purification. Nous avons par contre relevé des taux de LPS de l'ordre d'un µg /ml dans le CD40L humain de Santa cruz biotechnologies.

DISCUSSION

Le nouveau CD40L hexamérique humain d'Enzo lifescience en revanche, contiendrait très peu d'endotoxines puisqu'il s'agit d'une production en cellules de mammifères.

3.1.2.3 Conservation par congélation

Le GST-CD40L supporte sans dommages de nombreux cycles de congélation-décongélation et garde 100 % d'efficacité après 2 ans (nous n'avons pas plus de recul) à -80 °C. L'ajout de cryoprotecteurs n'est absolument pas utile, contrairement aux recommandations concernant les CD40L commerciaux.

3.2 Qualité du protocole expérimental

3.2.1 Vérification de l'activité *in vitro*

L'ensemble des tests fonctionnels a été réalisé après une mise au point méticuleuse et en utilisant tous les contrôles négatifs et positifs possibles. En comparaison, dans la littérature, la plupart des essais fonctionnels avec CD40L n'utilisent pas de contrôles négatifs adéquats. Aucune étude par exemple, n'utilise une protéine contrôle purifiée dans les mêmes conditions (pour nous le GST) ou la protéine active bouillie et se contentent d'un tampon de purification. Il n'y a en fait guère que les études utilisant des plasmides destinés à la vaccination ADN qui testent éventuellement *in vitro* le plasmide vide.

3.2.2 Vérification de l'activité *in vivo*

3.2.2.1 Faiblesses

La principale faiblesse de nos tests réalisés sur génisses est bien évidemment le très faible nombre d'animaux. Au final, seules 3 génisses ont pu recevoir une administration efficace de l'adjuvant. La présence d'une activité cytotoxique accrue chez les lymphocytes issus du NLPC ayant reçu l'adjuvant actif n'a pas été mise en évidence car le test de mesure de la dégranulation s'est révélé particulièrement peu fiable.

Remarque :

Nous signalerons ici un phénomène particulier qui s'est produit lors du dosage des IgG spécifiques de HKSA. Comme montré dans les résultats, nous avons observé une augmentation nette du titre en anticorps spécifiques de HKSA après l'immunisation et cette augmentation n'a pas eu lieu chez les génisses non immunisées. Cependant, par rapport aux différents protocoles de la littérature utilisés pour ce dosage, nous avons ajouté un contrôle négatif supplémentaire : des puits coatés

DISCUSSION

avec des extraits d'*E. coli* (voir matériel et méthodes). Contre toute attente, ce contrôle négatif a montré la même évolution de DO que les puits coatés avec HKSA. Cela montre que l'ELISA développé et utilisé dans les études antérieures immunisant avec des bactérines et évaluant les titres en anticorps anti-*S. aureus* (Leitner *et al.*, 2000b, 2003 ; Camussone *et al.*, 2012) n'est pas spécifique. Au mieux il existe des anticorps reconnaissant des structures présentes à la fois sur *E. coli* et sur *S. aureus*, et au pire, cet ELISA ne montre qu'une augmentation de n'importe quels anticorps du sérum. Cela ne remet pas à priori en cause l'immunisation, et d'autres études ont par ailleurs montré des élévations du titre sérique en utilisant des ELISA coatés avec des protéines recombinantes de *S. aureus* (Shkreta *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2008), mais montre à quel point le choix des contrôles négatifs est crucial. Nous devons tout de même évoquer une autre explication : la réaction du sérum avec les bactérines *E. coli* pourrait être causée par une immunisation contre certains antigènes des BL21 qui auraient persisté jusqu'à la fin du processus de purification et été injectés avec le GST et avec le GST-CD40L. Cela nous semble cependant peu probable étant donné l'absence totale d'endotoxines dans les protéines purifiées, et l'absence de protéines dans les purifications réalisées à partir d'extraits de BL21 non transformées. Nous ne pouvons pourtant pas exclure que d'autres macromolécules polluantes issues des BL21 aient adhéré aux CD40L. Nous citerons à ce propos l'étude de Lawrence et collaborateurs de 2012 qui réalisent une déplétion des anticorps sériques anti-*E. coli* avant d'incuber les séra d'animaux immunisés avec des bactérines de *S. aureus* dans des tests biochimiques utilisant des protéines recombinantes adsorbées produites en *E. coli*. Ils considèrent donc que des anticorps anti-*E. coli* sont naturellement présents, mais cela n'explique pas l'augmentation observée dans notre expérience après l'immunisation.

3.2.2.2 Points forts

Tout d'abord, la réponse immune a été 2 fois plus forte pour le GST-CD40L que pour le GST seul, ce qui est un effet très net. De plus, ce résultat a été systématiquement répétable chez les 3 génisses. Enfin, dans tous les cas, la génisse a reçu les 2 traitements (adjuvant contrôle dans le flanc gauche et adjuvant actif dans le flanc droit) en même temps, ce qui a éliminé le biais expérimental dû à l'animal.

Nous remarquerons également qu'un soin extrême a été accordé à l'équité des doses de produits actifs ou contrôles administrés et au fait de traiter de manière identique les cellules ganglionnaires récoltées issues des 2 conditions. A titre d'exemple, le nombre de cellules utilisées dans chaque expérience a été comparé dans chaque condition en utilisant à la fois un comptage manuel, la cytométrie en flux et le dosage de la masse protéique par millilitre de suspension cellulaire. La

taille des culots cellulaires a également été vérifiée dans les puits de culture par microscopie optique.

Remarque:

Il semble que la vaccination avec l'adjuvant CD40L rende les cellules moins sensibles à une stimulation aspécifique ultérieure telle celle fournie par un activateur général du TCR. Dans la mesure où cela se fait parallèlement à une augmentation de la réponse spécifique, ce résultat est encourageant.

4 Evaluation du test de protection vaccinale

4.1 Choix des groupes contrôles et du nombre d'animaux

Le nombre minimal d'animaux a été évalué à partir de plusieurs études dont celle de Leitner et collaborateurs en 2003. En utilisant leurs résultats et en choisissant une puissance statistique de 0,8 et une erreur alpha de 0,05, le « two-sample normal test » d'Excel donne un minimum de 13 échantillons (quartiers) nécessaires par groupe soit 3,25 vaches. Le lot 1 servira de contrôle positif pour l'infection expérimentale et permettra de vérifier si l'infection a bien eu lieu. Le lot 2 permettra de mesurer l'effet du HKSA seul. Cet effet pourra alors être soustrait à l'effet protecteur total observé dans le lot 3 pour en déduire celui du CD40L. Nous remarquerons ici qu'il existe d'autres possibilités pour le choix du lot contrôle 2. Par exemple, l'utilisation de l'hydroxyde d'aluminium présent dans le vaccin Lysigin ou Startvac permettrait de confronter l'efficacité de notre technique à celle d'un vaccin existant. Nous considérons cependant que ce premier test d'évaluation de la protection vaccinale doit d'abord vérifier si l'effet du CD40L est significatif avant de le comparer aux produits commerciaux. L'administration de l'adjuvant contrôle GST, produit et purifié de la même manière que le GST-CD40L permet de vérifier que le tampon de purification ainsi qu'une éventuelle réponse contre la GST ne sont pas responsables de l'effet observé. Si nous avons comparé à l'effet de l'adjuvant présent dans la formule commerciale existante, c'est-à-dire l'hydroxyde d'aluminium présent dans Lysigin et Startvac, nous n'aurions pas pu déduire l'effet propre du CD40L. De plus, si nous avons utilisé comme adjuvant contrôle l'hydroxyde d'aluminium et comme adjuvant efficace le CD40L associé à l'hydroxyde d'aluminium, des effets antagonistes étaient envisageables. L'utilisation de l'hydroxyde d'aluminium est en effet limitée par son fort profil Th2 (Lindblad, 2004). Il pourrait donc

contrecarrer les réponses Th1 et CTL que le CD40L est censé favoriser. La comparaison de notre vaccin à un vaccin commercial pourrait, en revanche, se faire lors d'une seconde étape, mais seulement après que l'effet propre du CD40L ait été mis en évidence.

4.2 Choix de la voie d'immunisation

Le choix de la zone d'injection prend en compte le résultat de l'expérience d'immunisation des génisses ainsi que la nécessité de trouver une région facilement accessible et pouvant accueillir un volume important (70 ml). La région du nœud lymphatique rétro-mammaire serait préférable et permettrait probablement une réponse plus rapide à l'infection de la glande. L'injection rétro-mammaire serait d'autant plus intéressante que, nous l'avons constaté dans les NLPS, les antigènes injectés ne semblent pas diffuser facilement vers des nœuds lymphatiques éloignés. Cependant, cette zone est peu accessible et fortement sensible et pourrait demander une contention par anesthésie des vaches lors d'injections répétées. Dans la littérature, on retrouve des immunisations au niveau rétro-mammaire (Camussone *et al.*, 2012) mais elles ne concernent parfois qu'une partie du protocole d'immunisation, telle l'injection de l'antigène sans adjuvant (Leitner *et al.*, 2003). Les immunisations intramusculaires semblent être majoritaires : base de la queue pour Leitner et collaborateurs en 2003, muscle semi membraneux pour Nickerson et collaborateurs en 2005, muscle glutéal pour Shkreta et collaborateurs en 2004. Amorena et collaborateurs en 1994, Perez et collaborateurs en 2009 ainsi que Chang et collaborateurs en 2008 ont également utilisé la voie intramusculaire. La voie d'immunisation préconisée pour le vaccin commercial Lysigin est intramusculaire. Les immunisations sous-cutanées sont également bien représentées (Middleton *et al.*, 2006 ; Lawrence *et al.*, 2012 ; Camussone *et al.*, 2012). Le volume que nous devons injecter ne permet pas la voie intramusculaire.

4.3 Choix de la souche bactérienne

Peu de souches bovines de *S. aureus* ont été séquencées jusqu'ici. La souche Newbould 305, induisant des mammites chroniques, a été séquencée en 2012 par Bouchard et collaborateurs. Elle est caractérisée par une survie intracellulaire facilitée. Par rapport à la souche RF 122, responsable de mammites plus sévères, Newbould 305 possède plus d'adhésines (Peton *et al.*, 2014a). Newbould possède ainsi plus de *fibronectin binding protein* (fnbp) et sa fnbpA présente des domaines de liaison à la fibronectine supplémentaires (Peton *et al.*, 2014a). Or, les fnbp sont les protéines les plus impliquées dans l'internalisation des *S. aureus* (Edwards *et al.*, 2011; Fraunholz et Shina, 2012). Enfin, le système de régulation de gène *agr* est de type I chez newbould 305, caractère associé à de bonnes capacités de persistance intracellulaire (Bardiau *et al.*, 2014).

4.4 Choix de la dose inoculée

Nous avons calculé une dose moyenne permettant théoriquement d'induire des mammites de faible intensité. Nous nous sommes basés sur les essais vaccinaux suivis de challenge infectieux avec la souche Newbould 305 (Schukken *et al.*, 1999 ; Shkreta *et al.*, 2004; Middleton *et al.*, 2006) ou d'autres souches (Leitner *et al.*, 2003 ; Nickerson *et al.*, 2005 ; Perez *et al.*, 2009) décrits dans la littérature. Tous ces protocoles sont semblables au niveau de la dose administrée et utilisent environ 1000 CFU de *S. aureus* par quartier pour induire des mammites. Cependant, l'inoculation unique n'est pas très efficace pour induire une mammite: Schukken et collaborateurs rapportent en 1999, une réussite de 49 % sur 145 vaches inoculées une fois avec 300 à 600 CFU de Newbould 305 par quartier. Nous nous sommes alors reposés sur la solution de Middleton et collaborateurs en 2006 qui ont observé une réussite de 100 % pour 3 inoculations par quartier avec 250 CFU dans un volume de 10 ml. Nous avons alors décidé de réaliser 2 inoculations espacées de 24 h en utilisant une dose de 400 CFU/inoculation/quartier, en suspension dans 10 ml. Chez nos vaches non vaccinées, nous avons obtenu 81 % de quartiers infectés 24 h après la 2^e inoculation (donc 48 h après la 1^{ère} inoculation) puis ce chiffre est descendu à 75 % après 4 jours. L'ensemble des 4 vaches contrôles a montré des signes cliniques au niveau de la mamelle (mais aucun signe systémique). Nous avons donc utilisé une « force » infectieuse capable d'induire des mammites cliniques chez les vaches non vaccinées. Nous remarquerons ici qu'il est important de ne pas faire de raccourci entre la prévalence élevée des mammites subcliniques à *S. aureus* de l'élevage laitier (comparée à celle des mammites cliniques) et la nécessité de cibler exclusivement ces formes subcliniques. En effet, les mammites cliniques causées par *S. aureus* sont loin d'être négligeables (Hussain *et al.*, 2007). De plus, la distinction entre mammite clinique et subclinique, en pratique, dépendrait parfois de l'attention avec laquelle la vache est examinée au cours du processus infectieux (*International dairy federation*, 1987). Nous pouvons tout de même nous demander si le modèle que nous avons utilisé n'était pas trop fort pour que l'effet du GST-CD40L puisse être observé. Nous remarquerons à ce propos, que, lorsque l'on analyse individuellement les vaches, toutes les vaches non vaccinées ont développé des mammites cliniques, alors que seulement 50% des vaches vaccinées avec HKSA (associé l'adjuvant contrôle GST ou actif GST-CD40L) ont montré des signes de mammites cliniques (données non montrées). Les 50 % restant, (soit 4) de ces vaches vaccinées, ont bien été infectées, mais aucun signe clinique n'a été relevé chez elles (données non montrées). Deux d'entre elles ont eu des charges bactériennes très élevées, proches du maximum de l'étude (5000 CFU/ml) et des CCI allant jusqu'à 10 000 000 mais ces paramètres ont rapidement diminué. De plus, les 2 autres se sont complètement débarrassées des *S. aureus* et ont retrouvé des CCI inférieurs à 300 000 pour l'une et à 150 000 pour l'autre dans chaque

quartier. La moitié des vaches vaccinées a donc développé des mammites subcliniques et un quart a même guéri. Notre modèle n'était donc pas déraisonnablement fort, mais on ne peut exclure qu'il ait masqué d'éventuelles différences entre l'adjuvant contrôle GST et l'adjuvant actif GST-CD40L. Cependant, il était difficile de réaliser du premier coup le modèle idéal. Des mises au point sur d'autres vaches auraient été nécessaires (car nous n'avons pas trouvé de protocole valable dans la littérature), mais cela posait des problèmes éthiques et financiers. Nous n'avons pas suivi le protocole de Chang et collaborateurs en 2008 qui induisent un modèle subclinique grâce à une faible dose (50 CFU de *S. aureus* par quartier) car l'étude ne semblait pas fiable. En effet, dans cette étude, la souche choisie paraît tellement faible qu'elle n'est jamais létale pour la souris, même avec 250. 10⁶ CFU injectés / souris. De même, lors du test sur vaches, elle n'induit pas d'augmentation du CCI qui reste à 150 000 de moyenne alors que le seuil « CCI < 200 000 » est le critère de sélection des vaches pour cette étude. De plus, cette étude est entièrement financée par LG lifescience qui teste son enterotoxine recombinante dans son vaccin Mastovac. L'étude est enfin vivement critiquée par Middleton en 2008 qui, sans oser évoquer le conflit d'intérêt, pense que des *S. aureus* pouvaient être présents dans le lait des vaches vaccinées mais ont pu passer inaperçus car leur concentration était inférieure au seuil de détection.

4.5 Résultats obtenus

Les vaches vaccinées ont développé très significativement moins de mammites cliniques, ont eu des signes cliniques d'intensité et de durée plus faible. De plus, une réduction significative du CCI a été observée. Ces résultats positifs, qui ont déjà été observés dans certains essais vaccinaux antérieurs (autres études) chez la vache sont cependant noircis par une conclusion majeure de l'étude : l'adjuvant actif GST-CD40L testé n'a pas apporté d'améliorations. Pire, c'est l'adjuvant contrôle GST qui semble avoir eu un effet significatif sur la réduction de charge bactérienne, et les 2 vaches qui ont guéri faisaient partie de ce groupe contrôle GST. Nous sommes pourtant presque certains que l'activation du CD40 des vaches de l'étude a bien eu lieu. Nous l'avons en effet vérifié par l'augmentation de la température rectale post vaccinale dans cette expérience et nous l'avons déjà montré dans l'expérience sur les génisses. Cette activation n'a donc pas amélioré la protection vaccinale, contrairement à ce qu'avait montré l'étude préliminaire réalisée chez la souris dans notre laboratoire (Wallemacq *et al.*, 2012). Cette incohérence n'est cependant pas très surprenante, en attestent les nombreux vaccins contre *S. aureus* qui se sont révélés protecteurs chez la souris mais n'ont jamais marché chez l'homme ou la vache (Middleton, 2008 ; Holtfreter *et al.*, 2010 ; Verkaik *et al.*, 2011 ; Broker *et al.*, 2014 ; Salgado-Pabón et Schlievert, 2014). Le problème n'est pas propre aux mammites et à *S. aureus* mais semble plutôt inhérent à l'échec prédictif des modèles de recherche appliquée mettant en jeux une espèce différente de

l'espèce cible. En 2014, Salgado-Pabón et Schlievert présentent même l'attachement des chercheurs au modèle vaccinal murin contre *S. aureus* comme le principal responsable de l'échec de ces vaccins chez l'homme. Enfin, ceux qui défendent ce modèle vaccinal murin s'accordent également à dire que celui-ci est généralement mal conçu, trop éloigné de l'infection naturelle et que les bons résultats qu'il semble souvent montrer sont surévalués (Bagnoli *et al.*, 2012).

Nous remarquerons aussi que certains auteurs concluent actuellement à l'impossibilité d'obtenir une prévention absolue ou une élimination complète de *S. aureus* par la vaccination et proposent de viser une simple réduction de la sévérité des infections (Broker *et al.*, 2014 ; Fowler et Proctor, 2014). Cette approche, basée sur l'étude de la protection conférée aux porteurs de *S. aureus* chez l'homme (Verkaik *et al.*, 2009), n'est cependant pas intéressante dans le cas des mammites bovines.

5 Perspectives

5.1 Vacciner contre d'autres maladies bovines

Le test de protection vaccinale nous a montré que l'adjuvant GST-CD40L mis au point ne protégeait pas les vaches laitières des mammites à *S. aureus*. Mais cet outil ne doit pas être abandonné pour autant. Il est en effet capable, comme l'a prouvé l'étude sur les génisses, d'augmenter la réponse immune cellulaire spécifique de l'antigène vaccinal HKSA, ce qui constitue un résultat intéressant. Ainsi, si les mammites à *S. aureus* représentent un problème majeur auquel il était opportun de s'attaquer avec un principe vaccinal nouveau, d'autres maladies bovines pourraient aussi en bénéficier. Il n'est pas nécessaire de rappeler que *S. aureus*, qui plus est dans la glande mammaire, présente des capacités de résistance exceptionnelles, jusqu'ici infaillibles. Nous pouvons donc raisonnablement penser que l'échec de l'adjuvant CD40L bovin dans cette situation ne présume pas d'un échec contre d'autres pathogènes bovins, ni contre d'autres infections par *S. aureus*. Il existe en effet plusieurs maladies causées par des pathogènes intracellulaires contre lesquels la réponse cellulaire cytotoxique spécifique que nous recherchons serait utile. On peut ainsi citer les infections par le *bovine herpes virus*, *Mycobacterium bovis*, le *respiratory syncytial virus et Theileria parva* (voir introduction), dont la prévalence et les conséquences économiques sont loin d'être négligeables et contre lesquelles on pourrait produire

un vaccin plus efficace ou plus sûr (l'adjuvant CD40L faciliterait l'utilisation de pathogènes inactivés).

Enfin, le principe pourrait être testé dans la prévention des mammites causées par *Streptococcus uberis* dont la prévalence est très forte. *S. uberis* est en effet également connu pour survivre dans les cellules épithéliales mammaires et causer des infections persistantes (Matthews *et al.*, 1994 ; Tamilselvam *et al.*, 2006).

5.2 Améliorer la voie d'administration du vaccin

Nous pourrions tout d'abord utiliser la technique de vaccination ADN. Bien sûr, nous l'avons déjà dit, la vaccination ADN souffre de son manque d'efficacité chez les grands animaux. Elle constitue pourtant un mode de vaccination économiquement avantageux, présente une innocuité supérieure à celle des vecteurs viraux et favorise naturellement les réponses cellulaires cytotoxiques (Flingai *et al.*, 2013). De plus, l'injection locale au niveau de la mamelle deviendrait possible car de petits volumes pourraient être utilisés, par voie intradermique. On peut en effet penser, comme nous l'avons déjà dit plus haut, qu'une réponse vaccinale accrue se développerait au niveau du nœud lymphatique rétro mammaire et que cette défense pourrait être mobilisée plus rapidement en cas d'infection de la glande. Le problème majeur de la vaccination ADN est certainement la faible quantité de plasmides qui parvient à pénétrer dans les cellules. L'électroporation *in vivo* pourrait y remédier. Elle permet en effet l'entrée de 10 à 1000 fois plus de plasmides dans les cellules du site d'injection (Sardesai et Weiner, 2011). La faible efficacité de la vaccination ADN serait également en partie expliquée par un recrutement trop faible d'APC sur le site d'injection. L'utilisation de plasmides codant pour des chimiokines pro-inflammatoires telles IL-8, MIP ou RANTES semble une bonne solution (Flingai *et al.*, 2013). Nous remarquerons que dans notre cas, l'utilisation d'un vaccin mixte (fragments bactériens et ADN) augmenterait naturellement le recrutement des cellules immunitaires en apportant des signaux de danger.

En cas d'échec de la vaccination ADN, nous pourrions utiliser un vecteur viral. En effet, de par leur capacité à infecter les cellules, les vecteurs viraux sont plus efficaces que les plasmides pour introduire du matériel génétique dans les cellules de l'hôte. La séquence codant pour la protéine vaccinale est alors fortement exprimée et une réponse immunitaire solide se développe. De plus, la réponse cellulaire cytotoxique est facilitée. Cette voie constitue donc une alternative à notre stratégie vaccinale. Quelques inconvénients, telle l'immunité préexistante contre le vecteur ou l'intégration dans le génome (source de cancers) ne doivent cependant pas être négligés (Ura *et al.*, 2014).

Il serait enfin intéressant de favoriser l'afflux de cellules immunitaires dans la glande immunisée, de manière préventive, en l'absence d'infections. Cet afflux est en effet entravé, dans les conditions physiologiques de la lactation, par les jonctions serrées (Stelwagen et Singh, 2014). Une immunisation par voie muqueuse pourrait permettre cette stratégie (Rainard *et al.*, 2015). Cette méthode couplée à une immunisation systémique semble, de plus, accroître l'efficacité des immunisations (Hodgkinson *et al.*, 2009). L'immunisation par voie muqueuse semble d'ailleurs augmenter l'efficacité de la réponse CTL au niveau de la muqueuse (Belyakov *et al.*, 2006).

5.3 Soutenir l'action des neutrophiles

Les neutrophiles restent des éléments primordiaux dans la lutte contre *S. aureus* (Broker et al., 2014). Il est démontré que le CD40L soluble induit directement l'activation des neutrophiles (Vanichakarn *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). Cependant, cette activation constitue un phénomène de courte durée, probablement efficace dans les jours suivant l'injection du CD40L, et ne peut donc pas être utilisé lors d'une vaccination préventive. Il est donc nécessaire de trouver d'autres moyens de faciliter l'action des neutrophiles. La méthode la plus employée actuellement semble, nous en avons déjà parlé au début de la discussion, de favoriser la réponse Th17. Il paraît également raisonnable d'immuniser contre des facteurs de virulence spécialement conçus pour entraver l'action de ces neutrophiles. On pourrait ainsi immuniser contre les facteurs inhibant la chimiotaxie des neutrophiles ou contre la superoxyde dismutase. Cette idée est évoquée par Fowler et Proctor en 2014, mais, à part l'immunisation contre le SpA, dont l'élimination faciliterait le travail des anticorps et par voie de conséquence la phagocytose des *S. aureus* opsonisés par les neutrophiles (Kim *et al.*, 2012), ne semble curieusement jamais avoir été testée. Rappelons tout de même qu'un essai ciblant la protéine *target of RNAlII activating protein* (TRAP), dont l'inactivation induit des mutations du locus *agr*, a déjà été réalisé (Leitner *et al.*, 2011). Il n'était cependant pas spécifique de la virulence contre les neutrophiles. L'élimination d'un facteur de virulence plus récemment identifié pourrait également s'avérer utile : la nucléase de *S. aureus*. En effet, les neutrophiles peuvent projeter des filaments de chromatine associés aux protéines des granules azurophiles telles l'élastase et la myéloperoxydase. Cela forme les *neutrophil extracellular trap* (NET). Ces NETs bloquent et tuent les bactéries (Brinkmann *et al.*, 2004). *S. aureus* échappe aux NETs grâce à une nucléase (Berends *et al.*, 2010). Il a de plus été montré que l'adénosine produite lors de la dégradation des NETs par *S. aureus* induisait l'apoptose des macrophages (Thammavongsa *et al.*, 2013). Le lait n'empêche nullement l'action des NETs (Lippolis *et al.*, 2006), ce qui fait de ceux-ci une défense particulièrement importante. Enfin, en 2015, Pisanu et collaborateurs démontrent la formation de NETs lors d'infections bactériennes de la glande mammaire chez le mouton. La lutte contre les NETs pourrait donc tout

à fait représenter une voie de résistance majeure des *Staphylococcus aureus* du lait. Immuniser contre la nucléase de *S. aureus* semble alors une voie thérapeutique potentiellement efficace.

5.4 Combiner à d'autres adjuvants

Les ISCOMs ou les ligands des TLRs, capables de faciliter les réponses CTL pourraient être utilisés en combinaison avec notre vaccin actuel. Si un effet synergique était observé, cela permettrait peut-être de diminuer les doses de chaque composant et donc leurs effets secondaires propres. Cela permettrait peut-être aussi d'atteindre le niveau d'immunisation nécessaire à une protection efficace.

Nous pourrions également utiliser des adjuvants augmentant la réponse TH17. La technique de nano émulsion avec l'huile de soja a permis d'induire cette réponse envers plusieurs antigènes différents chez la souris (Bielinska *et al.*, 2010). D'autres adjuvants, tels la toxine cholérique, les β -glucanes et l'adjuvant complet de Freund ainsi que les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 et TGF β favorisent également cette réponse (Lin *et al.*, 2010 ; Miller et Cho, 2011). La voie d'immunisation intranasale semble elle aussi faciliter la réponse Th17 (Zygmunt *et al.*, 2009). Nous pouvons espérer que la voie mucosale intramammaire présente un mécanisme semblable.

CONCLUSION

Nous avons orienté notre travail vers la mise au point d'un outil biologique capable de stimuler la réponse immune cytotoxique chez le bovin. Une protéine activant la voie du CD40, le CD40L, a alors été choisie à cet effet. Plusieurs étapes ont été franchies. Nous avons tout d'abord produit un CD40L recombinant bovin. Nous avons plus précisément produit la partie correspondant au domaine d'homologie des TNFs, associée à une séquence d'acides aminés favorisant la trimérisation et fusionnée à la protéine GST et l'avons purifiée. Ensuite, la structure et l'activité de la protéine ont été évaluées dans plusieurs tests biochimiques et biologiques *in vitro*. Nous avons ainsi vérifié le poids moléculaire, la capacité à former des multimères et à lier physiquement le récepteur CD40 bovin. L'activité biologique de notre CD40L a été validée *in vitro* sur 3 types cellulaires différents et s'est par ailleurs révélée très supérieure à celle des CD40L commerciaux humains et de souris. Nous avons également vérifié l'absence d'endotoxines dans les protéines purifiées. Enfin, les protéines ont été utilisées comme adjuvant dans un test d'immunisation avec des bactérines de *S. aureus*. Chez les génisses ainsi vaccinées, la réponse cellulaire spécifique de *S. aureus* a été 2 fois plus forte que chez les génisses vaccinées avec les bactérines et l'adjuvant GST contrôle. Nous avons également vérifié que les LTCD8⁺ et LTCD4⁺ issus des nœuds lymphatiques vaccinés avec l'adjuvant CD40L avaient bien proliféré et pouvaient être stimulés par un nouveau contact avec des bactérines de *S. aureus*. La prolifération des LTCD8⁺ et LTCD4⁺ issus des nœuds lymphatiques contrôles (GST⁺ bactérines) était 2 fois plus faible. Nous avons par ailleurs constaté une diminution de la réponse aspécifique au profit de cette réponse contre les bactérines pour les différentes cellules immunitaires testées lors des restimulations *in vitro*. Bien que nous n'ayons pas prouvé l'augmentation de la réponse CTL, nos résultats montrent, *in vivo* comme *in vitro*, le solide pouvoir activateur du CD40L produit et laissent penser que cet outil pourrait adjuvanter efficacement un vaccin bovin. L'expérience de protection vaccinale a malheureusement montré son incapacité à prévenir les mammites bovines à *S. aureus* et d'autres applications moins ambitieuses devraient maintenant être considérées. D'éventuelles synergies avec d'autres adjuvants devraient également être testées. Enfin, en cas de succès dans une éventuelle autre étude, l'utilisation de notre adjuvant pourrait par la suite satisfaire les contraintes économiques de l'élevage grâce à la technique de vaccination ADN, pour laquelle nous avons déjà produit des outils efficaces *in vitro*.

ANNEXES

Annexe n°1 : D'où viennent les coûts des mammites ?

Les coûts sont liés au prix des traitements médicaux, à la mortalité éventuelle ou réforme de la vache, au lait jeté, aux pénalités sur la qualité du lait et enfin à la baisse de production. Ces coûts ne sont pas perçus de la même manière par les éleveurs.

Les coûts des traitements médicaux administrés, de la mort ou de l'euthanasie de la vache malade sont immédiatement ressentis. De fait, ils ont longtemps été les seuls à pouvoir être clairement évalués (Huijps *et al.*, 2008). Ces coûts sont imputables aux seules mammites cliniques, qui, en conséquence, ont été identifiées et prises en charge précocement dans l'histoire de l'élevage laitier. Pourtant, en réalité, ils ne constituent qu'une faible proportion du coût global des mammites (Kossaibati et Esslemont, 1997).

Inversement, la perte de revenu induite par la diminution de la production laitière de la vache atteinte, et dans une moindre mesure, par les pénalités à la vente du lait chargé en cellules somatiques, est plus difficile à évaluer. Elle est majoritairement la conséquence du second type de mammites décrit brièvement dans l'introduction : les mammites subcliniques. Pour illustrer le coût de l'altération du lait induite par ces dernières, on peut prendre l'exemple du prix de vente en France d'une tonne de lait à haut taux cellulaire, qui est actuellement amputé de 3 euros entre 250 000 et 300 000 cellules par ml et de 15 euros au-dessus de 400 000 (Modalités de paiement du lait, laboratoire interprofessionnel laitier du centre-ouest). Il existe aussi des pénalités pour la pression bactérienne dans le lait et pour l'indice de lipolyse augmenté. La perte de rendement de production, l'autre conséquence majeure, peut parfois être supérieure à 1000 litres par lactation (Hortet *et al.*, 1999 ; Seeger *et al.*, 2003). Le coût de cette dernière représente à lui seul au moins 70% du total (DeGraves et Fetrow, 1993; Seegers *et al.*, 2003).

Il convient de remarquer qu'une mammite clinique induira aussi, bien évidemment, cette baisse de production qui n'est donc pas l'apanage des infections subcliniques. En réalité, si la perte de production dans le cheptel laitier est majoritairement imputable aux mammites subcliniques, c'est uniquement parce qu'elles sont de très loin les plus fréquentes (Seeger *et al.*, 2003). Nous devons de même signaler que les mammites subcliniques persistantes entraînent la réforme des vaches et que, de fait, la perte de la vache atteinte n'est pas la conséquence des seules mammites cliniques.

Annexe n°2 : le vaccin

Un vaccin peut être défini comme une préparation biologique qui augmente l'immunité contre une maladie particulière. Il contient 2 groupes de composants : les antigènes et les adjuvants. L'antigène est défini comme un élément reconnu par les récepteurs du système immunitaire adaptatif. L'adjuvant est une substance qui augmente la stimulation du système immunitaire en favorisant la présentation de l'antigène et/ou en délivrant des signaux immunomodulateurs (Siegrist, 2008).

Annexe n°3 : Découverte des résidus impliqués dans la liaison CD40-CD40L*Résidus du CD40*

En 1995, Bajorath et collaborateurs réalisent un premier modèle pour prédire la structure du CD40 et la composition de son site de liaison. Il est basé sur l'étude en cristallographie du TNF- β et de son récepteur (Banner *et al.*, 1993) et met déjà en évidence l'implication des acides aminés E74, Y82, D84, N86 et E117 du récepteur. En 1997, Bajorath et collaborateurs réalisent un second modèle plus précis du CD40 à partir de la nouvelle cristallographie du TNFR de Naismith et collaborateurs de 1995. Ce modèle prédit l'intervention des acides aminés E74, Y82, D84, N86 et E117 du CD40 dans la liaison avec le CD40L. Sur base de leur proximité avec ces derniers, les acides T75, H76, H78, L87 et S118 sont également présumés importants. En 1998, Singh et collaborateurs étudient également le récepteur CD40 et les acides aminés impliqués dans son site de liaison. Ils remarquent que la distance entre les aas S65, E66, T70, R73, E74, H76, C77, H78, 479, K81, Y82, D84, N86, T112, E114, A115, E117 et le CD40L est suffisamment courte pour les impliquer dans la liaison. Ils remarquent de plus que ce site du CD40 comporte 3 aas acides (D84, E114 et E117) qui semblent correspondre avec les 3 aas basiques (K143, R203 et R207) du CD40L. Enfin, en 2011, l'étude d'An et collaborateurs apportent la liste définitive.

Résidus du CD40L

Comme pour le CD40, les premiers acides aminés du CD40L présumés impliqués dans le site de liaison ont été présentés par Bajorath et collaborateurs en 1995 sur base du modèle issu de la cristallographie du TNF. Ils identifient K143, Y145, Y146, R203 et Q220. En 1998, Singh et collaborateurs allongent la liste en décrivant I127, S128, E129, E142, K143, G144, Y145, Y146, C178, S185, Q186, A187, R200, F201, R203, R207, C218, Q220, S248, H249, G250, T251 et G252 comme participant à la liaison avec CD40. Enfin, la liste définitive est donnée en 2011 par An et collaborateurs

Annexe n°4 : Découvertes des voies de transduction associées au CD40

En 1986, Clark et Ledbetter activent le CD40 avec des anticorps monoclonaux et démontrent qu'il permet la prolifération des lymphocytes B. Peu de temps après, des informations sur la voie de signalisation consécutive à l'activation arrivent. Ainsi, en 1988, Einfeld et collaborateurs montrent que la stimulation des lymphocytes B avec anti-CD40 induit la phosphorylation des sérines et thréonines du CD20. La phosphorylation des sérines et thréonines du CD40 suite à sa stimulation est montrée en 1990 par Clark et Shu. De plus, elle implique une molécule intermédiaire, une kinase, puisque le CD40 ne possède pas d'activité kinase (Paulie *et al.*, 1989). En 1988, Gordon et collaborateurs montrent que la stimulation du CD40 des lymphocytes B induit leur agrégation appelée adhésion homotypique. Il est ensuite démontré qu'une voie dépendante des tyrosines kinases permet l'adhésion homotypique (Kansas et Tedder, 1991). Ce résultat implique la présence de 2 molécules intermédiaires supplémentaires : la tyrosine kinase et son substrat qui n'est pas le CD40 puisque celui-ci ne possède pas de tyrosines sur son extrémité cytoplasmique (Stamenkovic *et al.*, 1989). La production d'IgE donc la commutation isotypique, induite par les anti-CD40 en présence d'IL-4 est mise en évidence dès 1990 par Jabara et collaborateurs. En 1990, Inui et collaborateurs remarquent que l'activation de la prolifération des lymphocytes B *via* les anticorps anti-CD40 est inhibée par la délétion ou substitution de la thréonine 234 de l'extrémité cytoplasmique du CD40. En 1991, Uckun et collaborateurs montrent que la stimulation de CD40 induit l'augmentation de la phosphorylation des sérines / thréonines et de la tyrosine de nombreux substrats cellulaires. Au début de l'année 1994, Ren et collaborateurs confirment que les protéines tyrosine kinase (PTK), jouent un rôle majeur dans l'adhésion homotypique et la commutation isotypique induites par l'engagement du CD40 et montrent que celui-ci active aussi la phosphatidylinositol 3-kinase (Pi3K). Ils constatent en effet que l'engagement du CD40 active *lyn*, une *src* kinase, et augmente la phosphorylation de la Pi3K ainsi que la production d'IP3. La phospholipase C γ 2 permettant la synthèse d'IP3, ils suspectent également son activation par CD40. Toujours en 1994, Hu et collaborateurs mettent en évidence, par la technique du *Yeast two hybrid system*, la présence d'une protéine capable de lier la partie cytoplasmique du CD40. Ils découvrent que cette protéine, qui sera plus tard identifiée comme TRAF3, possède sur sa partie C terminale, une séquence similaire au *TNF receptor associated factor* (TRAF) découvert 1 mois plus tôt par Rothe et collaborateurs et qui permet la transduction du signal du TNFR2. Cette dernière équipe démontre en 1995 l'association CD40-TRAF2 suite à l'engagement du CD40 (ainsi que l'association TNFR2-TRAF2 suite à l'engagement du TNFR2) et qu'elle induit l'activation de NF- κ B. En 1996, les associations CD40-TRAF5 puis CD40-TRAF6 sont démontrées par Ishida et collaborateurs. Ce n'est qu'en 1998 que la dernière association, CD40-TRAF1 est découverte (Pullen *et al.*, 1998).

Annexe n° 5: détail des voies de transduction du CD40

Les voies dépendantes des TRAFs*Description des TRAFs*

Les TRAFs sont des protéines cytoplasmiques composées d'un domaine d'homologie de la famille des TRAFs long de 180 acides aminés à l'extrémité C-terminale appelé TRAF-C, d'une séquence TRAF-N plus variable de structure *coiled coil*, de doigts de zinc et d'une séquence RING (*Really Interesting New Gene*) N-Terminal (Figure C1 A). Le RING N-terminal est considéré comme indispensable au fonctionnement des TRAFs (Bishop *et al.*, 2002 ; Chung *et al.*, 2002). TRAF 1 est dépourvu de RING et les *zinc fingers* ne sont pas arrangés en *Cysteine rich associated with ring and TRAF* (Bradley et Pober, 2001). Le domaine C terminal a la capacité de lier l'extrémité cytoplasmique des TNFRs. Suite à la liaison du CD40L, le CD40, probablement trimérisé recrute des trimères de TRAF (Figure C1 B). Il interagit par l'intermédiaire de 3 motifs distincts de sa queue cytoplasmique, avec plusieurs TRAFs différents : TRAF 1, 2, 3, 5 et 6. Jusqu'au début des années 2000, les TRAFs sont considérés comme de simples adaptateurs sans activité enzymatique propre, qui induisent l'ubiquitination et la phosphorylation de protéines par recrutement d'enzymes sur le complexe CD40-TRAF. Cependant, dès 2000, Deng et collaborateurs suspectent une activité E3 ubiquitine ligase. Il est aujourd'hui admis que si les doigts de zinc permettent de lier différentes protéines intracellulaires, le RING de la partie N terminale est capable de les modifier par ubiquitination (Bishop *et al.*, 2007 ; Karin et Gallagher, 2009 ; Yin *et al.*, 2009 ; Graham *et al.*, 2010). La phosphorylation par contre n'est réalisée que par les kinases associées au complexe. Chaque TRAF, à l'exception de TRAF2 reconnaît un site particulier de l'extrémité cytoplasmique de CD40. Les 3 sites connus sont exposés sur la figure C1 C.

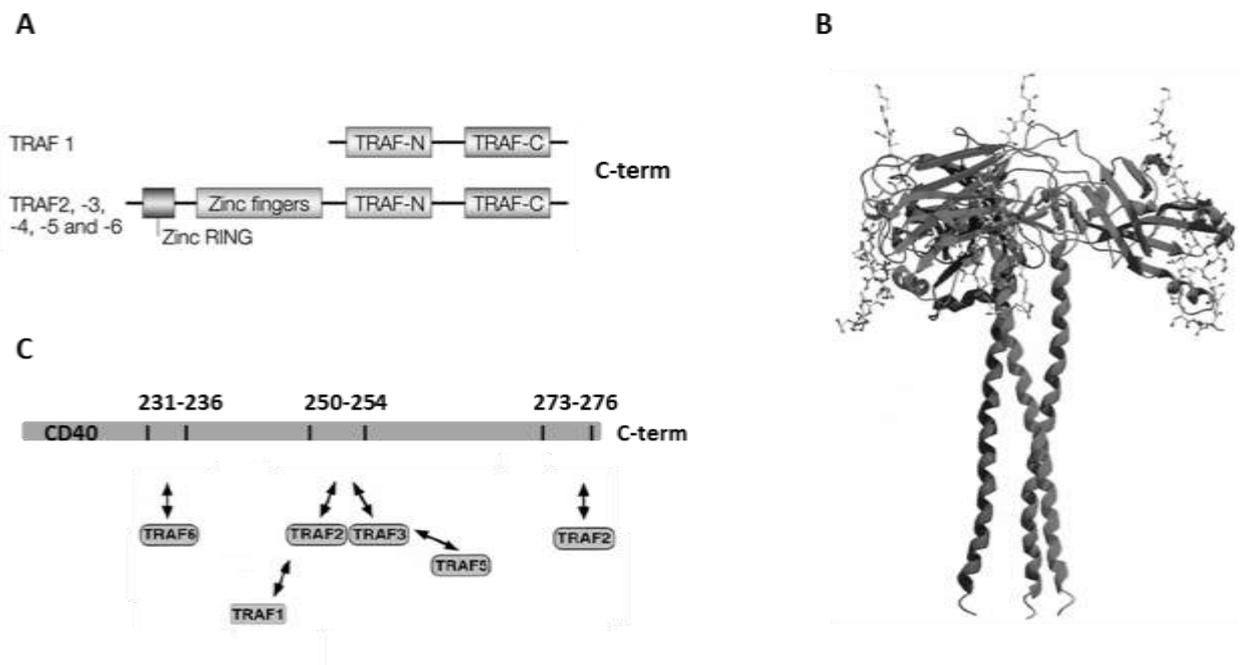


Figure C1. Description des TRAFs et de leurs sites de liaison sur CD40. La figure C1 A schématise les TRAFs 1 à 6 et leurs principaux domaines fonctionnels (D'après Bishop, 2004). La figure C1 B illustre la structure tridimensionnelle de l'interaction entre un trimère de TRAF3 et un trimère de CD40 (Ni *et al.*, 2000). L'extrémité cytoplasmique de CD40 est représentée en *balls and sticks* bleus. La figure C1 C répertorie les 3 sites de liaison TRAF-CD40, d'après van Kooten et Banchereau en 2000 et Lu et collaborateurs en 2003.

Nous remarquerons que les mécanismes détaillés dans cette partie ont principalement été validés dans les lymphocytes B. Ils sont cependant présents dans beaucoup d'autres cellules.

La voie JNK/ p38

Selon Matzuwa et collaborateurs en 2008 (figure C2), l'activation du CD40 induit le recrutement de TRAF2, TRAF3, l'ubiquitin ligase E3 K48 spécifique, *cellular inhibitor of apoptosis* (c-IAP) et l'E2 K63 spécifique Ubc13. Le complexe membranaire ainsi formé recrute alors I κ K- γ et la *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAP3K) MEKK1 et le stabilisent par la fixation d'une chaîne de polyubiquitine K63 sur I κ K- γ . C-IAP ajoute une chaîne d'ubiquitine K48 sur TRAF3 qui est en conséquence dégradé. Le complexe est alors libéré dans le cytosol où MEKK1 est activé par phosphorylation. MKK4 est également retrouvé dans ce complexe. P38 est activée par plusieurs MAP kinases notamment des MAP3k qui sont également activatrices des *c-Jun N-terminal Kinases* (JNKs) tout comme les MKK4 ce qui explique la co activation (Zarubin et Han, 2005 ; Gallagher *et al.*, 2007). Une fois activé, p38 active d'autres kinases et de très nombreux facteurs de transcription tels NF-AT, p53 et ATF2. ATF2 est connu pour s'associer avec les facteurs de transcription de la famille JNK et activer ainsi AP-1 (Zhao *et al.*, 2001). JNK active également AP-1 *via* le facteur de transcription c-jun. P38 induit de plus la production de cytokines pro-inflammatoires et l'apoptose (Kummer *et al.*, 1997). En 2009, Karin et Gallagher ont confirmé que l'E2 ubiquitine Ubc 13 était nécessaire à l'activation de JNK et de p38 par CD40.

La voie canonique d'activation de NF- κ B

Cette voie classique d'activation de NF- κ B est déclenchée par l'activation d'une large gamme de récepteurs tels les TLRs, les récepteurs antigéniques BCR et TCR des lymphocytes et l'ensemble des TNFRs. Elle a pour élément central la dégradation de l'inhibiteur alpha de NF- κ B (I κ B α) découvert en 1990 par Zabel et Baeuerle et qui agit par neutralisation des sous unités p65 et p50 de NF- κ B. L'activation de CD40 induit l'ubiquitination de RIP1 (Zhang *et al.*, 2000 ; Habelah *et al.*, 2010) et de TRAF2 dans le complexe CD40- TRAF2- TRAF1. La conséquence est l'activation de *TGF β -activated kinase 1* (TAK 1) qui active à son tour l'*I κ B kinase* (I κ K). I κ K, composé des sous-unités catalytiques I κ K α et I κ K β et de l'unité régulatrice I κ K γ , phosphoryle alors I κ B α ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation. Cela libère les sous-unités p65/p50 de NF- κ B qui peuvent alors migrer dans le noyau et activer le gène cible. Chez les lymphocytes B, l'activation de la voie canonique de NF- κ B (sous-unité p50) par CD40 induit l'expression de CD80, la sécrétion d'IgM, l'activation de Pim-1 kinase (kinase du proto oncogène pim-1) et la commutation isotypique vers les IgE (Bishop et Hostager, 2001). Une régulation positive de CD23, CD95 et CD54 y est également partiellement liée.

La voie non canonique d'activation de NF- κ B

Cette voie, illustrée par la figure C3 (Habelah *et al.*, 2010) suit l'activation d'un nombre restreint de TNFR et possède une cinétique plus lente que la précédente (Bishop et Hostager, 2001). Elle a été décrite pour la première fois en 2001 par Senftleben et collaborateurs. Comme dans la voie JNK/p38, elle débute avec le recrutement de TRAF2, TRAF3, cIAP1/2 et Ubc13 sur CD40. L'étape cruciale est la dégradation de TRAF3 permettant la libération de NF- κ B *inducing kinase* (NIK) (Habelah *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2011). NIK active I κ K α qui phosphoryle la protéine inhibitrice « I κ B like » p100, liée à l'unité RelB de NF- κ B. Une fois phosphorylée, p100 est

incomplètement dégradée *via* le protéasome ce qui génère l'unité p52 et libère RelB. P52 et RelB s'associent alors et migrent dans le noyau pour activer le gène cible (Coope *et al.*, 2002).

La voie Pi3K/Akt

Enfin, le recrutement de TRAF 6 par CD40 induit l'activation de la protéine kinase B (PKB), également appelée akt. En effet, comme nous l'avons évoqué plus haut, l'engagement du CD40 active la src kinase *lyn* (une tyrosine kinase), et augmente la phosphorylation de la Pi3Kinase ainsi que la production d'IP3 (Ren *et al.*, 1994). Les c-Cbl (casitas B-lineage lymphoma-c) sont des protéines adaptatrices qui régulent négativement les kinases, notamment tyrosines kinases src et les PI3K par ubiquitination (Hartley *et al.*, 1995 ; Levkowitz *et al.*, 1999). Cependant, en 2001, Arron et collaborateurs montrent que la stimulation du CD40 des DCs et des lymphocytes B induit le recrutement d'un complexe TRAF6- src- c-Cbl- PI3K dans lequel c-Cbl est indispensable à l'activation de PKB. En 2003, Deregibus et collaborateurs montrent, dans les cellules endothéliales stimulées par CD40L, la formation d'un complexe CD40- TRAF2- TRAF6- c-Cbl- PI3k, en corrélation avec une augmentation de l'activité de PKB et un effet anti apoptotique. On sait en effet que PKB induit la survie cellulaire par phosphorylation de différents facteurs impliqués dans l'apoptose ou la transcription de gènes. On remarquera qu'en fonction du type cellulaire, l'activation du CD40 peut aussi inhiber cette voie et avoir un effet pro apoptotique (Davies *et al.*, 2004).

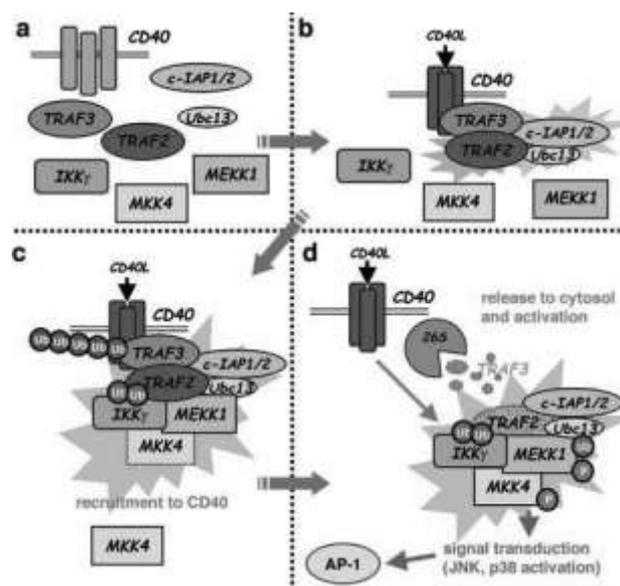


Figure C2. Activation de la voie JNK/p38 par CD40 d'après Matsuzawa et collaborateurs en 2008. En a, le CD40 non stimulé est seul dans la membrane. En b, CD40 activé recrute TRAF2, TRAF3, cIAP et Ubc13. En c, le complexe membranaire recrute MEKK1 et IkK- γ et les stabilise. Enfin, en d, cIAP1/2 ubiquitine TRAF3 avec une chaîne K48 induisant sa dégradation. Sans TRAF3, le complexe est libéré ce qui induit la phosphorylation de MEKK1 et MKK4. Ceux-ci activent à leur tour JNK et p38.

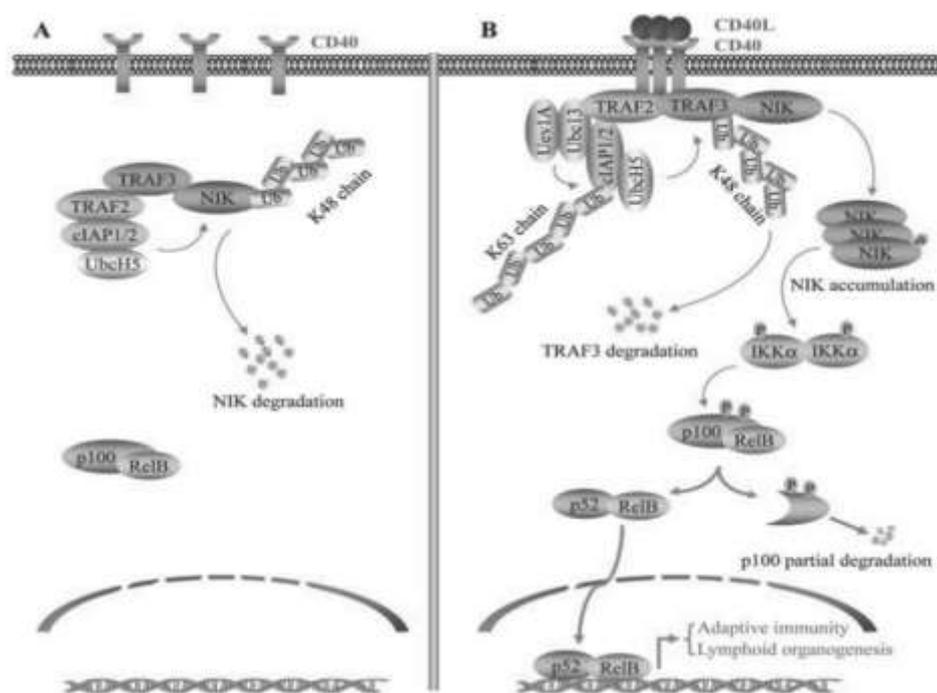


Figure C3. Activation de la voie non canonique de NF- κ B par CD40 (D'après Habelhah *et al.*, 2010). A. Sans stimulation, TRAF3 recrute NIK dans le complexe TRAF3-TRAF2-cIAP1/2 où il est dégradé. B. l'activation du CD40 induit l'ubiquitination K63 de cIAP1/2 par TRAF2. Cette ubiquitination stimule l'activité E3 ligase K48 de cIAP1/2 sur TRAF3 qui est dégradé. NIK est alors libéré et peut phosphoryler I κ K α , ce qui active NF- κ B.

La voie indépendante des TRAFs

Il existe une voie mettant en jeu la Janus kinase 3 (JAK3) et qui permet l'activation de STAT5. D'après Hubbard et Till, en 2000, les JAKs sont des protéines cytoplasmiques qui font partie des *non receptor tyrosine kinase*. Elles s'associent de manière non covalente à l'extrémité cytoplasmique d'un récepteur de cytokines suite à la multimérisation induite par la fixation du ligand de ce dernier. Ainsi activée, JAK3 phosphoryle le récepteur, ce qui crée un site de liaison pour STAT5. STAT5 est alors phosphorylé par JAK3 et se dimérise. Le dimère est ensuite activement transféré dans le noyau où il induit la transcription. La présence d'un site de liaison pour JAK3 sur l'extrémité cytoplasmique du CD40 a été montrée par Hanissian et Geha en 1997. Il faut signaler que ce recrutement de JAK3 suite à l'engagement de CD40 n'aurait pas lieu chez les Lymphocytes B mais serait fonctionnel sur les APC (Revy *et al.*, 1999).

Annexe n°6 : évidences historiques du rôle de CD40 dans l'immunité humorale

Jusqu'à la fin des années 1980, toutes les études visant à induire la production d'IgE par des lymphocytes B purifiés et cultivés *in vitro* mènent à la même conclusion : la commutation isotypique vers les IgE n'est réalisée qu'en combinant les cytokines IL-4, IL-6 et une stimulation par les lymphocytes T (Vercelli *et al.*, 1989). Il en fut de même pour toutes autres tentatives d'activation des lymphocytes B, telle l'induction de la prolifération et de la différenciation, qui semblait également requérir le contact avec les lymphocytes T activés ou des portions de membrane de ces lymphocytes T et des cytokines (Brian, 1988 ; Noelle *et al.*, 1989 ; Bartlett *et al.*, 1989 ; Hodgkin *et al.*, 1990). Bartlett et collaborateurs étaient cependant parvenus à mieux détailler les stimulations requises pour les différentes étapes de la prolifération des lymphocytes B en montrant en 1989 que l'interaction avec des membranes de lymphocytes T activés mène les lymphocytes B en phase G1 et que les cytokines sont nécessaires pour atteindre la phase S du cycle cellulaire. Ils le confirment en 1990 en observant le même phénomène lorsque les lymphocytes T activés sont remplacés par des portions de leur membrane. La commutation isotypique « T-indépendante » vers les IgE est enfin réussie, à la fin de l'année 1990, par Jabara et collaborateurs, grâce à la stimulation des lymphocytes B purifiés avec un anti-CD40 agoniste et de l'IL-4. Par la suite, des études *in vivo* montrent, *via* la neutralisation du CD40L avec des anticorps que l'activation du récepteur CD40 est indispensable à la formation des centres germinatifs, au développement de l'immunité T-dépendante et à la production de cellules B mémoires (Foy *et al.*, 1993 et 1994 ; Banchereau *et al.*, 1994).

Annexe n°7 : Découverte de l'interaction APC-LThelper-CTL

Dès 1970, Brestcher et Cohn démontrent l'implication d'une cellule présentatrice d'antigène (APC) dans l'activation des lymphocytes T. En 1978, 3 ans après avoir démontré la restriction au CMH des lymphocytes T, Zinkernagel et collaborateurs proposent l'intervention d'un lymphocyte T 'helper' pour expliquer l'induction de CTLs. L'implication de ce T helper sera confirmée en 1982 par Keene et Forman. Ils proposent ainsi un modèle dans lequel, le lymphocyte Th doit interagir avec la même cellule présentatrice d'antigènes et au même instant que le futur CTL pour fournir un co-signal capable d'activer efficacement ce dernier. Une alternative à ce mécanisme apparaît en 1992, lorsqu'une étude de Guerder et Matzinger montre que le LTCD4⁺ modifie l'APC qui devient une cellule stimulatrice potentielle pour le LTCD8⁺. Cette théorie est soutenue par la mise en évidence de l'importance du CD86 dans la stimulation des CTLs et dont l'expression sur l'APC est induite à la fois par les virus et par les LTCD4⁺ (Townsend et Allison, 1993 ; Wu et Liu, 1994). Elle devient absolument convaincante lorsque la déplétion des LTCD4⁺ et leur remplacement par des anti-CD40 induit des CTLs *in vivo* (Ridge *et al.*, 1998). Ils montrent également que l'APC stimulant les CTLs est la DC. La disparition de la nécessité de contact LTCD8⁺-LTCD4⁺ explique également le fait que les réponses CTL aux infections virales soient, en fonction du type de virus, parfois dépendantes et parfois indépendantes des LTCD4⁺ (Buller *et al.*, 1987 ; Mackey *et al.*, 1998). Il suffit en effet que certains virus stimulent suffisamment la DC pour qu'elle puisse se passer du signal fourni par le LTCD4⁺. L'existence de ces 2 cas de figure s'explique par le fait qu'ils mènent tous 2 au seul évènement crucial pour l'activation des CTLs : la présentation d'antigènes sur le CMH I de l'APC. La présentation sur le CMH I est la voie classique de présentation des antigènes synthétisés au sein de la cellule. Il s'agit donc généralement d'antigènes issus de virus infectant la cellule. Dans la mesure où l'élimination des cellules infectées est l'arme la plus efficace contre les virus, il est logique que la présentation sur le CMH I mène à l'activation des CTL.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, A. B., N. Shirasugi, T. R. Jones, M. M. Durham, E. A. Strobert, S. Cowan, P. Rees, R. Hendrix, K. Price, N. S. Kenyon, D. Hagerty, R. Townsend, D. Hollenbaugh, T. C. Pearson and C. P. Larsen (2005). "Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival." *J Immunol* 174(1): 542-550.
- Adlam, C., P. D. Ward, A. C. McCartney, J. P. Arbutnot and C. M. Thorley (1977). "Effect immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits." *Infection and Immunity* 17(2): 250-256.
- Advani, R., A. Forero-Torres, R. R. Furman, J. D. Rosenblatt, A. Younes, B. Shankles, K. Harrop and J. G. Drachman (2006). "SGN-40 (Anti-huCD40 mAb) Monotherapy Induces Durable Objective Responses in Patients with Relapsed Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma: Evidence of Antitumor Activity from a Phase I Study." *ASH Annual Meeting Abstracts* 108(11): 695-.
- Akagi, R., T. Takahashi and S. Sassa (2002). "Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure." *Jpn J Pharmacol* 88(2): 127-132.
- Akira, S. and H. Hemmi (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." *Immunol Lett* 85(2): 85-95.
- Aldinucci, D., B. Rapana, K. Olivo, D. Lorenzon, A. Gloghini, A. Colombatti and A. Carbone (2010). "IRF4 is modulated by CD40L and by apoptotic and anti-proliferative signals in Hodgkin lymphoma." *Br J Haematol* 148(1): 115-118.
- Alexandroff, A. B., A. M. Jackson, T. Paterson, J. L. Haley, J. A. Ross, D. L. Longo, W. J. Murphy, K. James and D. D. Taub (2000). "Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours." *Mol Immunol* 37(9): 515-526.
- Allen, C. D., T. Okada and J. G. Cyster (2007). "Germinal-center organization and cellular dynamics." *Immunity* 27(2): 190-202.
- Amorena, B., R. Baselga and I. Albizu (1994). "Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine." *Vaccine* 12(3): 243-249.
- An, H. J., Y. J. Kim, D. H. Song, B. S. Park, H. M. Kim, J. D. Lee, S. G. Paik, J. O. Lee and H. Lee (2011). "Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation." *J Biol Chem* 286(13): 11226-11235.
- Andre, P., L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad and D. R. Phillips (2002a). "Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease." *Circulation* 106(8): 896-899.
- Andre, P., K. S. Prasad, C. V. Denis, M. He, J. M. Papalia, R. O. Hynes, D. R. Phillips and D. D. Wagner (2002b). "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." *Nat Med* 8(3): 247-252.
- Archer, N. K., J. M. Harro and M. E. Shirliff (2013). "Clearance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage is T cell dependent and mediated through interleukin-17A expression and neutrophil influx." *Infect Immun* 81(6): 2070-2075.
- Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski and et al. (1992). "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40." *Nature* 357(6373): 80-82.
- Armitage, R. J., T. W. Tough, B. M. Macduff, W. C. Fanslow, M. K. Spriggs, F. Ramsdell and M. R. Alderson (1993). "CD40 ligand is a T cell growth factor." *Eur J Immunol* 23(9): 2326-2331.
- Arron, J. R., M. Vologodskaja, B. R. Wong, M. Naramura, N. Kim, H. Gu and Y. Choi (2001). "A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation." *J Biol Chem* 276(32): 30011-30017.
- Atalla, H., C. Gyles, C. L. Jacob, H. Moisan, F. Malouin and B. Mallard (2008). "Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis." *Foodborne Pathog Dis* 5(6): 785-799.
- Atalla, H., C. Gyles and B. Mallard (2010). "Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells." *Vet Microbiol* 143(2-4): 319-328.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Atalla, H., C. Gyles, B. Wilkie, K. Leslie and B. Mallard (2009). "Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains." *Vet Microbiol* 137(3-4): 326-334.
- Aukrust, P., F. Muller, T. Ueland, T. Berget, E. Aaser, A. Brunsvig, N. O. Solum, K. Forfang, S. S. Froland and L. Gullestad (1999). "Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes." *Circulation* 100(6): 614-620.
- Auten, M. W., W. Huang, G. Dai and A. J. Ramsay (2012). "CD40 ligand enhances immunogenicity of vector-based vaccines in immunocompetent and CD4⁺ T cell deficient individuals." *Vaccine* 30(17): 2768-2777.
- Baccam, M. and G. A. Bishop (1999). "Membrane-bound CD154, but not CD40-specific antibody, mediates NF-kappaB-independent IL-6 production in B cells." *Eur J Immunol* 29(12): 3855-3866.
- Bagnoli, F., S. Bertholet and G. Grandi (2012). "Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 16.
- Bajorath, J. (1998). "Detailed comparison of two molecular models of the human CD40 ligand with an x-ray structure and critical assessment of model-based mutagenesis and residue mapping studies." *J Biol Chem* 273(38): 24603-24609.
- Bajorath, J., N. J. Chalupny, J. S. Marken, A. W. Siadak, J. Skonier, M. Gordon, D. Hollenbaugh, R. J. Noelle, H. D. Ochs and A. Aruffo (1995). "Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction." *Biochemistry* 34(6): 1833-1844.
- Bajorath, J., J. S. Marken, N. J. Chalupny, T. L. Spoon, A. W. Siadak, M. Gordon, R. J. Noelle, D. Hollenbaugh and A. Aruffo (1995). "Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis." *Biochemistry* 34(31): 9884-9892.
- Bajorath, J., R. Stenkamp and A. Aruffo (1993). "Knowledge-based model building of proteins: concepts and examples." *Protein Sci* 2(11): 1798-1810.
- Baker, M. P., A. G. Eliopoulos, L. S. Young, R. J. Armitage, C. D. Gregory and J. Gordon (1998). "Prolonged phenotypic, functional, and molecular change in group I Burkitt lymphoma cells on short-term exposure to CD40 ligand." *Blood* 92(8): 2830-2843.
- Balasa, B., T. Krahl, G. Patstone, J. Lee, R. Tisch, H. O. McDevitt and N. Sarvetnick (1997). "CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice." *J Immunol* 159(9): 4620-4627.
- Ballesteros-Tato, A., B. Leon, F. E. Lund and T. D. Randall (2013). "CD4⁺ T helper cells use CD154-CD40 interactions to counteract T reg cell-mediated suppression of CD8⁺ T cell responses to influenza." *J Exp Med* 210(8): 1591-1601.
- Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset and S. Saeland (1994). "The CD40 antigen and its ligand." *Annu Rev Immunol* 12: 881-922.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher and W. Lesslauer (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." *Cell* 73(3): 431-445.
- Bardiau, M., J. Detilleux, F. Farnir, J. G. Mainil and I. Ote (2014). "Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis." *Vet Microbiol* 169(1-2): 74-79.
- Barkema, H. W., Y. H. Schukken and R. N. Zadoks (2006). "Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis." *J Dairy Sci* 89(6): 1877-1895.
- Barrett, D. J., A. M. Healy, F. C. Leonard and M. L. Doherty (2005). "Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the Republic of Ireland." *Ir Vet J* 58(6): 333-337.
- Bartlett, W. C., J. McCann, D. M. Shepherd, M. Roy and R. J. Noelle (1990). "Cognate interactions between helper T cells and B cells. IV. Requirements for the expression of effector phase activity by helper T cells." *J Immunol* 145(12): 3956-3962.
- Bartlett, W. C., A. Michael, J. McCann, D. Yuan, E. Claassen and R. J. Noelle (1989). "Cognate interactions between helper T cells and B cells. II. Dissection of cognate help by using a class II-restricted, antigen-specific, IL-2-dependent helper T cell clone." *J Immunol* 143(6): 1745-1754.
- Basu, U., A. Franklin, B. Schwer, H. L. Cheng, J. Chaudhuri and F. W. Alt (2009). "Regulation of activation-induced cytidine deaminase DNA deamination activity in B-cells by Ser38 phosphorylation." *Biochem Soc Trans* 37(Pt 3): 561-568.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bavendiek, U., P. Libby, M. Kilbride, R. Reynolds, N. Mackman and U. Schonbeck (2002). "Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1." *J Biol Chem* 277(28): 25032-25039.
- Baxendale, A. J., C. W. Dawson, S. E. Stewart, V. Mudaliar, G. Reynolds, J. Gordon, P. G. Murray, L. S. Young and A. G. Eliopoulos (2005). "Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth." *Oncogene* 24(53): 7913-7923.
- Beland, J. L., H. Adler, N. C. Del-Pan, W. Kozlow, J. Sung, W. Fanslow and I. J. Rimm (1998). "Recombinant CD40L treatment protects allogeneic murine bone marrow transplant recipients from death caused by herpes simplex virus-1 infection." *Blood* 92(11): 4472-4478.
- Belyakov, I. M., V. A. Kuznetsov, B. Kelsall, D. Klinman, M. Moniuszko, M. Lemon, P. D. Markham, R. Pal, J. D. Clements, M. G. Lewis, W. Strober, G. Franchini and J. A. Berzofsky (2006). "Impact of vaccine-induced mucosal high-avidity CD8⁺ CTLs in delay of AIDS viral dissemination from mucosa." *Blood* 107(8): 3258-3264.
- Belz, G. T., D. Wodarz, G. Diaz, M. A. Nowak and P. C. Doherty (2002). "Compromised influenza virus-specific CD8⁽⁺⁾-T-cell memory in CD4⁽⁺⁾-T-cell-deficient mice." *J Virol* 76(23): 12388-12393.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help." *J Exp Med* 186(1): 65-70.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* 393(6684): 478-480.
- Berends, E. T., A. R. Horswill, N. M. Haste, M. Monestier, V. Nizet and M. von Kockritz-Blickwede (2010). "Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps." *J Innate Immun* 2(6): 576-586.
- Bergqvist, P., E. Gardby, A. Stensson, M. Bemark and N. Y. Lycke (2006). "Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers." *J Immunol* 177(11): 7772-7783.
- Berube, B. J. and J. Bubeck Wardenburg (2013). "Staphylococcus aureus alpha-toxin: nearly a century of intrigue." *Toxins (Basel)* 5(6): 1140-1166.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *J Exp Med* 143(5): 1283-1288.
- Bevan, M. J. (1989). "Immunology. Stimulating killer cells." *Nature* 342(6249): 478-479.
- Bielinska, A. U., M. Gerber, L. P. Blanco, P. E. Makidon, K. W. Janczak, M. Beer, B. Swanson and J. R. Baker, Jr. (2010). "Induction of Th17 cellular immunity with a novel nanoemulsion adjuvant." *Crit Rev Immunol* 30(2): 189-199.
- Bishop, G. A. (2004). "The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function." *Nat Rev Immunol* 4(10): 775-786.
- Bishop, G. A. and B. S. Hostager (2001). "Molecular mechanisms of CD40 signaling." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49(2): 129-137.
- Bishop, G. A., B. S. Hostager and K. D. Brown (2002). "Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes." *J Leukoc Biol* 72(1): 19-23.
- Bishop, G. A., C. R. Moore, P. Xie, L. L. Stunz and Z. J. Kraus (2007). "TRAF proteins in CD40 signaling." *Adv Exp Med Biol* 597: 131-151.
- Bishop, GA. Decker, DA. , Hostager , BS. 2012 ; Encyclopedia of signaling molecules <http://www.springer.com/us/book/9781441904607#aboutBook>
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, R. J. Noelle and D. A. Vallera (1998). "CD4⁽⁺⁾ T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L:CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses." *J Clin Invest* 102(3): 473-482.
- Blink, E. J., A. Light, A. Kallies, S. L. Nutt, P. D. Hodgkin and D. M. Tarlinton (2005). "Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization." *J Exp Med* 201(4): 545-554.
- Blotta, M. H., J. D. Marshall, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (1996). "Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4⁺ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis." *J Immunol* 156(9): 3133-3140.
- Bodmer, J. L., P. Schneider and J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." *Trends Biochem Sci* 27(1): 19-26.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boeglin, E., C. R. Smulski, S. Brun, S. Milosevic, P. Schneider and S. Fournel (2011). "Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells." *PLoS One* 6(10): e25542.
- Bouchard, D., V. Peton, S. Almeida, C. Le Marechal, A. Miyoshi, V. Azevedo, N. Berkova, L. Rault, P. Francois, J. Schrenzel, S. Even, D. Hernandez and Y. Le Loir (2012). "Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis." *J Bacteriol* 194(22): 6292-6293.
- Bourgeois, C., B. Rocha and C. Tanchot (2002). "A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory." *Science* 297(5589): 2060-2063.
- Bradley, A. J. and M. J. Green (2004). "The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20(3): 547-568.
- Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001). "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." *Oncogene* 20(44): 6482-6491.
- Bretscher, P. and M. Cohn (1970). "A theory of self-nonsel self discrimination." *Science* 169(3950): 1042-1049.
- Brian, A. A. (1988). "Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(2): 564-568.
- Briere, F., C. Servet-Delprat, J. M. Bridon, J. M. Saint-Remy and J. Banchereau (1994). "Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D⁺ (sIgD⁺) B cells to secrete IgG1 and IgG3." *J Exp Med* 179(2): 757-762.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." *Science* 303(5663): 1532-1535.
- Broker, B. M., S. Holtfreter and I. Bekeredjian-Ding (2014). "Immune control of *Staphylococcus aureus* - regulation and counter-regulation of the adaptive immune response." *Int J Med Microbiol* 304(2): 204-214.
- Brouillette, E., A. Martinez, B. J. Boyll, N. E. Allen and F. Malouin (2004). "Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo." *FEMS Immunol Med Microbiol* 41(1): 35-41.
- Bryant, V. L., C. S. Ma, D. T. Avery, Y. Li, K. L. Good, L. M. Corcoran, R. de Waal Malefyt and S. G. Tangye (2007). "Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells." *J Immunol* 179(12): 8180-8190.
- Buller, R. M., K. L. Holmes, A. Hugin, T. N. Frederickson and H. C. Morse, 3rd (1987). "Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells." *Nature* 328(6125): 77-79.
- Burman, J. D., E. Leung, K. L. Atkins, M. N. O'Seaghda, L. Lango, P. Bernado, S. Bagby, D. I. Svergun, T. J. Foster, D. E. Isenman and J. M. van den Elsen (2008). "Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem* 283(25): 17579-17593.
- Burvenich, C., D. D. Bannerman, J. D. Lippolis, L. Peelman, B. J. Nonnecke, M. E. Kehrli, Jr. and M. J. Paape (2007). "Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period." *J Dairy Sci* 90 Suppl 1: E39-54.
- Buzzola, F. R., M. S. Barbagelata, R. L. Caccuri and D. O. Sordelli (2006). "Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice." *Infect Immun* 74(6): 3498-3506.
- Cao, J., X. Wang, Y. Du, Y. Li, X. Wang and P. Jiang (2010). "CD40 ligand expressed in adenovirus can improve the immunogenicity of the GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine." *Vaccine* 28(47): 7514-7522.
- Camussone, C. M., C. M. Veaute, C. Porporatto, B. Morein, I. S. Marcipar and L. F. Calvino (2013). "Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX adjuvant." *J Dairy Res* 80(1): 72-80.
- Carbone, F. R., C. Kurts, S. R. Bennett, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance." *Immunol Today* 19(8): 368-373.
- Carr, M. W., S. J. Roth, E. Luther, S. S. Rose and T. A. Springer (1994). "Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3652-3656.
- Castigli, E., S. A. Wilson, S. Scott, F. Dedeoglu, S. Xu, K. P. Lam, R. J. Bram, H. Jabara and R. S. Geha (2005). "TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells." *J Exp Med* 201(1): 35-39.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." *J Exp Med* 180(4): 1263-1272.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." *J Exp Med* 184(2): 747-752.
- Cerutti, A., M. Cols and I. Puga (2012). "Activation of B cells by non-canonical helper signals." *EMBO Rep* 13(9): 798-810.
- Chan, F. K. (2000). "The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function." *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1: i50-53.
- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui and M. J. Lenardo (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." *Science* 288(5475): 2351-2354.
- Chang, B. S., J. S. Moon, H. M. Kang, Y. I. Kim, H. K. Lee, J. D. Kim, B. S. Lee, H. C. Koo and Y. H. Park (2008). "Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle." *Vaccine* 26(17): 2081-2091.
- Chaudhuri, J., M. Tian, C. Khuong, K. Chua, E. Pinaud and F. W. Alt (2003). "Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme." *Nature* 422(6933): 726-730.
- Chen, G., P. A. Darrah and D. M. Mosser (2001). "Vaccination against the intracellular pathogens *Leishmania major* and *L. amazonensis* by directing CD40 ligand to macrophages." *Infect Immun* 69(5): 3255-3263.
- Chen, C. H., D. Abi-Ghanem, S. D. Waghela, W. K. Chou, M. B. Farnell, W. Mwangi and L. R. Berghman (2012). "Immunization of chickens with an agonistic monoclonal anti-chicken CD40 antibody-hapten complex: rapid and robust IgG response induced by a single subcutaneous injection." *J Immunol Methods* 378(1-2): 116-120.
- Chung, J. Y., Y. C. Park, H. Ye and H. Wu (2002). "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction." *J Cell Sci* 115(Pt 4): 679-688.
- Clark, E. A. and J. A. Ledbetter (1986). "Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12): 4494-4498.
- Clark, E. A. and G. Shu (1990). "Association between IL-6 and CD40 signaling. IL-6 induces phosphorylation of CD40 receptors." *J Immunol* 145(5): 1400-1406.
- Coope, H. J., P. G. Atkinson, B. Huhse, M. Belich, J. Janzen, M. J. Holman, G. G. Klaus, L. H. Johnston and S. C. Ley (2002). "CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52." *Embo j* 21(20): 5375-5385.
- Danese, S., J. A. Katz, S. Saibeni, A. Papa, A. Gasbarrini, M. Vecchi and C. Fiocchi (2003). "Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients." *Gut* 52(10): 1435-1441.
- Davies, C. C., J. Mason, M. J. Wakelam, L. S. Young and A. G. Eliopoulos (2004). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells." *J Biol Chem* 279(2): 1010-1019.
- De Vliegher, S., L. K. Fox, S. Piepers, S. McDougall and H. W. Barkema (2012). "Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control." *J Dairy Sci* 95(3): 1025-1040.
- DeDent, A. C., M. McAdow and O. Schneewind (2007). "Distribution of protein A on the surface of *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 189(12): 4473-4484.
- DeGraves, F. J. and J. Fetrow (1993). "Economics of mastitis and mastitis control." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9(3): 421-434.
- DeLeo, F. R. and M. Otto (2008). "An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia?" *J Exp Med* 205(2): 271-274.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar and M. J. Bevan (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." *J Exp Med* 192(12): 1685-1696.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart and Z. J. Chen (2000). "Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." *Cell* 103(2): 351-361.
- Deregibus, M. C., S. Buttiglieri, S. Russo, B. Bussolati and G. Camussi (2003). "CD40-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates endothelial cell survival and in vitro angiogenesis." *J Biol Chem* 278(20): 18008-18014.
- Ding, B. B., E. Bi, H. Chen, J. J. Yu and B. H. Ye (2013). "IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells." *J Immunol* 190(4): 1827-1836.
- Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudeau and H. Seegers (2002). "Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis." *Vet Res* 33(4): 335-357.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dolan, B. P., K. D. Gibbs, Jr. and S. Ostrand-Rosenberg (2006). "Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8⁺ T cells." *J Immunol* 177(9): 6018-6024.
- Dowling, D., C. M. Hamilton and S. M. O'Neill (2008). "A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands." *Cytokine* 41(3): 254-262.
- Durand, D. B., J. P. Shaw, M. R. Bush, R. E. Replogle, R. Belagaje and G. R. Crabtree (1988). "Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer." *Mol Cell Biol* 8(4): 1715-1724.
- Eck, M. J. and S. R. Sprang (1989). "The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding." *J Biol Chem* 264(29): 17595-17605.
- Edwards, A. M., U. Potter, N. A. Meenan, J. R. Potts and R. C. Massey (2011). "Staphylococcus aureus keratinocyte invasion is dependent upon multiple high-affinity fibronectin-binding repeats within FnBPA." *PLoS One* 6(4): e18899.
- Einfeld, D. A., J. P. Brown, M. A. Valentine, E. A. Clark and J. A. Ledbetter (1988). "Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains." *Embo j* 7(3): 711-717.
- Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo and R. J. Noelle (2009). "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system." *Immunol Rev* 229(1): 152-172.
- Eliopoulos, A. G., C. Davies, P. G. Knox, N. J. Gallagher, S. C. Afford, D. H. Adams and L. S. Young (2000). "CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily." *Mol Cell Biol* 20(15): 5503-5515.
- Eliopoulos, A. G. and L. S. Young (2004). "The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer." *Curr Opin Pharmacol* 4(4): 360-367.
- Erickson, L. D., B. G. Durell, L. A. Vogel, B. P. O'Connor, M. Cascvalho, T. Yasui, H. Kikutani and R. J. Noelle (2002). "Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40." *J Clin Invest* 109(5): 613-620.
- Faure, G. C., D. Bensoussan-Lejzerowicz, M. C. Bene, V. Aubert and J. Leclere (1997). "Coexpression of CD40 and class II antigen HLA-DR in Graves' disease thyroid epithelial cells." *Clin Immunol Immunopathol* 84(2): 212-215.
- Fazilleau, N., L. Mark, L. J. McHeyzer-Williams and M. G. McHeyzer-Williams (2009). "Follicular helper T cells: lineage and location." *Immunity* 30(3): 324-335.
- Ferlin, W. G., T. von der Weid, F. Cottrez, D. A. Ferrick, R. L. Coffman and M. C. Howard (1998). "The induction of a protective response in Leishmania major-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb." *Eur J Immunol* 28(2): 525-531.
- Ferens, W. A., W. C. Davis, M. J. Hamilton, Y. H. Park, C. F. Deobald, L. Fox and G. Bohach (1998). "Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C." *Infect Immun* 66(2): 573-580.
- Fillatreau, S. (2011). "Novel regulatory functions for Toll-like receptor-activated B cells during intracellular bacterial infection." *Immunol Rev* 240(1): 52-71.
- Flingai, S., M. Czerwonko, J. Goodman, S. B. Kudchodkar, K. Muthumani and D. B. Weiner (2013). "Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants." *Front Immunol* 4: 354.
- Foster, T. J. (2005). "Immune evasion by staphylococci." *Nat Rev Microbiol* 3(12): 948-958.
- Foster, T. J., J. A. Geoghegan, V. K. Ganesh and M. Hook (2014). "Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus." *Nat Rev Microbiol* 12(1): 49-62.
- Fournel, S., S. Wieckowski, W. Sun, N. Trouche, H. Dumortier, A. Bianco, O. Chaloin, M. Habib, J. C. Peter, P. Schneider, B. Vray, R. E. Toes, R. Offringa, C. J. Melief, J. Hoebeke and G. Guichard (2005). "C3-symmetric peptide scaffolds are functional mimetics of trimeric CD40L." *Nat Chem Biol* 1(7): 377-382.
- Fowler, T., E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster and M. Hook (2000). "Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins." *Eur J Cell Biol* 79(10): 672-679.
- Fowler, V. G., Jr. and R. A. Proctor (2014). "Where does a Staphylococcus aureus vaccine stand?" *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 5: 66-75.
- Fox, L. K. (2009). "Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis." *Vet Microbiol* 134(1-2): 82-88.
- Foy, T. M., J. D. Laman, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, E. Claassen and R. J. Noelle (1994). "gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory." *J Exp Med* 180(1): 157-163.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Foy, T. M., D. M. Shepherd, F. H. Durie, A. Aruffo, J. A. Ledbetter and R. J. Noelle (1993). "In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39." *J Exp Med* 178(5): 1567-1575.
- Fraser, J., V. Arcus, P. Kong, E. Baker and T. Proft (2000). "Superantigens - powerful modifiers of the immune system." *Mol Med Today* 6(3): 125-132.
- Fraunholz, M. and B. Sinha (2012). "Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die." *Front Cell Infect Microbiol* 2.
- French, R. R., H. T. Chan, A. L. Tutt and M. J. Glennie (1999). "CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help." *Nat Med* 5(5): 548-553.
- Fukuda, T., T. Yoshida, S. Okada, M. Hatano, T. Miki, K. Ishibashi, S. Okabe, H. Koseki, S. Hirose, M. Taniguchi, N. Miyasaka and T. Tokuhisa (1997). "Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation." *J Exp Med* 186(3): 439-448.
- Fuller, A. O. and W. C. Lee (1992). "Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration." *J Virol* 66(8): 5002-5012.
- Funakoshi, S., D. L. Longo, M. Beckwith, D. K. Conley, G. Tsarfaty, I. Tsarfaty, R. J. Armitage, W. C. Fanslow, M. K. Spriggs and W. J. Murphy (1994). "Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation." *Blood* 83(10): 2787-2794.
- Gallagher, E., T. Enzler, A. Matsuzawa, A. Anzelon-Mills, D. Otero, R. Holzer, E. Janssen, M. Gao and M. Karin (2007). "Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production." *Nat Immunol* 8(1): 57-63.
- Galli, G., P. Pittoni, E. Tonti, C. Malzone, Y. Uematsu, M. Tortoli, D. Maione, G. Volpini, O. Finco, S. Nuti, S. Tavarini, P. Dellabona, R. Rappuoli, G. Casorati and S. Abrignani (2007). "Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 3984-3989.
- Gares, S. L., K. P. Fischer, S. E. Congly, S. Lacoste, W. R. Addison, D. L. Tyrrell and K. S. Gutfreund (2006). "Immunotargeting with CD154 (CD40 ligand) enhances DNA vaccine responses in ducks." *Clin Vaccine Immunol* 13(8): 958-965.
- Garside, P., E. Ingulli, R. R. Merica, J. G. Johnson, R. J. Noelle and M. K. Jenkins (1998). "Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node." *Science* 281(5373): 96-99.
- Gauchat, J. F., G. Aversa, H. Gascan and J. E. de Vries (1992). "Modulation of IL-4 induced germline epsilon RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor-alpha, anti-CD40 monoclonal antibodies or transforming growth factor-beta correlates with levels of IgE production." *Int Immunol* 4(3): 397-406.
- Gaudreau, M. C., P. Lacasse and B. G. Talbot (2007). "Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against Staphylococcus aureus." *Vaccine* 25(5): 814-824.
- Geoghegan, J. A., V. K. Ganesh, E. Smeds, X. Liang, M. Hook and T. J. Foster (2010). "Molecular characterization of the interaction of staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with fibrinogen." *J Biol Chem* 285(9): 6208-6216.
- Georgopoulos, N. T., L. P. Steele, M. J. Thomson, P. J. Selby, J. Southgate and L. K. Trejdosiewicz (2006). "A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation." *Cell Death Differ* 13(10): 1789-1801.
- Gil, C., C. Solano, S. Burgui, C. Latasa, B. Garcia, A. Toledo-Arana, I. Lasa and J. Valle (2014). "Biofilm matrix exoproteins induce a protective immune response against Staphylococcus aureus biofilm infection." *Infect Immun* 82(3): 1017-1029.
- Girvin, A. M., M. C. Dal Canto and S. D. Miller (2002). "CD40/CD40L interaction is essential for the induction of EAE in the absence of CD28-mediated co-stimulation." *J Autoimmun* 18(2): 83-94.
- Gomez, C. E., J. L. Najera, R. Sanchez, V. Jimenez and M. Esteban (2009). "Multimeric soluble CD40 ligand (sCD40L) efficiently enhances HIV specific cellular immune responses during DNA prime and boost with attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC expressing HIV antigens." *Vaccine* 27(24): 3165-3174.
- Gomez, M. I., D. O. Sordelli, F. R. Buzzola and V. E. Garcia (2002). "Induction of cell-mediated immunity to Staphylococcus aureus in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant." *Infect Immun* 70(8): 4254-4260.
- Good, K. L., V. L. Bryant and S. G. Tangye (2006). "Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21." *J Immunol* 177(8): 5236-5247.
- Gooding, L. R. and C. B. Edwards (1980). "H-2 antigen requirements in the in vitro induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* 124(3): 1258-1262.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gordon, J., M. J. Millsum, G. R. Guy and J. A. Ledbetter (1988). "Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CD40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling." *J Immunol* 140(5): 1425-1430.
- Graf, D., S. Muller, U. Korthauer, C. van Kooten, C. Weise and R. A. Kroczeck (1995). "A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation." *Eur J Immunol* 25(6): 1749-1754.
- Graham, J. P., K. M. Arcipowski and G. A. Bishop (2010). "Differential B-lymphocyte regulation by CD40 and its viral mimic, latent membrane protein 1." *Immunol Rev* 237(1): 226-248.
- Graham, S. P., R. Pelle, Y. Honda, D. M. Mwangi, N. J. Tonukari, M. Yamage, E. J. Glew, E. P. de Villiers, T. Shah, R. Bishop, E. Abuya, E. Awino, J. Gachanja, A. E. Luyai, F. Mbwika, A. M. Muthiani, D. M. Ndegwa, M. Njahiria, J. K. Nyanjui, F. O. Onono, J. Osaso, R. M. Saya, C. Wildmann, C. M. Fraser, I. Maudlin, M. J. Gardner, S. P. Morzaria, S. Loosmore, S. C. Gilbert, J. C. Audonnet, P. van der Bruggen, V. Nene and E. L. Taracha (2006). "Theileria parva candidate vaccine antigens recognized by immune bovine cytotoxic T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9): 3286-3291.
- Graham, S. P., R. Pelle, M. Yamage, D. M. Mwangi, Y. Honda, R. S. Mwakubambanya, E. P. de Villiers, E. Abuya, E. Awino, J. Gachanja, F. Mbwika, A. M. Muthiani, C. Muriuki, J. K. Nyanjui, F. O. Onono, J. Osaso, V. Riitho, R. M. Saya, S. A. Ellis, D. J. McKeever, N. D. MacHugh, S. C. Gilbert, J. C. Audonnet, W. I. Morrison, P. van der Bruggen and E. L. Taracha (2008). "Characterization of the fine specificity of bovine CD8 T-cell responses to defined antigens from the protozoan parasite *Theileria parva*." *Infect Immun* 76(2): 685-694.
- Grassme, H., A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, R. Kolesnick and E. Gulbins (2001). "CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts." *J Biol Chem* 276(23): 20589-20596.
- Grassme, H., V. Jendrosseck, J. Bock, A. Riehle and E. Gulbins (2002). "Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering." *J Immunol* 168(1): 298-307.
- Grewal, I. S., J. Xu and R. A. Flavell (1995). "Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand." *Nature* 378(6557): 617-620.
- Gronlund, U., A. Johannisson and K. Persson Waller (2006). "Changes in blood and milk lymphocyte subpopulations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis." *Res Vet Sci* 80(2): 147-154.
- Guerder, S. and P. Matzinger (1992). "A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance." *J Exp Med* 176(2): 553-564.
- Guidry, J., J. E. Butler, R. E. Pearson and B. T. Weinland (1980). "IgA, IgG1, IgG2, IgM, and BSA in serum and mammary secretion throughout lactation." *Vet Immunol Immunopathol* 1(4): 329-341.
- Gulbins, E. and H. Grassme (2002). "Ceramide and cell death receptor clustering." *Biochim Biophys Acta* 1585(2-3): 139-145.
- Gunaydin, B., O. Aslantas and C. Demir (2011). "Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis." *Trop Anim Health Prod* 43(8): 1633-1637.
- Gustafsson, K., M. Ingelsten, L. Bergqvist, J. Nystrom, B. Andersson and A. Karlsson-Parra (2008). "Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine." *Cancer Res* 68(14): 5965-5971.
- Gupta, S., J. M. Termini, F. N. Raffa, C. A. Williams, R. S. Kornbluth and G. W. Stone (2014). "Vaccination with a fusion protein that introduces HIV-1 gag antigen into a multimeric CD40L construct results in enhanced CD8⁺ T cell responses and protection from viral challenge by vaccinia-gag." *J Virol* 88(3): 1492-1501.
- Gurunathan, S., K. R. Irvine, C. Y. Wu, J. I. Cohen, E. Thomas, C. Prussin, N. P. Restifo and R. A. Seder (1998). "CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge." *J Immunol* 161(9): 4563-4571.
- Haas, K. M., K. A. Taylor, N. D. MacHugh, J. M. Kreeger and D. M. Estes (2001). "Enhancing effects of anti-CD40 treatment on the immune response of SCID-bovine mice to *Trypanosoma congolense* infection." *J Leukoc Biol* 70(6): 931-940.
- Habelhah, H. (2010). "Emerging complexity of protein ubiquitination in the NF-kappaB pathway." *Genes Cancer* 1(7): 735-747.
- Habib, M., M. Noval Rivas, M. Chamekh, S. Wieckowski, W. Sun, A. Bianco, N. Trouche, O. Chaloin, H. Dumortier, M. Goldman, G. Guichard, S. Fournel and B. Vray (2007). "Cutting edge: small molecule CD40 ligand mimetics promote control of parasitemia and enhance T cells producing IFN-gamma during experimental *Trypanosoma cruzi* infection." *J Immunol* 178(11): 6700-6704.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hagnestam-Nielsen, C., U. Emanuelson, B. Berglund and E. Strandberg (2009). "Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation." *J Dairy Sci* 92(7): 3124-3133.
- Hagnestam-Nielsen, C. and S. Ostergaard (2009). "Economic impact of clinical mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses." *Animal* 3(2): 315-328.
- Hagnestam, C., U. Emanuelson and B. Berglund (2007). "Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation." *J Dairy Sci* 90(5): 2260-2270.
- Hamilton, S. E., A. R. Tvinnereim and J. T. Harty (2001). "Listeria monocytogenes infection overcomes the requirement for CD40 ligand in exogenous antigen presentation to CD8⁽⁺⁾ T cells." *J Immunol* 167(10): 5603-5609.
- Han, J. H., S. Akira, K. Calame, B. Beutler, E. Selsing and T. Imanishi-Kari (2007). "Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors." *Immunity* 27(1): 64-75.
- Hanissian, S. H. and R. S. Geha (1997). "Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells." *Immunity* 6(4): 379-387.
- Hanzen 2014-2015. Physioanatomie-Propédeutique et Pathologie mammaire bovine. <http://www.therioruminant.ulg.ac.be/index.html>
- Harcourt, J. L., M. P. Brown, L. J. Anderson and R. A. Tripp (2003). "CD40 ligand (CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice." *Vaccine* 21(21-22): 2964-2979.
- Hariharan, M. J., C. Nataraj and S. Srikumaran (1993). "Down regulation of murine MHC class I expression by bovine herpesvirus 1." *Viral Immunol* 6(4): 273-284.
- Hartley, D., H. Meisner and S. Corvera (1995). "Specific association of the beta isoform of the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase with the proto-oncogene c-cbl." *J Biol Chem* 270(31): 18260-18263.
- Haswell, L. E., M. J. Glennie and A. Al-Shamkhani (2001). "Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154." *Eur J Immunol* 31(10): 3094-3100.
- Haveri, M., M. Hovinen, A. Roslof and S. Pyorala (2008). "Molecular types and genetic profiles of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites." *J Clin Microbiol* 46(11): 3728-3735.
- Haveri, M., A. Roslof, L. Rantala and S. Pyorala (2007). "Virulence genes of bovine Staphylococcus aureus from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics." *J Appl Microbiol* 103(4): 993-1000.
- Heath, A. W., R. Chang, N. Harada, L. Santos-Argumedo, J. Gordon, C. Hannum, D. Campbell, A. B. Shanafelt, E. A. Clark, R. Torres and et al. (1993). "Antibodies to murine CD40 stimulate normal B lymphocytes but inhibit proliferation of B lymphoma cells." *Cell Immunol* 152(2): 468-480.
- Heit, A., K. M. Huster, F. Schmitz, M. Schiemann, D. H. Busch and H. Wagner (2004). "CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells." *J Immunol* 172(3): 1501-1507.
- Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus and R. A. Kroczeck (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." *Nature* 391(6667): 591-594.
- Hernandez, M. G. H., L. Shen and K. L. Rock (2007). "CD40-CD40 Ligand Interaction between Dendritic Cells and CD8⁺ T Cells Is Needed to Stimulate Maximal T Cell Responses in the Absence of CD4⁺ T Cell Help." *The Journal of Immunology* 178(5): 2844-2852.
- Herrmann, T. and H. R. MacDonald (1993). "The CD8 T cell response to staphylococcal enterotoxins." *Semin Immunol* 5(1): 33-39.
- Hess, S. and H. Engelmann (1996). "A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells." *J Exp Med* 183(1): 159-167.
- Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2008). "Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity." *Science* 322(5904): 1097-1100.
- Hirano, A., W. C. Brown and D. M. Estes (1997). "Cloning, expression and biological function of the bovine CD40 homologue: role in B-lymphocyte growth and differentiation in cattle." *Immunology* 90(2): 294-300.
- Hodgkin, P. D., L. C. Yamashita, R. L. Coffman and M. R. Kehry (1990). "Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines." *J Immunol* 145(7): 2025-2034.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hodgkinson, A. J., E. A. Carpenter, C. S. Smith, P. C. Molan and C. G. Prosser (2009). "Effects on adhesion molecule expression and lymphocytes in the bovine mammary gland following intra-mammary immunisation." *Vet Immunol Immunopathol* 131(1-2): 110-116.
- Hollenbaugh, D., L. S. Grosmaire, C. D. Kullas, N. J. Chalupny, S. Braesch-Andersen, R. J. Noelle, I. Stamenkovic, J. A. Ledbetter and A. Aruffo (1992). "The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity." *Embo j* 11(12): 4313-4321.
- Hollenbaugh, D., N. Mischel-Petty, C. P. Edwards, J. C. Simon, R. W. Denfeld, P. A. Kiener and A. Aruffo (1995). "Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells." *J Exp Med* 182(1): 33-40.
- Holler, N., A. Tardivel, M. Kovacovics-Bankowski, S. Hertig, O. Gaide, F. Martinon, A. Tinel, D. Deperthes, S. Calderara, T. Schulthess, J. Engel, P. Schneider and J. Tschopp (2003). "Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex." *Mol Cell Biol* 23(4): 1428-1440.
- Holtfreter, S., J. Kolata and B. M. Broker (2010). "Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* - The anti-*S. aureus* antibody response." *Int J Med Microbiol* 300(2-3): 176-192.
- Hortet, P., F. Beaudeau, H. Seegers and C. Fourichon (1999). "Reduction in milk yield associated with somatic cell counts up to 600 000 cells/ml in French Holstein cows without clinical mastitis." *Livestock Production Science* 61(1): 33-42.
- Hostager, B. S. (2007). "Roles of TRAF6 in CD40 signaling." *Immunol Res* 39(1-3): 105-114.
- Hostager, B. S., I. M. Catlett and G. A. Bishop (2000). "Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling." *J Biol Chem* 275(20): 15392-15398.
- Howland, K. C., L. J. Ausubel, C. A. London and A. K. Abbas (2000). "The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance." *J Immunol* 164(9): 4465-4470.
- Hsu, Y. M., J. Lucci, L. Su, B. Ehrenfels, E. Garber and D. Thomas (1997). "Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes." *J Biol Chem* 272(2): 911-915.
- Hu, D. L., K. Omoe, S. Sasaki, H. Sashinami, H. Sakuraba, Y. Yokomizo, K. Shinagawa and A. Nakane (2003). "Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 protects against *Staphylococcus aureus* infection." *J Infect Dis* 188(5): 743-752.
- Hu, H. M., K. O'Rourke, M. S. Boguski and V. M. Dixit (1994). "A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40." *J Biol Chem* 269(48): 30069-30072.
- Hua, C., L. Sun, Y. Yang, R. Tan and Y. Hou (2013). "Mechanisms of CpG-induced CD40 expression on murine bone marrow-derived dendritic cells." *Autoimmunity* 46(3): 177-187.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll and H. Levitsky (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." *Science* 264(5161): 961-965.
- Huang, W., J. Sinha, J. Newman, B. Reddy, L. Budhai, R. Furie, A. Vaishnav and A. Davidson (2002). "The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 46(6): 1554-1562.
- Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). "Protein tyrosine kinase structure and function." *Annu Rev Biochem* 69: 373-398.
- Hudson, M. C., W. K. Ramp, N. C. Nicholson, A. S. Williams and M. T. Nousiainen (1995). "Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts." *Microb Pathog* 19(6): 409-419.
- Huijps, K., T. J. Lam and H. Hogeveen (2008). "Costs of mastitis: facts and perception." *J Dairy Res* 75(1): 113-120.
- Hultgren, O., M. Kopf and A. Tarkowski (1998). "Staphylococcus aureus-induced septic arthritis and septic death is decreased in IL-4-deficient mice: role of IL-4 as promoter for bacterial growth." *J Immunol* 160(10): 5082-5087.
- Hussain, A., A. Shakoor, M. A. Shahid, M. Numan and F. Gulraiz (2007). "Clinical and Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Dairy Buffaloes: Disease Characteristics and Antibiotic Susceptibility Profiles of Isolates". *International Journal of Agricultural Research*, 2: 804-811.
- Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi and A. M. de Vos (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." *Mol Cell* 4(4): 563-571.
- International Dairy Federation (1987). *Bovine Mastitis: Definition and Guidelines for Diagnosis*. Bulletin of the International Dairy Federation 211, 24 pp.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Inui, S., T. Kaisho, H. Kikutani, I. Stamenkovic, B. Seed, E. A. Clark and T. Kishimoto (1990). "Identification of the intracytoplasmic region essential for signal transduction through a B cell activation molecule, CD40." *Eur J Immunol* 20(8): 1747-1753.
- Ishida, T., S. Mizushima, S. Azuma, N. Kobayashi, T. Tojo, K. Suzuki, S. Aizawa, T. Watanabe, G. Mosialos, E. Kieff, T. Yamamoto and J. Inoue (1996). "Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region." *J Biol Chem* 271(46): 28745-28748.
- Ishida, T. K., T. Tojo, T. Aoki, N. Kobayashi, T. Ohishi, T. Watanabe, T. Yamamoto and J. Inoue (1996). "TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9437-9442.
- Jabara, H. H., S. M. Fu, R. S. Geha and D. Vercelli (1990). "CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells." *J Exp Med* 172(6): 1861-1864.
- Jacobson, E. M. and Y. Tomer (2007). "The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future." *J Autoimmun* 28(2-3): 85-98.
- Jansen, K. U., D. Q. Girgenti, I. L. Scully and A. S. Anderson (2013). "Vaccine review: "Staphylococcus aureus vaccines: problems and prospects"." *Vaccine* 31(25): 2723-2730.
- Jenabian, M. A., M. Patel, I. Kema, K. Vyboh, C. Kanagaratham, D. Radzioch, P. Thebault, R. Lapointe, N. Gilmore, P. Ancuta, C. Tremblay and J. P. Routy (2014). "Soluble CD40-ligand (sCD40L, sCD154) plays an immunosuppressive role via regulatory T cell expansion in HIV infection." *Clin Exp Immunol* 178(1): 102-111.
- Jenkins, M. K. (1994). "The ups and downs of T cell costimulation." *Immunity* 1(6): 443-446.
- Jin, T., M. Bokarewa, T. Foster, J. Mitchell, J. Higgins and A. Tarkowski (2004). "Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism." *J Immunol* 172(2): 1169-1176.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina and S. Amigorena (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." *Nat Rev Immunol* 12(8): 557-569.
- Johnson, S., Y. Zhan, R. M. Sutherland, A. M. Mount, S. Bedoui, J. L. Brady, E. M. Carrington, L. E. Brown, G. T. Belz, W. R. Heath and A. M. Lew (2009). "Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells." *Immunity* 30(2): 218-227.
- Joshi, A., G. Pancari, L. Cope, E. P. Bowman, D. Cua, R. A. Proctor and T. McNeely (2012). "Immunization with Staphylococcus aureus iron regulated surface determinant B (IsdB) confers protection via Th17/IL17 pathway in a murine sepsis model." *Hum Vaccin Immunother* 8(3): 336-346.
- Kahl, B. C., G. Belling, P. Becker, I. Chatterjee, K. Wardecki, K. Hilgert, A. L. Cheung, G. Peters and M. Herrmann (2005). "Thymidine-dependent Staphylococcus aureus small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles." *Infect Immun* 73(7): 4119-4126.
- Kampen, A. H., T. Tollersrud and A. Lund (2005). "Staphylococcus aureus capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro." *Infect Immun* 73(3): 1578-1583.
- Kansas, G. S. and T. F. Tedder (1991). "Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway." *J Immunol* 147(12): 4094-4102.
- Karin, M. and E. Gallagher (2009). "TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes." *Immunol Rev* 228(1): 225-240.
- Karnell, J. L. and R. Ettinger (2012). "The Interplay of IL-21 and BAFF in the Formation and Maintenance of Human B Cell Memory." *Front Immunol* 3: 2.
- Karpusas, M., Y. M. Hsu, J. H. Wang, J. Thompson, S. Lederman, L. Chess and D. Thomas (1995). "2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand." *Structure* 3(12): 1426.
- Katakam, A., H. Brightbill, C. Franci, L. Wu, I. Mellman, L. Delamarre and C. Austin (2014). "Defective CD40-dependent antigen cross-priming of CD8⁺ T cells in mice with conditional deletion of NF- κ B-inducing kinase (I κ B kinase)." *The FASEB Journal* 28(1 Supplement).
- Keene, J. A. and J. Forman (1982). "Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* 155(3): 768-782.
- Keim, C., D. Kazadi, G. Rothschild and U. Basu (2013). "Regulation of AID, the B-cell genome mutator." *Genes Dev* 27(1): 1-17.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kelsall, B. L., E. Stuber, M. Neurath and W. Strober (1996). "Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses." *Ann N Y Acad Sci* 795: 116-126.
- Kemeny, D. M., A. Noble, B. J. Holmes and D. Diaz-Sanchez (1994). "Immune regulation: a new role for the CD8⁺ T cell." *Immunol Today* 15(3): 107-110.
- Kerro Dego, O., J. E. van Dijk and H. Nederbragt (2002). "Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review." *Vet Q* 24(4): 181-198.
- Kim, H. K., V. Thammavongsa, O. Schneewind and D. Missiakas (2012). "Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*." *Curr Opin Microbiol* 15(1): 92-99.
- Kirk, A. D., D. M. Harlan, N. N. Armstrong, T. A. Davis, Y. Dong, G. S. Gray, X. Hong, D. Thomas, J. H. Fechner, Jr. and S. J. Knechtle (1997). "CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16): 8789-8794.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* 27: 485-517.
- Kossaibati, M. A. and R. J. Esslemont (1997). "The costs of production diseases in dairy herds in England." *Vet J* 154(1): 41-51.
- Kraus, D. and A. Peschel (2008). "*Staphylococcus aureus* evasion of innate antimicrobial defense." *Future Microbiol* 3(4): 437-451.
- Kummer, J. L., P. K. Rao and K. A. Heidenreich (1997). "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 272(33): 20490-20494.
- Kurts, C. (2010). "Dendritic cells erase bad memory." *Eur J Immunol* 40(7): 1870-1872.
- Kurts, C., B. W. Robinson and P. A. Knolle (2010). "Cross-priming in health and disease." *Nat Rev Immunol* 10(6): 403-414.
- Kyburz, D., M. Corr, D. C. Brinson, A. Von Damm, H. Tighe and D. A. Carson (1999). "Human rheumatoid factor production is dependent on CD40 signaling and autoantigen." *J Immunol* 163(6): 3116-3122.
- Lai, Y. H. and T. R. Mosmann (1999). "Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production." *J Immunol* 162(1): 78-87.
- Laman, J. D., B. J. de Smet, A. Schoneveld and M. van Meurs (1997). "CD40-CD40L interactions in atherosclerosis." *Immunol Today* 18(6): 272-277.
- Landin, H., M. J. Mork, M. Larsson and K. P. Waller (2015). "Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds." *Acta Vet Scand* 57: 81.
- Lauterbach, H., J. Patzold, R. Kassub, B. Bathke, K. Brinkmann, P. Chaplin, M. Suter and H. Hochrein (2013). "Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity." *Front Immunol* 4: 251.
- Law, C. L. and I. S. Grewal (2009). "Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges." *Adv Exp Med Biol* 647: 8-36.
- Lawrence, P. K., B. Rokbi, N. Arnaud-Barbe, E. L. Suttén, J. Norimine, K. K. Lahmers and W. C. Brown (2012). "CD4 T cell antigens from *Staphylococcus aureus* Newman strain identified following immunization with heat-killed bacteria." *Clin Vaccine Immunol* 19(4): 477-489.
- Laxmanan, S., D. Datta, C. Geehan, D. M. Briscoe and S. Pal (2005). "CD40: a mediator of pro- and anti-inflammatory signals in renal tubular epithelial cells." *J Am Soc Nephrol* 16(9): 2714-2723.
- Ledbetter, J. A., G. Shu, M. Gallagher and E. A. Clark (1987). "Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40)." *J Immunol* 138(3): 788-794.
- Lee, B. O., L. Hartson and T. D. Randall (2003). "CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment." *J Exp Med* 198(11): 1759-1764.
- Lee, S. J., H. Qin and E. N. Benveniste (2007). "Simvastatin inhibits IFN-gamma-induced CD40 gene expression by suppressing STAT-1alpha." *J Leukoc Biol* 82(2): 436-447.
- Lee, S. U., W. Ferens, W. C. Davis, M. J. Hamilton, Y. H. Park, L. K. Fox, J. Naessens and G. A. Bohach (2001). "Identity of activation molecule 3 on superantigen-stimulated bovine cells is CD26." *Infect Immun* 69(11): 7190-7193.
- Leitner, G., O. Krifucks, M. D. Kiran and N. Balaban (2011). "Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows." *Vet Immunol Immunopathol* 142(1-2): 25-35.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Leitner, G., E. Lubashevsky, A. Glickman, M. Winkler, A. Saran and Z. Trainin (2003). "Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials." *Vet Immunol Immunopathol* 93(1-2): 31-38.
- Leitner, G., E. Shoshani, O. Krifucks, M. Chaffer and A. Saran (2000a). "Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47(8): 581-589.
- Leitner, G., B. Yadlin, A. Glickman, M. Chaffer and A. Saran (2000b). "Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*." *Res Vet Sci* 69(2): 181-184.
- Lernau, H. and D. Sompolsky (1962). "Bovine mastitis due to dwarf-colony variants of *Staphylococcus aureus*." *Cornell Vet* 52: 445-451.
- Leveille, C., M. Bouillon, W. Guo, J. Bolduc, E. Sharif-Askari, Y. El-Fakhry, C. Reyes-Moreno, R. Lapointe, Y. Merhi, J. A. Wilkins and W. Mourad (2007). "CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling." *J Biol Chem* 282(8): 5143-5151.
- Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz and Y. Yarden (1999). "Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1." *Mol Cell* 4(6): 1029-1040.
- Li, F. and J. V. Ravetch (2011). "Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies." *Science* 333(6045): 1030-1034.
- Li, G., J. M. Sanders, M. H. Bevard, Z. Sun, J. W. Chumley, E. V. Galkina, K. Ley and I. J. Sarembock (2008). "CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury." *Am J Pathol* 172(4): 1141-1152.
- Lievens, D., W. J. Eijgelaar, E. A. Biessen, M. J. Daemen and E. Lutgens (2009). "The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis." *Thromb Haemost* 102(2): 206-214.
- Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold and P. A. Knolle (2000). "Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance." *Nat Med* 6(12): 1348-1354.
- Lin, L., A. S. Ibrahim, X. Xu, J. M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, Y. Fu, S. W. French, J. E. Edwards, Jr. and B. Spellberg (2009). "Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice." *PLoS Pathog* 5(12): e1000703.
- Lin, Y., S. R. Slight and S. A. Khader (2010). "Th17 cytokines and vaccine-induced immunity." *Semin Immunopathol* 32(1): 79-90.
- Lindblad, E. B. (2004). "Aluminium compounds for use in vaccines." *Immunol Cell Biol* 82(5): 497-505.
- Lippolis, J. D., T. A. Reinhardt, J. P. Goff and R. L. Horst (2006). "Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk." *Vet Immunol Immunopathol* 113(1-2): 248-255.
- Liu, J., Q. Yu, G. W. Stone, F. Y. Yue, N. Ngai, R. B. Jones, R. S. Kornbluth and M. A. Ostrowski (2008). "CD40L expressed from the canarypox vector, ALVAC, can boost immunogenicity of HIV-1 canarypox vaccine in mice and enhance the in vitro expansion of viral specific CD8⁺ T cell memory responses from HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals." *Vaccine* 26(32): 4062-4072.
- Lobo, F. M., R. Zanjani, N. Ho, T. A. Chatila and R. L. Fuleihan (1999). "Calcium-dependent activation of TNF family gene expression by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr and calcineurin." *J Immunol* 162(4): 2057-2063.
- Loffler, B., L. Tuchscher, S. Niemann and G. Peters (2014). "*Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes." *Int J Med Microbiol* 304(2): 170-176.
- Lorenz, U., B. Lorenz, T. Schmitter, K. Streker, C. Erck, J. Wehland, J. Nickel, B. Zimmermann and K. Ohlsen (2011). "Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy." *Antimicrob Agents Chemother* 55(1): 165-173.
- Lu, L. F., W. J. Cook, L. L. Lin and R. J. Noelle (2003). "CD40 signaling through a newly identified tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) binding site." *J Biol Chem* 278(46): 45414-45418.
- Lutgens, E., D. Lievens, L. Beckers, M. Donners and M. Daemen (2007). "CD40 and its ligand in atherosclerosis." *Trends Cardiovasc Med* 17(4): 118-123.
- Ma, D. Y. and E. A. Clark (2009). "The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells." *Semin Immunol* 21(5): 265-272.
- Mackay, F., P. Schneider, P. Rennert and J. Browning (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." *Annu Rev Immunol* 21: 231-264.
- Mackay, M. F., R. J. Barth, Jr. and R. J. Noelle (1998). "The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells." *J Leukoc Biol* 63(4): 418-428.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MacLennan, I. C. (1994). "Germinal centers." *Annu Rev Immunol* 12: 117-139.
- Magalhaes, P. O., A. M. Lopes, P. G. Mazzola, C. Rangel-Yagui, T. C. Penna and A. Pessoa, Jr. (2007). "Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review." *J Pharm Pharm Sci* 10(3): 388-404.
- Mahmood, I. (2007). "Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development." *Adv Drug Deliv Rev* 59(11): 1177-1192.
- Mahmood, I., M. Martinez and R. P. Hunter (2006). "Interspecies allometric scaling. Part I: prediction of clearance in large animals." *J Vet Pharmacol Ther* 29(5): 415-423.
- Mandell, G. L. (1975). "Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction." *J Clin Invest* 55(3): 561-566.
- Manoj, S., P. J. Griebel, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk (2003). "Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep." *J Immunol* 170(2): 989-996.
- Manoj, S., P. J. Griebel, L. A. Babiuk and S. van Drunen Littel-van den Hurk (2004). "Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154." *Immunology* 112(2): 328-338.
- Martin, S., S. Pahari, R. Sudan and B. Saha (2010a). "CD40 signaling in CD8⁺CD40⁺ T cells turns on contra-T regulatory cell functions." *J Immunol* 184(10): 5510-5518.
- Martin, S., R. Agarwal, G. Murugaiyan and B. Saha (2010b). "CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection." *J Immunol* 185(1): 551-559.
- Matthews, K. R., R. A. Almeida and S. P. Oliver (1994). "Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*." *Infect Immun* 62(12): 5641-5646.
- suzawa, A., P. H. Tseng, S. Vallabhapurapu, J. L. Luo, W. Zhang, H. Wang, D. A. Vignali, E. Gallagher and M. Karin (2008). "Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex." *Science* 321(5889): 663-668.
- Mazzei, G. J., M. D. Edgerton, C. Losberger, S. Lecoanet-Henchoz, P. Graber, A. Durandy, J. F. Gauchat, A. Bernard, B. Allet and J. Y. Bonnefoy (1995). "Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active." *J Biol Chem* 270(13): 7025-7028.
- McGrew, J. T., D. Leiske, B. Dell, R. Klinke, D. Krasts, S. F. Wee, N. Abbott, R. Armitage and K. Harrington (1997). "Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants." *Gene* 187(2): 193-200.
- McKeever, D. J., E. L. Taracha, E. L. Innes, N. D. MacHugh, E. Awino, B. M. Goddeeris and W. I. Morrison (1994). "Adoptive transfer of immunity to *Theileria parva* in the CD8⁺ fraction of responding efferent lymph." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1959-1963.
- McMahan, C. J. and P. J. Fink (1998). "RAG reexpression and DNA recombination at T cell receptor loci in peripheral CD4⁺ T cells." *Immunity* 9(5): 637-647.
- McNally, A., G. R. Hill, T. Sparwasser, R. Thomas and R. J. Steptoe (2011). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control CD8⁺ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(18): 7529-7534.
- Megha and E. London (2004). "Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function." *J Biol Chem* 279(11): 9997-10004.
- Mehrzad, J., Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Heyneman, R. & Burvenich, C. 2000b Relation between chemiluminescence and bactericidal activity of bovine milk neutrophils in different stages of lactation. International Dairy Federation Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland. Stresa, Italy 73±74
- Mehrzad, J., H. Dosogne, E. Meyer, R. Heyneman and C. Burvenich (2001). "Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation." *J Dairy Res* 68(3): 399-415.
- Mendoza, R. B., M. J. Cantwell and T. J. Kipps (1997). "Immunostimulatory effects of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization." *J Immunol* 159(12): 5777-5781.
- Mertens, B., C. Muriuki and L. Gaidulis (1995). "Cloning of two members of the TNF-superfamily in cattle: CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha." *Immunogenetics* 42(5): 430-431.
- Mestre, M. B. and M. I. Colombo (2013). "Autophagy and toxins: a matter of life or death." *Curr Mol Med* 13(2): 241-251.
- Middleton, J. R. (2008). "Staphylococcus aureus antigens and challenges in vaccine development." *Expert Rev Vaccines* 7(6): 805-815.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Middleton, J. R., J. Ma, C. L. Rinehart, V. N. Taylor, C. D. Luby and B. J. Steevens (2006). "Efficacy of different Lysigin formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers." *J Dairy Res* 73(1): 10-19.
- Middleton. NMC Regional Meeting Proceedings (2013). *Staphylococcus aureus* mastitis: have we learned anything in the last 50 years? <http://www.nmconline.org/articles/staphaureus50.pdf>
- Miller, G. Y., P. C. Bartlett, S. E. Lance, J. Anderson and L. E. Heider (1993). "Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds." *J Am Vet Med Assoc* 202(8): 1230-1236.
- Miller, L. S. and J. S. Cho (2011). "Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections." *Nat Rev Immunol* 11(8): 505-518.
- Mintern, J. D., G. Belz, S. Gerondakis, F. R. Carbone and W. R. Heath (2002). "The Cross-Priming APC Requires a Rel-Dependent Signal to Induce CTL." *The Journal of Immunology* 168(7): 3283-3287.
- Modalites_paiement_du_lait
http://www.aclccp.com/portal/page/portal/LILCO/dossiers_techniques/paiement_lait/.pdf
- Moenz, L. and S. G. Tangye (2014). "Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage." *Front Immunol* 5: 65.
- Monecke, S., P. Kuhnert, H. Hotzel, P. Slickers and R. Ehrlich (2007). "Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle." *Vet Microbiol* 125(1-2): 128-140.
- Monk, N. J., R. E. Hargreaves, J. E. Marsh, C. A. Farrar, S. H. Sacks, M. Millrain, E. Simpson, J. Dyson and S. Jurcevic (2003). "Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade." *Nat Med* 9(10): 1275-1280.
- Moore, S., Alexander, L., Brownstein, M., Guan, L., Lobo, S., Meng, Y., Tanaguchi, M., Wang, Z., Yu, J., Prange, C., Schreiber, K., Shenmen, C., Wagner, L., Bala, M., Barbazuk, S., Barber, S., Babakaiff, R., Beland, J., Chun, E., Del Rio, L., Gibson, S., Hanson, R., Kirkpatrick, R., Liu, J., Matsuo, C., Mayo, M., Santos, R. R., Stott, J., Tsai, M., Wong, D., Siddiqui, A., Holt, R., Jones, S. J. and Marra, M. A. (17-MAR-2007) TITLE Direct Submission JOURNAL Submitted. Genbank CD40 bos taurus. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BC134765>
- Morein, F. and K. L. Bengtsson (1998). "Functional aspects of iscoms." *Immunol Cell Biol* 76(4): 295-299.
- Morris, A. E., R. L. Remmele, Jr., R. Klinke, B. M. Macduff, W. C. Fanslow and R. J. Armitage (1999). "Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154)." *J Biol Chem* 274(1): 418-423.
- Morrison, L. A., A. E. Lukacher, V. L. Braciale, D. P. Fan and T. J. Braciale (1986). "Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones." *J Exp Med* 163(4): 903-921.
- Mullarky, I., Waithaka, M. and Bharathan, M. (2010). "Staphylococcus aureus specific memory CD8 T cells in dairy cows." *J Immunol* 184 (Meeting Abstract Supplement) 40.12
- Munroe, M. E. (2009). "Functional roles for T cell CD40 in infection and autoimmune disease: the role of CD40 in lymphocyte homeostasis." *Semin Immunol* 21(5): 283-288.
- Munroe, M. E. and G. A. Bishop (2007). "A Costimulatory Function for T Cell CD40." *The Journal of Immunology* 178(2): 671-682.
- Muppidi, J. R. and R. M. Siegel (2004). "Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death." *Nat Immunol* 5(2): 182-189.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai and T. Honjo (2000). "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme." *Cell* 102(5): 553-563.
- Mwangi, D. M., Y. Honda, S. P. Graham, R. Pelle, E. L. Taracha, J. Gachanja, J. K. Nyanjui, J. Bray, G. H. Palmer, W. C. Brown and W. Mwangi (2011). "Treatment of cattle with DNA-encoded Flt3L and GM-CSF prior to immunization with *Theileria parva* candidate vaccine antigens induces CD4 and CD8 T cell IFN-gamma responses but not CTL responses." *Vet Immunol Immunopathol* 140(3-4): 244-251.
- Nagahata, H., H. Kawai, H. Higuchi, K. Kawai, K. Yayou and C. J. Chang (2011). "Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis." *J Vet Med Sci* 73(7): 885-894.
- Naismith, J. H., T. Q. Devine, B. J. Brandhuber and S. R. Sprang (1995). "Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor." *J Biol Chem* 270(22): 13303-13307.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Naito, M., U. Hainz, U. E. Burkhardt, B. Fu, D. Aho, K. E. Stevenson, M. Rajasagi, B. Zhu, A. Alonso, E. Witten, K. Matsuoka, D. Neuberg, J. S. Duke-Cohan, C. J. Wu and G. J. Freeman (2013). "CD40L-Tri, a novel formulation of recombinant human CD40L that effectively activates B cells." *Cancer Immunol Immunother* 62(2): 347-357.
- Nakayama, M. (2014). "Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells." *Front Immunol* 5: 672.
- Nemoto, E., H. Tada and H. Shimauchi (2002). "Disruption of CD40/CD40 ligand interaction with cleavage of CD40 on human gingival fibroblasts by human leukocyte elastase resulting in down-regulation of chemokine production." *J Leukoc Biol* 72(3): 538-545.
- Nguyen, V. T. and E. N. Benveniste (2000a). "IL-4-activated STAT-6 inhibits IFN-gamma-induced CD40 gene expression in macrophages/microglia." *J Immunol* 165(11): 6235-6243.
- Nguyen, V. T. and E. N. Benveniste (2000b). "Involvement of STAT-1 and its family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages." *J Biol Chem* 275(31): 23674-23684.
- Ni, C. Z., K. Welsh, E. Leo, C. K. Chiou, H. Wu, J. C. Reed and K. R. Ely (2000). "Molecular basis for CD40 signaling mediated by TRAF3." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10395-10399.
- Nickerson, S. C., Owens, W.E. Tomita, G.M. Widell P. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving *Large Anim. Pract.*, 20 (1999), pp. 16–28
- Nickerson, S. C. ;Hovingh, E. P. ;Peterson, C. ; Brannock, S. Schaffer, E AND Widell , P. W.(2005) ;<http://www.ads.uga.edu/documents/efficacyofastaphylococcusauressbacterininreducingthenewinfectionrateandsomaticcellcountinaco.pdf>
- Njongmeta, L. M., J. Bray, C. J. Davies, W. C. Davis, C. J. Howard, J. C. Hope, G. H. Palmer, W. C. Brown and W. Mwangi (2012). "CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4(+) T cell responses following DNA vaccination of outbred animals." *Vaccine* 30(9): 1624-1635.
- Noble, A., P. A. Macary and D. M. Kemeny (1995). "IFN-gamma and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8+ T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles." *J Immunol* 155(6): 2928-2937.
- Noble, A., G. A. Pestano and H. Cantor (1998). "Suppression of immune responses by CD8 cells. I. Superantigen-activated CD8 cells induce unidirectional Fas-mediated apoptosis of antigen-activated CD4 cells." *J Immunol* 160(2): 559-565.
- Noelle, R. J., J. McCann, L. Marshall and W. C. Bartlett (1989). "Cognate interactions between helper T cells and B cells. III. Contact-dependent, lymphokine-independent induction of B cell cycle entry by activated helper T cells." *J Immunol* 143(6): 1807-1814.
- Nutt, S. L. and D. M. Tarlinton (2011). "Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?" *Nature Immunology* 13(6): 472-477.
- Nygaard, T. K., K. B. Pallister, A. L. DuMont, M. DeWald, R. L. Watkins, E. Q. Pallister, C. Malone, S. Griffith, A. R. Horswill, V. J. Torres and J. M. Voyich (2012). "Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection." *PLoS One* 7(5): e36532.
- O'Nions, J. and M. J. Allday (2004). "Proliferation and differentiation in isogenic populations of peripheral B cells activated by Epstein-Barr virus or T cell-derived mitogens." *J Gen Virol* 85(Pt 4): 881-895.
- Ottaiano, A., A. De Chiara, F. Perrone, G. Botti, F. Fazioli, V. De Rosa, N. Mozzillo, V. Ravo, B. Morrica, C. Gallo, C. Pisano, M. Napolitano, P. A. Ascierto, R. V. Iaffaioli and G. Apice (2004). "Prognostic value of CD40 in adult soft tissue sarcomas." *Clin Cancer Res* 10(8): 2824-2831.
- Ozaki, K., R. Spolski, R. Ettinger, H. P. Kim, G. Wang, C. F. Qi, P. Hwu, D. J. Shaffer, S. Akilesh, D. C. Roopenian, H. C. Morse, P. E. Lipsky and W. J. Leonard (2004). "Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6." *The Journal of Immunology* 173(9): 5361-5371.
- Pankey, J. W., N. T. Boddie, J. L. Watts and S. C. Nickerson (1985). "Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge." *J Dairy Sci* 68(3): 726-731.
- Pape, K. A., V. Kouskoff, D. Nemazee, H. L. Tang, J. G. Cyster, L. E. Tze, K. L. Hippen, T. W. Behrens and M. K. Jenkins (2003). "Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response." *J Exp Med* 197(12): 1677-1687.
- Papoff, G., P. Hausler, A. Eramo, M. G. Pagano, G. Di Leve, A. Signore and G. Ruberti (1999). "Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor." *J Biol Chem* 274(53): 38241-38250.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Park, Y. H., L. K. Fox, M. J. Hamilton and W. C. Davis (1993). "Suppression of proliferative response of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis." *Vet Immunol Immunopathol* 36(2): 137-151.
- Park, Y. H., S. U. Lee, W. A. Ferens, S. Samuels, W. C. Davis, L. K. Fox, J. S. Ahn, K. S. Seo, B. S. Chang, S. Y. Hwang and G. A. Bohach (2006). "Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin." *J Vet Sci* 7(3): 233-239.
- Parker, D. C., D. L. Greiner, N. E. Phillips, M. C. Appel, A. W. Steele, F. H. Durie, R. J. Noelle, J. P. Mordes and A. A. Rossini (1995). "Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21): 9560-9564.
- Parra, E., T. Mustelin, M. Dohlsten and D. Mercola (2001). "Identification of a CD28 response element in the CD40 ligand promoter." *J Immunol* 166(4): 2437-2443.
- Paulie, S., B. Ehlin-Henriksson, H. Mellstedt, H. Koho, H. Ben-Aissa and P. Perlmann (1985). "A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes." *Cancer Immunol Immunother* 20(1): 23-28.
- Paulie, S., H. Koho, H. Ben-Aissa, Y. Hansson, M. L. Lundblad and P. Perlmann (1984). "Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis." *Cancer Immunol Immunother* 17(3): 173-179.
- Paulie, S., A. Rosen, B. Ehlin-Henriksson, S. Braesch-Andersen, E. Jakobson, H. Koho and P. Perlmann (1989). "The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction." *J Immunol* 142(2): 590-595.
- Pene, J., J. F. Gauchat, S. Lecart, E. Drouet, P. Guglielmi, V. Boulay, A. Delwail, D. Foster, J. C. Lecron and H. Yssel (2004). "Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG1 and IgG3 by Human B Cells." *The Journal of Immunology* 172(9): 5154-5157.
- Peng, X., A. Kasran, P. A. Warmerdam, M. de Boer and J. L. Ceuppens (1996). "Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production." *Eur J Immunol* 26(7): 1621-1627.
- Pereira, U. P., D. G. Oliveira, L. R. Mesquita, G. M. Costa and L. J. Pereira (2011). "Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review." *Vet Microbiol* 148(2-4): 117-124.
- Perez, M. M., A. Prenafeta, J. Valle, J. Penades, C. Rota, C. Solano, J. Marco, M. J. Grillo, I. Lasa, J. M. Irache, T. Maira-Litran, J. Jimenez-Barbero, L. Costa, G. B. Pier, D. de Andres and B. Amorena (2009). "Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria." *Vaccine* 27(17): 2379-2386.
- Peter, I., M. Nawrath, J. Kamarashev, B. Odermatt, A. Mezzacasa and S. Hemmi (2002). "Immunotherapy for murine K1735 melanoma: combinatorial use of recombinant adenovirus expressing CD40L and other immunomodulators." *Cancer Gene Ther* 9(7): 597-605.
- Peters, A. L., L. L. Stunz and G. A. Bishop (2009). "CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator." *Semin Immunol* 21(5): 293-300.
- Peton, V., D. S. Bouchard, S. Almeida, L. Rault, H. Falentin, J. Jardin, G. Jan, D. Hernandez, P. Francois, J. Schrenzel, V. Azevedo, A. Miyoshi, N. Berkova, S. Even and Y. Le Loir (2014a). "Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines." *Vet Res* 45(1): 106.
- Piepers, S., L. De Meulemeester, A. de Kruif, G. Opsomer, H. W. Barkema and S. De Vliegher (2007). "Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium." *J Dairy Res* 74(4): 478-483.
- Pietravalle, F., S. Lecoanet-Henchoz, H. Blasey, J. P. Aubry, G. Elson, M. D. Edgerton, J. Y. Bonnefoy and J. F. Gauchat (1996). "Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes." *J Biol Chem* 271(11): 5965-5967.
- Pisanu, S., T. Cubeddu, D. Pagnozzi, S. Rocca, C. Cacciotta, A. Alberti, G. Marogna, S. Uzzau and M. F. Addis (2015). "Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis." *Vet Res* 46: 59.
- Pound, J. D., A. Challa, M. J. Holder, R. J. Armitage, S. K. Dower, W. C. Fanslow, H. Kikutani, S. Paulie, C. D. Gregory and J. Gordon (1999). "Minimal cross-linking and epitope requirements for CD40-dependent suppression of apoptosis contrast with those for promotion of the cell cycle and homotypic adhesions in human B cells." *Int Immunol* 11(1): 11-20.
- Proctor, R. A. (2012). "Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine?" *Vaccine* 30(19): 2921-2927.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Proctor, R. A., C. von Eiff, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann and G. Peters (2006). "Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections." *Nat Rev Microbiol* 4(4): 295-305.
- Proctor, R. A. (2012). "Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine." *Clin Infect Dis* 54(8): 1179-1186.
- Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kristjansson, J. N. Maslow and R. D. Arbeit (1995). "Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*." *Clin Infect Dis* 20(1): 95-102.
- Propst, S. M., R. Denson, E. Rothstein, K. Estell and L. M. Schwiebert (2000). "Proinflammatory and Th2-Derived Cytokines Modulate CD40-Mediated Expression of Inflammatory Mediators in Airway Epithelia: Implications for the Role of Epithelial CD40 in Airway Inflammation." *The Journal of Immunology* 165(4): 2214-2221.
- Pullen, S. S., M. E. Labadia, R. H. Ingraham, S. M. McWhirter, D. S. Everdeen, T. Alber, J. J. Crute and M. R. Kehry (1999). "High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization." *Biochemistry* 38(31): 10168-10177.
- Pullen, S. S., H. G. Miller, D. S. Everdeen, T. T. Dang, J. J. Crute and M. R. Kehry (1998). "CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization." *Biochemistry* 37(34): 11836-11845.
- Qin, H., C. A. Wilson, S. J. Lee, X. Zhao and E. N. Benveniste (2005). "LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia." *Blood* 106(9): 3114-3122.
- Rainard, P., P. Cunha, M. Ledresseur, C. Staub, J. L. Touze, F. Kempf, F. B. Gilbert and G. Foucras (2015). "Antigen-Specific Mammary Inflammation Depends on the Production of IL-17A and IFN-gamma by Bovine CD4+ T Lymphocytes." *PLoS One* 10(9): e0137755.
- Ren, C. L., T. Morio, S. M. Fu and R. S. Geha (1994). "Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2." *J Exp Med* 179(2): 673-680.
- Revy, P., C. Hivroz, G. Andreu, P. Graber, C. Martinache, A. Fischer and A. Durandy (1999). "Activation of the Janus kinase 3-STAT5a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells." *J Immunol* 163(2): 787-793.
- Reyes-Moreno, C., J. Girouard, R. Lapointe, A. Darveau and W. Mourad (2004). "CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes." *J Biol Chem* 279(9): 7799-7806.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* 393(6684): 474-478.
- Ridley, R. A., I. Douglas and S. A. Whawell (2012). "Differential adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus* of epithelial cells derived from different anatomical sites." *J Med Microbiol* 61(Pt 12): 1654-1661.
- Rigby, K. M. and F. R. DeLeo (2012). "Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections." *Semin Immunopathol* 34(2): 237-259.
- Riollet, C., P. Rainard and B. Poutrel (2001). "Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection." *J Dairy Sci* 84(5): 1077-1084.
- Rivas, A. L., F. W. Quimby, O. Coksaygan, L. Olmstead and D. H. Lein (2000). "Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*." *Can J Vet Res* 64(4): 232-237.
- Robinson, C. R. and R. T. Sauer (1998). "Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 5929-5934.
- Rolph, M. S. and S. H. E. Kaufmann (2001). "CD40 Signaling Converts a Minimally Immunogenic Antigen into a Potent Vaccine Against the Intracellular Pathogen *Listeria monocytogenes*." *The Journal of Immunology* 166(8): 5115-5121.
- Rooijackers, S. H., W. J. van Wamel, M. Ruyken, K. P. van Kessel and J. A. van Strijp (2005). "Anti-opsonic properties of staphylokinase." *Microbes Infect* 7(3): 476-484.
- Roos, D., D. B. Kuhns, A. Maddalena, J. Roesler, J. A. Lopez, T. Ariga, T. Avcin, M. de Boer, J. Bustamante, A. Condino-Neto, G. Di Matteo, J. He, H. R. Hill, S. M. Holland, C. Kannengiesser, M. Y. Koker, I. Kondratenko, K. van Leeuwen, H. L. Malech, L. Marodi, H. Nuno, M. J. Stasia, A. M. Ventura, C. T. Witwer, B. Wolach and J. I. Gallin (2010). "Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update)." *Blood Cells Mol Dis* 45(3): 246-265.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rothe, M., V. Sarma, V. M. Dixit and D. V. Goeddel (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." *Science* 269(5229): 1424-1427.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel and D. V. Goeddel (1994). "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 78(4): 681-692.
- Roy, M., T. Waldschmidt, A. Aruffo, J. A. Ledbetter and R. J. Noelle (1993). "The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4⁺ T cells." *J Immunol* 151(5): 2497-2510.
- Rubsamen, R. M., C. V. Herst, P. M. Lloyd and D. E. Heckerman (2014). "Eliciting cytotoxic T-lymphocyte responses from synthetic vectors containing one or two epitopes in a C57BL/6 mouse model using peptide-containing biodegradable microspheres and adjuvants." *Vaccine* 32(33): 4111-4116.
- Ruter, J., S. J. Antonia, H. A. Burris, R. D. Huhn and R. H. Vonderheide (2010). "Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors." *Cancer Biol Ther* 10(10): 983-993.
- Sacco, R.E., McGill, J.L., Pillatzki, A.E., Palmer, M.V., Ackermann, M.R., 2014. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Vet. Pathol.* 51, 427-436.
- Salgado-Pabon, W. and P. M. Schlievert (2014). "Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine." *Nat Rev Microbiol* 12(8): 585-591.
- Sanchez-Fueyo, A., C. Domenig, T. B. Strom and X. X. Zheng (2002). "The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression." *Transplantation* 74(6): 898-900.
- Sardesai, N. Y. and D. B. Weiner (2011). "Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success." *Curr Opin Immunol* 23(3): 421-429.
- Savinov, A. Y., F. S. Wong, A. C. Stonebraker and A. V. Chervonsky (2003). "Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8⁺ T cells." *J Exp Med* 197(5): 643-656.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature* 393(6684): 480-483.
- Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." *Cell Mol Life Sci* 58(1): 4-43.
- Schubert, L. A., R. Q. Cron, A. M. Cleary, M. Brunner, A. Song, L. S. Lu, P. Jullien, A. M. Krensky and D. B. Lewis (2002). "A T cell-specific enhancer of the human CD40 ligand gene." *J Biol Chem* 277(9): 7386-7395.
- Schubert, L. A., G. King, R. Q. Cron, D. B. Lewis, A. Aruffo and D. Hollenbaugh (1995). "The human gp39 promoter. Two distinct nuclear factors of activated T cell protein-binding elements contribute independently to transcriptional activation." *J Biol Chem* 270(50): 29624-29627.
- Schukken, Y. H., K. E. Leslie, D. A. Barnum, B. A. Mallard, J. H. Lumsden, P. C. Dick, G. H. Vessie and M. E. Kehrl (1999). "Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection." *J Dairy Sci* 82(11): 2393-2401.
- Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Naslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljestrom and C. Reis e Sousa (2005). "Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells." *Nature* 433(7028): 887-892.
- Schwarz, K., T. Storni, V. Manolova, A. Didierlaurent, J. C. Sirard, P. Rothlisberger and M. F. Bachmann (2003). "Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses." *Eur J Immunol* 33(6): 1465-1470.
- Seegers, H., C. Fourichon and F. Beaudeau (2003). "Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds." *Vet Res* 34(5): 475-491.
- Seitzer, U. and J. Ahmed (2008). "Tropical theileriosis: cytotoxic T lymphocyte response to vaccination." *Vaccine* 26 Suppl 6: G24-28.
- Sendi, P. and R. A. Proctor (2009). "*Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants." *Trends Microbiol* 17(2): 54-58.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun and M. Karin (2001). "Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway." *Science* 293(5534): 1495-1499.
- Seo, K. S., S. U. Lee, Y. H. Park, W. C. Davis, L. K. Fox and G. A. Bohach (2007). "Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4⁺ and CD8⁺ T cells." *Infect Immun* 75(1): 260-269.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shah, H. B., S. K. Joshi and M. L. Lang (2011). "CD40L-null NKT cells provide B cell help for specific antibody responses." *Vaccine* 29(49): 9132-9136.
- Shen, K. Y., Y. C. Song, I. H. Chen, C. H. Leng, H. W. Chen, H. J. Li, P. Chong and S. J. Liu (2014). "Molecular mechanisms of TLR2-mediated antigen cross-presentation in dendritic cells." *J Immunol* 192(9): 4233-4241.
- Shen, P., V. Lampropoulou, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, A. Mecqinon and S. Fillatreau (2013). "Intrinsic Toll-like receptor signalling drives regulatory function in B cells." *Front Biosci (Elite Ed)* 5: 78-86.
- Shkreta, L., B. G. Talbot, M. S. Diarra and P. Lacasse (2004). "Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows." *Vaccine* 23(1): 114-126.
- Siegrist, C-A. (2008). *Vaccine Immunology*. In: Plotkin, SA.; Orenstein, WA.; Offit, PA., editors. *Vaccines*. 5. Saunders/Elsevier; p. 1725
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387(6633): 569-572.
- Sin, J. I., J. J. Kim, D. Zhang and D. B. Weiner (2001). "Modulation of cellular responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen-specific helper T cell type 1 CD4⁺ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo." *Hum Gene Ther* 12(9): 1091-1102.
- Singh, J., E. Garber, H. Van Vlijmen, M. Karpusas, Y. M. Hsu, Z. Zheng, J. H. Naismith and D. Thomas (1998). "The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40." *Protein Sci* 7(5): 1124-1135.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann and K. H. Krause (1999). "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1." *Cell Microbiol* 1(2): 101-117.
- Skinner, M. A., N. Parlane, A. McCarty and B. M. Buddle (2003). "Cytotoxic T-cell responses to mycobacterium bovis during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis." *Immunology* 110, 234-241.
- Smith, E. J., R. M. Corrigan, T. van der Sluis, A. Grundling, P. Speziale, J. A. Geoghegan and T. J. Foster (2012). "The immune evasion protein Sbi of *Staphylococcus aureus* occurs both extracellularly and anchored to the cell envelope by binding lipoteichoic acid." *Mol Microbiol* 83(4): 789-804.
- Smulski, C. R., J. Beyrath, M. Decossas, N. Chekkat, P. Wolff, K. Estieu-Gionnet, G. Guichard, D. Speiser, P. Schneider and S. Fournel (2013). "Cysteine-rich domain 1 of CD40 mediates receptor self-assembly." *J Biol Chem* 288(15): 10914-10922.
- Sol, J., O. C. Sampimon, J. J. Snoep and Y. H. Schukken (1997). "Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*." *J Dairy Sci* 80(11): 2803-2808.
- Soltys, J. and M. T. Quinn (1999). "Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression." *Infect Immun* 67(12): 6293-6302.
- Sompolinsky, D., M. Cohen and G. Ziv (1974). "Epidemiological and biochemical studies on thiamine-less dwarf-colony variants of *Staphylococcus aureus* as etiological agents of bovine mastitis." *Infect Immun* 9(2): 217-228.
- Sompolinsky, D., I. Gluskin and G. Ziv (1969). "Pantothenate-requiring dwarf colony variants of *Staphylococcus aureus* as the etiological agent in bovine mastitis." *J Hyg (Lond)* 67(3): 511-516.
- Soong, L., J. C. Xu, I. S. Grewal, P. Kima, J. Sun, B. J. Longley, Jr., N. H. Ruddle, D. McMahon-Pratt and R. A. Flavell (1996). "Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection." *Immunity* 4(3): 263-273.
- Sordillo, L. M. and K. L. Streicher (2002). "Mammary gland immunity and mastitis susceptibility." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(2): 135-146.
- Spellberg, B., A. S. Ibrahim, M. R. Yeaman, L. Lin, Y. Fu, V. Avanesian, A. S. Bayer, S. G. Filler, P. Lipke, H. Otoo and J. E. Edwards, Jr. (2008). "The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*." *Infect Immun* 76(10): 4574-4580.
- Spellberg, B. and R. Daum (2012). "Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*." *Semin Immunopathol* 34(2): 335-348.
- Stamenkovic, I., E. A. Clark and B. Seed (1989). "A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas." *Embo j* 8(5): 1403-1410.
- Stelwage, K. and K. Singh (2014). "The role of tight junctions in mammary gland function." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19(1): 131-138.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stone, G. W., S. Barzee, V. Snarsky, K. Kee, C. A. Spina, X. F. Yu and R. S. Kornbluth (2006). "Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines." *J Virol* 80(4): 1762-1772.
- Stout, R. D. and J. Suttles (1996). "The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses." *Immunol Today* 17(10): 487-492.
- Stout, R. D., J. Suttles, J. Xu, I. S. Grewal and R. A. Flavell (1996). "Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice." *J Immunol* 156(1): 8-11.
- Stranger-Jones, Y. K., T. Bae and O. Schneewind (2006). "Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(45): 16942-16947.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2004). "Cutting edge: long-lived CD8 memory and protective immunity in the absence of CD40 expression on CD8 T cells." *J Immunol* 172(6): 3385-3389.
- Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." *Cell Res* 21(1): 71-85.
- Sutra, L. and B. Poutrel (1994). "Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*." *J Med Microbiol* 40(2): 79-89.
- Suvas, S., U. Kumaraguru, C. D. Pack, S. Lee and B. T. Rouse (2003). "CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses." *J Exp Med* 198(6): 889-901.
- Tai, Y. T., X. F. Li, L. Catley, R. Coffey, I. Breitkreutz, J. Bae, W. Song, K. Podar, T. Hideshima, D. Chauhan, R. Schlossman, P. Richardson, S. P. Treon, I. S. Grewal, N. C. Munshi and K. C. Anderson (2005). "Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications." *Cancer Res* 65(24): 11712-11720.
- Takahashi, H., T. Takeshita, B. Morein, S. Putney, R. N. Germain and J. A. Berzofsky (1990). "Induction of CD8⁺ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs." *Nature* 344(6269): 873-875.
- Tamilselvam, B., R. A. Almeida, J. R. Dunlap and S. P. Oliver (2006). "*Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells." *Microb Pathog* 40(6): 279-285.
- Tanchot, C. and B. Rocha (2003). "CD8 and B cell memory: same strategy, same signals." *Nat Immunol* 4(5): 431-432.
- Taracha, E. L., B. M. Goddeeris, A. J. Teale, S. J. Kemp and W. I. Morrison (1995). "Parasite strain specificity of bovine cytotoxic T cell responses to *Theileria parva* is determined primarily by immunodominance." *J Immunol* 155(10): 4854-4860.
- Tarlinton, D. M. and K. G. Smith (2000). "Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre." *Immunol Today* 21(9): 436-441.
- Tenhagen, B. A., G. Koster, J. Wallmann and W. Heuwieser (2006). "Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany." *J Dairy Sci* 89(7): 2542-2551.
- Thammavongsa, V., D. M. Missiakas and O. Schneewind (2013). "*Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death." *Science* 342(6160): 863-866.
- Thienel, U., J. Loike and M. J. Yellin (1999). "CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets." *Cell Immunol* 198(2): 87-95.
- Thomas, W. D., M. J. Smith, Z. Si and P. Hersey (1996). "Expression of the co-stimulatory molecule CD40 on melanoma cells." *Int J Cancer* 68(6): 795-801.
- Tikoo, S. K., M. Campos and L. A. Babiuk (1995). "Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control." *Adv Virus Res* 45: 191-223.
- Tollersrud, T., L. Zernichow, S. R. Andersen, K. Kenny and A. Lund (2001). "*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle." *Vaccine* 19(28-29): 3896-3903.
- Tone, M., Y. Tone, J. M. Babik, C. Y. Lin and H. Waldmann (2002). "The role of Sp1 and NF-kappa B in regulating CD40 gene expression." *J Biol Chem* 277(11): 8890-8897.
- Tone, M., Y. Tone, P. J. Fairchild, M. Wykes and H. Waldmann (2001). "Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1751-1756.
- Townsend, S. E. and J. P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells." *Science* 259(5093): 368-370.
- Tripp, R. A., S. R. Sarawar and P. C. Doherty (1995). "Characteristics of the influenza virus-specific CD8⁺ T cell response in mice homozygous for disruption of the H-2IAb gene." *J Immunol* 155(6): 2955-2959.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tripp, R. A., L. Jones, L. J. Anderson and M. P. Brown (2000). "CD40 ligand (CD154) enhances the Th1 and antibody responses to respiratory syncytial virus in the BALB/c mouse." *J Immunol* 164(11): 5913-5921.
- Tuchscher, L., E. Medina, M. Hussain, W. Volker, V. Heitmann, S. Niemann, D. Holzinger, J. Roth, R. A. Proctor, K. Becker, G. Peters and B. Löffler (2011). "Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection." *EMBO Mol Med* 3(3): 129-141.
- Tunyaplin, C., A. L. Shaffer, C. D. Angelin-Duclos, X. Yu, L. M. Staudt and K. L. Calame (2004). "Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation." *J Immunol* 173(2): 1158-1165.
- Tutt, A. L., L. O'Brien, A. Hussain, G. R. Crowther, R. R. French and M. J. Glennie (2002). "T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody." *J Immunol* 168(6): 2720-2728.
- Uckun, F. M., G. L. Schieven, I. Dibirdik, M. Chandan-Langlie, L. Tuel-Ahlgren and J. A. Ledbetter (1991). "Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and multiple previously unidentified serine/threonine-specific protein kinases by the Pan-B-cell receptor CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human B-cell ontogeny." *J Biol Chem* 266(26): 17478-17485.
- Ura, T., Okuda, K., Shimada, M. "Developments in Viral Vector-Based Vaccines." *Vaccines* 2014, 2, 624-641; doi:10.3390/vaccines2030624. <http://www.mdpi.com/journal/vaccines>
- Vaitaitis, G. M., J. R. Carter, D. M. Waid, M. H. Olmstead and D. H. Wagner, Jr. (2013). "An alternative role for Foxp3 as an effector T cell regulator controlled through CD40." *J Immunol* 191(2): 717-725.
- Vaitaitis, G. M., M. Poulin, R. J. Sanderson, K. Haskins and D. H. Wagner (2003). "Cutting Edge: CD40-Induced Expression of Recombination Activating Gene (RAG) 1 and RAG2: A Mechanism for the Generation of Autoaggressive T Cells in the Periphery." *The Journal of Immunology* 170(7): 3455-3459.
- Vaitaitis, G. M. and D. H. Wagner, Jr. (2010). "CD40 glycoforms and TNF-receptors 1 and 2 in the formation of CD40 receptor(s) in autoimmunity." *Mol Immunol* 47(14): 2303-2313.
- van Kessel, K. P., J. Bestebroer and J. A. van Strijp (2014). "Neutrophil-Mediated Phagocytosis of Staphylococcus aureus." *Front Immunol* 5: 467.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." *J Leukoc Biol* 67(1): 2-17.
- van Mierlo, G. J., A. T. den Boer, J. P. Medema, E. I. van der Voort, M. F. Fransen, R. Offringa, C. J. Melief and R. E. Toes (2002). "CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5561-5566.
- van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens and S. P. Schoenberger (2001). "Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation." *Nat Immunol* 2(5): 423-429.
- Vangroenweghe, F., H. Dosogne, J. Mehrzad and C. Burvenich (2001). "Effect of milk sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cells in milk." *Vet Res* 32(6): 565-579.
- Vanichakarn, P., P. Blair, C. Wu, J. E. Freedman and S. Chakrabarti (2008). "Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation." *Thromb Res* 122(3): 346-358.
- Vercelli, D., H. H. Jabara, K. Arai, T. Yokota and R. S. Geha (1989). "Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis." *Eur J Immunol* 19(8): 1419-1424.
- Verdrengh, M. and A. Tarkowski (2000). "Role of macrophages in Staphylococcus aureus-induced arthritis and sepsis." *Arthritis Rheum* 43(10): 2276-2282.
- Verkaik, N. J., C. P. de Vogel, H. A. Boelens, D. Grumann, T. Hoogenboezem, C. Vink, H. Hooijkaas, T. J. Foster, H. A. Verbrugh, A. van Belkum and W. J. van Wamel (2009). "Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of Staphylococcus aureus." *J Infect Dis* 199(5): 625-632.
- Verkaik, N. J., W. J. van Wamel and A. van Belkum (2011). "Immunotherapeutic approaches against Staphylococcus aureus." *Immunotherapy* 3(9): 1063-1073.
- Vesga, O., M. C. Groeschel, M. F. Otten, D. W. Brar, J. M. Vann and R. A. Proctor (1996). "Staphylococcus aureus small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu." *J Infect Dis* 173(3): 739-742.
- Victoria, G. D. and M. C. Nussenzweig (2012). "Germinal centers." *Annu Rev Immunol* 30: 429-457.
- Vidalain, P. O., O. Azocar, C. Servet-Delprat, C. Roubourdin-Combe, D. Gerlier and S. Manie (2000). "CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts." *Embo j* 19(13): 3304-3313.
- Villadangos, J. A. and K. Shortman (2010). "Found in translation: the human equivalent of mouse CD8⁺ dendritic cells." *J Exp Med* 207(6): 1131-1134.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- von Eiff, C. (2008). "Staphylococcus aureus small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians." *Int J Antimicrob Agents* 31(6): 507-510.
- von Oppen, N., A. Schurich, S. Hegenbarth, D. Stabenow, R. Tolba, R. Weiskirchen, A. Geerts, W. Kolanus, P. Knolle and L. Diehl (2009). "Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization." *Hepatology* 49(5): 1664-1672.
- Vonderheide, R. H., J. M. Burg, R. Mick, J. A. Trosko, D. Li, M. N. Shaik, A. W. Tolcher and O. Hamid (2013). "Phase I study of the CD40 agonist antibody CP-870,893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors." *Oncoimmunology* 2(1): e23033.
- Vonderheide, R. H., J. P. Dutcher, J. E. Anderson, S. G. Eckhardt, K. F. Stephans, B. Razvillas, S. Garl, M. D. Butine, V. P. Perry, R. J. Armitage, R. Ghalie, D. A. Caron and J. G. Gribben (2001). "Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients." *J Clin Oncol* 19(13): 3280-3287.
- Vonderheide, R. H., K. T. Flaherty, M. Khalil, M. S. Stumacher, D. L. Bajor, N. A. Hutnick, P. Sullivan, J. J. Mahany, M. Gallagher, A. Kramer, S. J. Green, P. J. O'Dwyer, K. L. Running, R. D. Huhn and S. J. Antonia (2007). "Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody." *J Clin Oncol* 25(7): 876-883.
- Vonderheide, R. H. and M. J. Glennie (2013). "Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy." *Clin Cancer Res* 19(5): 1035-1043.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen and H. L. Ploegh (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." *Nat Rev Immunol* 8(8): 607-618.
- Wagner, A. H., B. Guldenzoph, B. Lienenluke and M. Hecker (2004). "CD154/CD40-mediated expression of CD154 in endothelial cells: consequences for endothelial cell-monocyte interaction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4): 715-720.
- Wagner, D. H., Jr., E. Newell, R. J. Sanderson, J. H. Freed and M. K. Newell (1999). "Increased expression of CD40 on thymocytes and peripheral T cells in autoimmunity: a mechanism for acquiring changes in the peripheral T cell receptor repertoire." *Int J Mol Med* 4(3): 231-242.
- Wagner, D. H., Jr., G. Vaitaitis, R. Sanderson, M. Poulin, C. Dobbs and K. Haskins (2002). "Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3782-3787.
- Waid, D. M., G. M. Vaitaitis and D. H. Wagner, Jr. (2004). "Peripheral CD4^{lo}CD40⁺ auto-aggressive T cell expansion during insulin-dependent diabetes mellitus." *Eur J Immunol* 34(5): 1488-1497.
- Wallemacq, H., D. Bedoret, J. Pujol, C. Desmet, P. V. Drion, F. Farnir, J. Mainil, P. Lekeux, F. Bureau and L. Fievez (2012). "CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed Staphylococcus aureus immunization in mice: a new vaccine strategy for staphylococcal mastitis." *Vaccine* 30(12): 2116-2124.
- Waller, K. P. (2000). "Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics." *Adv Exp Med Biol* 480: 231-245.
- Watanabe, M., K. Yamashita, T. Suzuki, H. Kamachi, D. Kuraya, Y. Koshizuka, M. Ogura, T. Yoshida, T. Aoyagi, D. Fukumori, T. Shimamura, K. Okimura, K. Maeta, T. Miura, F. Sakai and S. Todo (2013). "ASKP1240, a fully human anti-CD40 monoclonal antibody, prolongs pancreatic islet allograft survival in nonhuman primates." *Am J Transplant* 13(8): 1976-1988.
- White, A. L., H. T. Chan, A. Roghanian, R. R. French, C. I. Mockridge, A. L. Tutt, S. V. Dixon, D. Ajona, J. S. Verbeek, A. Al-Shamkhani, M. S. Cragg, S. A. Beers and M. J. Glennie (2011). "Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody." *J Immunol* 187(4): 1754-1763.
- Wieckowski, Sébastien (2007) Synthetic CD40L mimetics : biological effects and potential applications in immunotherapy. Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur. http://scd-theses.u-strasbg.fr/1432/01/WIECKOWSKI_S%C3%A9bastien_2007.pdf
- Williams, J. M., H. J. Mayerhofer and R. W. Brown (1966). "Clinical evaluation of a Staphylococcus aureus bacterin (polyvalent somatic antigen)." *Vet Med Small Anim Clin* 61(8): 789-793.
- Wong, K. L., F. C. Lew, P. A. MacAry and D. M. Kemeny (2008). "CD40L-expressing CD8 T cells prime CD8α⁺ DC for IL-12p70 production." *Eur J Immunol* 38(8): 2251-2262.
- Wortis, H. H., M. Teutsch, M. Higer, J. Zheng and D. C. Parker (1995). "B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8): 3348-3352.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

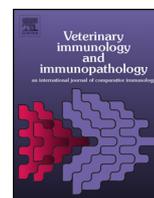
- Wu, Y. and Y. Liu (1994). "Viral induction of co-stimulatory activity on antigen-presenting cells bypasses the need for CD4⁺ T-cell help in CD8⁺ T-cell responses." *Curr Biol* 4(6): 499-505.
- Wurtzen, P. A., M. H. Nissen and M. H. Claesson (2001). "Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production." *Scand J Immunol* 53(6): 579-587.
- Wykes, M., J. Poudrier, R. Lindstedt and D. Gray (1998). "Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells." *Eur J Immunol* 28(2): 548-559.
- Xu, D., S. L. Lin and R. Nussinov (1997). "Protein binding versus protein folding: the role of hydrophilic bridges in protein associations." *J Mol Biol* 265(1): 68-84.
- Xu, S. X. and J. K. McCormick (2012). "Staphylococcal superantigens in colonization and disease." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 52.
- Yellin, M. J., J. Brett, D. Baum, A. Matsushima, M. Szabolcs, D. Stern and L. Chess (1995). "Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals." *J Exp Med* 182(6): 1857-1864.
- Yewdell, J. W. and S. M. Haeryfar (2005). "Understanding presentation of viral antigens to CD8⁺ T cells in vivo: the key to rational vaccine design." *Annu Rev Immunol* 23: 651-682.
- Yin, Q., S. C. Lin, B. Lamothe, M. Lu, Y. C. Lo, G. Hura, L. Zheng, R. L. Rich, A. D. Campos, D. G. Myszka, M. J. Lenardo, B. G. Darnay and H. Wu (2009). "E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6." *Nat Struct Mol Biol* 16(6): 658-666.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E. A. Robinson, E. Appella, J. J. Oppenheim and E. J. Leonard (1987). "Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 9233-9237.
- Young, L. S., A. G. Eliopoulos, N. J. Gallagher and C. W. Dawson (1998). "CD40 and epithelial cells: across the great divide." *Immunol Today* 19(11): 502-506.
- Zabel, U. and P. A. Baeuerle (1990). "Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA." *Cell* 61(2): 255-265.
- Zaccard, C. (2015). "CD40L Induces Functional Tunneling Nanotube Networks Exclusively in Dendritic Cells Programmed by Mediators of Type 1 Immunity". *J. Immunol.* 194, 1047.
- Zamorano J, Kelly AE, Austrian J, Wang HY, Keegan AD. *Cell Res.* 2001 Mar; 11(1):44-54. Costimulation of resting B lymphocytes alters the IL-4-activated IRS2 signaling pathway in a STAT6 independent manner: implications for cell survival and proliferation.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* 15(1): 11-18.
- Zecconi, A., L. Cesaris, E. Liandris, V. Dapra and R. Piccinini (2006). "Role of several Staphylococcus aureus virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland." *Microb Pathog* 40(4): 177-183.
- Zecconi, A. and F. Scali (2013). "Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases." *Immunol Lett* 150(1-2): 12-22.
- Zhang, L., T. Zhang, L. Wang, S. Shao, Z. Chen and Z. Zhang (2014). "In vivo targeted delivery of CD40 shRNA to mouse intestinal dendritic cells by oral administration of recombinant Sacchromyces cerevisiae." *Gene Ther* 21(7): 709-714.
- Zhang, S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella and D. Wallach (2000). "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation." *Immunity* 12(3): 301-311.
- Zhang, B. Z., Y. H. Hua, B. Yu, C. C. Lau, J. P. Cai, S. Y. Zheng, W. C. Yam, R. Y. Kao, K. H. Sze, B. J. Zheng, K. Y. Yuen and J. D. Huang (2015). "Recombinant ESAT-6-like proteins provoke protective immune responses against invasive Staphylococcus aureus disease in a murine model." *Infect Immun* 83(1): 339-345.
- Zhao, Y. X., I. M. Nilsson and A. Tarkowski (1998). "The dual role of interferon-gamma in experimental Staphylococcus aureus septicaemia versus arthritis." *Immunology* 93(1): 80-85.
- Zhao, Y., Y. Xue, T. D. Oberley, K. K. Kinningham, S. M. Lin, H. C. Yen, H. Majima, J. Hines and D. St Clair (2001). "Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model." *Cancer Res* 61(16): 6082-6088.
- Ziegler, C., O. Goldmann, E. Hobeika, R. Geffers, G. Peters and E. Medina (2011). "The dynamics of T cells during persistent Staphylococcus aureus infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy." *EMBO Mol Med* 3(11): 652-666.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zinkernagel, R. M., G. N. Callahan, A. Althage, S. Cooper, J. W. Streilein and J. Klein (1978). "The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: evidence for T help." *J Exp Med* 147(3): 897-911.
- Zirlik, A., C. Maier, N. Gerdes, L. MacFarlane, J. Soosairajah, U. Bavendiek, I. Ahrens, S. Ernst, N. Bassler, A. Missiou, Z. Patko, M. Aikawa, U. Schonbeck, C. Bode, P. Libby and K. Peter (2007). "CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1." *Circulation* 115(12): 1571-1580.
- Zygmunt, B. M., F. Rharbaoui, L. Groebe and C. A. Guzman (2009). "Intranasal immunization promotes th17 immune responses." *J Immunol* 183(11): 6933-6938.

ARTICLE

ARTICLE



Research paper

Generation of a soluble recombinant trimeric form of bovine CD40L and its potential use as a vaccine adjuvant in cows



Julien Pujol^a, Fabrice Bouillenne^b, Frédéric Farnir^c, Isabelle Dufrasne^c, Jacques Mainil^d, Moreno Galleni^b, Pierre Lekeux^a, Fabrice Bureau^{a,1}, Laurence Fiévez^{a,*,1}

^a Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research, University of Liège, 1 Avenue de l'Hôpital (B34), Sart Tilman, Liège, B-4000, Belgium

^b Laboratory of Biological Macromolecules, Centre for Protein Engineering, Faculty of Sciences, University of Liège, 3 Allée de la Chimie (B6a), Sart Tilman, Liège, B-4000, Belgium

^c Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster (B43), Sart Tilman, Liège, B-4000, Belgium

^d Department of Infectious and Parasitic Diseases-Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 20 Boulevard de Colonster (B43), Sart Tilman, Liège, B-4000, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2015

Received in revised form

11 September 2015

Accepted 22 September 2015

Keywords:

CD40

Vaccination

Recombinant protein

Bovine CD40L

Keywords:

HKSA, heat-killed *Staphylococcus aureus*

GST, glutathione S-transferase

sboCD40LT, soluble recombinant trimeric

form of bovine CD40L

ME, β -mercaptoethanol

PLN, precrural lymph node

CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester

HSV, herpes simplex virus

ABSTRACT

Vaccination is the most cost-effective way to control infectious diseases in cattle. However, many infectious diseases leading to severe economical losses worldwide still remain for which a really effective and safe vaccine is not available. These diseases are most often due to intracellular pathogens such as bacteria or viruses, which are, by their localization, protected from antibiotics and/or CD4⁺ T cell-dependent humoral responses. We therefore postulated that strategies leading to induction of not only CD4⁺ T cell responses but also CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses against infected cells should be privileged in the development of new vaccines against problematic intracellular pathogens in bovines. CD40 signaling in antigen-presenting cells may lead to the induction of robust CD4-independent CTL responses and several studies, especially in mice, have used CD40 stimulation to promote CD8⁺ T cell-mediated immunity. For example, we have recently shown that immunization of mice with heat-killed *Staphylococcus aureus* (HKSA) and agonistic anti-CD40 monoclonal antibodies elicits strong CTL responses capable of protecting mice from subsequent staphylococcal mastitis. Unfortunately, there is at present no tool available to efficiently stimulate CD40 in cattle. In this study, we therefore first produced a soluble recombinant trimeric form of the natural bovine CD40 ligand (sboCD40LT). We then observed that sboCD40LT was able to potently stimulate bovine cells *in vitro*. Finally, we provide evidence that immunization of cows with sboCD40LT combined with HKSA was able to significantly increase the number of both HKSA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the draining lymph nodes. In conclusion, we suggest that this new molecular tool could help in the development of vaccine strategies against bovine diseases caused by intracellular pathogens.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In cattle, numerous infections due to intracellular pathogens such as bacteria (e.g., *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*) or viruses (e.g., bovine herpes virus, bovine

viral diarrhea virus, foot-and-mouth disease virus, respiratory syncytial virus) lead to severe economical losses worldwide (Halasa et al., 2007; Middleton, 2008; Buddle et al., 2013; Jamal and Belsham, 2013; Olsen, 2013; Ridpath, 2013; Raaperi et al., 2014; Sacco et al., 2014). These diseases remain difficult to control efficiently with current prophylactic and curative treatments due to the intracellular localization of the pathogens, which makes them inaccessible to most natural or induced CD4⁺ T cell-dependent humoral immune responses and/or antibiotics. Indeed, commonly used vaccinal adjuvants, such as alum and incomplete Freund's adjuvant, predominantly enhance humoral responses (Billiau and Matthys, 2001; Leroux-Roels, 2010). There is currently a lack of safe

* Corresponding author at: Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research +4, University of Liège, 1 Avenue de l'Hôpital (B34), Sart Tilman, Liège, B-4000, Belgium.

E-mail address: laurence.fievez@ulg.ac.be (L. Fiévez).

¹ These authors equally contributed to this work.

adjuvants able to efficiently elicit not only CD4⁺ T cell responses but also strong CD8 cytotoxic T lymphocyte responses against infected cells in cattle.

CD40 is a member of the tumor necrosis factor receptor family and was initially characterized as a B cell surface antigen critically involved in T cell-dependent humoral immune responses (Jabara et al., 1990; Banchereau et al., 1991). It is also known to be expressed on a wide range of cell types, including antigen-presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs) and macrophages, and non-hematopoietic cells such as endothelial cells, fibroblast and epithelial cells (van Kooten and Banchereau, 2000). CD40 signaling in APCs may lead to the induction of robust CD4-independent CTL responses (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). CD40 stimulation was therefore used in mice and human to promote CD8⁺ T cell-mediated immunity against tumor cells, viruses and some other intracellular pathogens. Different forms of CD40 receptor activators have been used as vaccinal adjuvants and have been shown to have protective effects in several cases. In this regard, immunization of mice with agonistic anti-CD40 antibodies combined to heat-killed *Listeria monocytogenes* or *Salmonella typhimurium* has been shown to strongly increase pathogen-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells as well as host survival following bacterial challenge (Rolph and Kaufmann, 2001). A protective anti-tumoral CTL response was also obtained using these agonistic antibodies (Diehl et al., 1999; French et al., 1999; van Mierlo et al., 2002). Purified recombinant CD40L was successfully used in vaccinal tests against herpes simplex virus type 1 (Beland et al., 1998) and HIV (Gómez et al., 2009). Recombinant CD40L is also able to activate CTLs and DCs *in vitro* (Würtzen et al., 2001; Yi et al., 2010). Finally, plasmids coding for CD40L were shown to induce a CTL response against intracellular parasites (Gurunathan et al., 1998) and several viruses such as HIV (Stone et al., 2006; Liu et al., 2008; Gómez et al., 2009; Gupta et al., 2014), respiratory syncytial virus (RSV; Tripp et al., 2000; Harcourt et al., 2003), herpes simplex virus (HSV) type 2 (Sin et al., 2001), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Cao et al., 2010) or ectromelia virus (Lauterbach et al., 2013). In most of these instances, an efficient protection against the infectious challenge was observed. We have recently shown that immunization of mice with heat-killed *S. aureus* (HKSA) together with agonistic anti-CD40 monoclonal antibodies (mAbs) elicits strong CTL responses capable of protecting mice from subsequent staphylococcal mastitis (Wallemacq et al., 2012). We thus hypothesized that such a vaccine strategy could also be helpful in the control of intracellular infections in cattle. The safest way to fully activate the CD40 receptor and the downstream intracellular signaling is to use its natural ligand CD40L (Armitage et al., 1992; Hollenbaugh et al., 1992; Baccam and Bishop, 1999). However, no recombinant bovine CD40L is available to date. In the present study, we thus first produced a soluble recombinant form of bovine CD40L (sboCD40LT), which included a trimerization motif. Indeed, while soluble forms of CD40L consisting only of the TNF homologous region of the protein spontaneously associate as trimers (Karpus et al., 1995), the trimerization motif improves conformational stability of soluble CD40L thereby increasing its biological activity (Morris et al., 1999). Furthermore, since CD40 receptor clustering is required to activate downstream signal transduction (Paulie et al., 1989), CD40L multimers are typically more efficient than monomers and receptor activation increases with the level of multimerization (Morris et al., 1999; Haswell et al., 2001; Stone et al., 2006). Validating the activity of this new tool, we could show that sboCD40L was able to activate bovine endothelial cells and to induce aggregation and proliferation of bovine B cells. We next demonstrate that immunization of cows with HKSA combined with sboCD40LT was able to induce significant antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses, reinforcing the idea that sboCD40LT could

be used in new vaccine strategies aimed at combating intracellular pathogens.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of a soluble recombinant trimeric form of bovine CD40L

RNA was extracted from bovine blood mononuclear cells using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat. N° 15596018) and retrotranscribed into cDNA using a commercial kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Cat. N° 04896866001). Primers were designed based on the bovine CD40L cDNA sequence [GenBank accession number Z48469; National Center for Biotechnology Information (NCBI) Bethesda, MD, USA] to amplify by polymerase chain reaction (PCR) a fragment corresponding to the tumor necrosis factor (TNF) homologous region of bovine CD40L (natural soluble form; amino acids 113–261) preceded by an isoleucine zipper motif encouraging trimerization, the sequence of which was incorporated into the forward primer (the soluble trimeric form of bovine CD40L, as well as the sequence encoding this protein, are hereafter referred to as sboCD40LT) (O'Shea et al., 1989; Harbury et al., 1993; Stone et al., 2006). The sequences of the primers used were 5'-CACCAGAATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGACTCTGAGC-AAGATCTACCATCGAGAACGAGATCGCCAGAATCAAGAAGCTGATCGGCGAGAGAACCAGCAGCatgcacaagggtgatcagga-3' (forward) and 5'-TCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAT-3' (reverse). The amplified fragment was cloned into the entry vector pENTR/TEV/D-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat. N° 45-0219) and sub-cloned by recombination into the prokaryotic vector pDEST15 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat. N° 43-0226) that allows the fusion of glutathione S-transferase (GST) at the N terminus of sboCD40LT (*i.e.* pGST-sboCD40LT). In order to generate a control vector coding for the GST protein only (*i.e.* pGST), 2 oligonucleotides Stop-1 (5'-TCGAGGAAAACCTCTAGATGAGAAGG-3') and Stop-2 (5'-CGCGCTTCTCATCTAGAGTTTTCC-3') were annealed and cloned into the pGST-sboCD40LT vector after excision of the sboCD40LT sequence by digestion with the restriction enzymes *Xho*I and *Asc*I. These annealed oligonucleotides just lead to the incorporation of a stop codon at the C terminus of the GST sequence.

2.2. Transformation and culture of bacterial cells

BL21-A1 one shot competent cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat. N° C6070-03) were transformed with pGST or pGST-sboCD40LT by heat shocking according to the manufacturer's instructions. They were spread on Luria-Bertani (LB) plates containing 100 μ g/ml ampicillin and incubated overnight at 37 °C. Three transformants of each plate were picked and cultured in LB medium containing 100 μ g/ml ampicillin at 37 °C under shaking until reaching an OD of 0.8. These cultures were used to inoculate 5 l of fresh LB culture medium containing 100 μ g/ml ampicillin. These cultures were incubated until an OD of 1. Then, L-arabinose (0.2%) was added to the medium in order to induce protein production and cultures were incubated under shaking during 6 h at 20 °C.

2.3. Protein extraction

After an incubation of 6 h, bacterial culture medium was centrifuged at 6000 \times g during 5 min and the pellet was resuspended and incubated at 4 °C during 40 min in a lysis buffer containing 0.5 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 1.8 mg/ml lysozyme and 20 μ g/ml DNase. After incubation of the lysate, 0.5% of Triton X-100, 1.6 mg/ml complete protease inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Cat. N° 11836145001), and 30 mM β -glycerophosphate were added. The solution was then sonicated 7

times during 0.5 min on ice and then centrifuged at $28,000 \times g$ during 20 min. The supernatant containing the proteins was recovered and passed on a $0.2 \mu\text{m}$ filter.

2.4. Protein purification

Proteins present in the lysis buffer supernatant were purified using glutathione agarose resin columns (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA, Cat. N° 16105). Briefly, columns were equilibrated with equilibration buffer (150 mM NaCl, 125 mM Tris pH 8). The supernatant containing the proteins was loaded on the columns and binding was achieved by incubation with the resin during 4 h under shaking at 4°C . Supernatant containing the unbound proteins was discarded and column was washed 4 times at 4°C with wash buffer (150 mM NaCl, 125 mM Tris pH 8, 0.55% Triton X-100). Three washes were finally performed at 4°C with sterile buffer in which Triton X-100 and Tris 125 mM at pH 8 were gradually replaced by Triton X-114 and Tris 20 mM at pH 8.5. Elution was performed by incubating column on a rotating shaker for 90 min with a buffer containing 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.6, 0.1% Triton X-114 and 3 mg/ml glutathione. Triton X-114 was then removed using $28,000 \times g$ ultracentrifugation at 37°C .

The efficacy of purification was observed on a coomassie-stained SDS-PAGE gel.

The final concentration of purified proteins was estimated using a Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA, Cat. N° 500-0205).

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis and western-blotting

Presence and purity of the produced proteins in extracts was verified by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. 100 ng of purified protein or $1 \mu\text{g}$ of total extract supernatant were used for analyses. Protein extracts were added to a loading buffer (10 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 25% glycerol, 0.1 mM β -mercaptoethanol (ME), and 0.03% bromophenol blue), boiled and run on a 14% polyacrylamide-SDS gel; after electrophoresis, gels were either directly stained with Coomassie blue or electro-transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK, Cat. N° RPN303F) for western-blotting. Nonspecific binding was blocked in 20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.2% Tween 20 (TBS-Tween), and 5% dry milk during 1 h. Membranes were then incubated with polyclonal anti-GST (dilution 1:5000; ThermoScientific, Waltham, MA, USA, Cat. N° PA1-982A) overnight at 4°C , rinsed with TBS-Tween and further incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark, Cat. N° P0448) for 60 min at room temperature. Result was visualized using an enhanced chemiluminescence system (ECL kit; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, Cat. N° RPN2209) followed by autoradiography with Fuji X-ray films.

Native PAGE was performed using NativePAGE™ Bis-Tris Gel System (Life technologies, Gent, Belgium, Cat. N° BN1002BOX). A 4–16% bis acrylamide gel was used and the assay was performed according to the manufacturer's instructions.

2.6. Assessment of the binding capacity of GST-sboCD40LT

In order to check whether the produced sboCD40LT was able to bind to its receptor, we transfected Cos7 cells with a pcDNA3.1 vector encoding the bovine CD40 (pcDNA3.1-boCD40) or with an empty pcDNA3.1 (pcDNA3.1) and evaluated by flow cytometry the binding of purified GST-sboCD40LT. Briefly, transfected Cos7 cells were incubated with GST or GST-sboCD40LT proteins for 90 min. Then, they were washed and incubated with anti-GST antibodies (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, Cat. N° PA1-982A) for 75 min. After washing, cells were incubated with goat

PE-anti-rabbit IgG (Imgenex, San Diego, CA, USA, Cat. N° 20303) for 1 h. Samples were then washed, stained with 7-amino-actinomycin (7-AAD; Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) and analyzed by flow cytometry (FACS Canto II, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium). Dead cells were excluded by 7-AAD staining and only lived singlet cells were gated for analyses.

2.7. Functionality tests

The agonist properties of sboCD40LT were tested in two different functional tests.

2.7.1. Activation of bovine aortic endothelial cells

The first functional test was based on the fact that specific activation of CD40 at the surface of endothelial cells leads to the production of the chemokine monocyte chemoattractant protein MCP-1 (Thienel et al., 1999). Bovine endothelial aortic cells were cultured in low glucose DMEM medium (Life technologies, Gent, Belgium, Cat. N° 21885-025) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% MEM nonessential amino acids, 1 ng/ml of fibroblast growth factor and 10% fetal bovine serum. The cells were seeded in 48-well culture dishes and were stimulated with recombinant bovine interferon (IFN)- γ (10 ng/ml; Serotec, Oxford, UK, Cat. N° PBP007) during 20 h in order to upregulate CD40 expression (Karmann et al., 1995). Then, the cells were stimulated for 24 h with different doses of either GST (2, 100 or 1000 ng/ml) or GST-sboCD40LT (2, 20, 50, 100, 500, 1000 ng/ml). For tests comparing CD40L from different species, cells were stimulated for 24 h with 200 ng/ml of either GST-sboCD40LT or human (Santa Cruz, Dallas, TE, USA, Cat. N° sc-4557) or murine (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA, Cat. N° 315-15) CD40L. In order to rule out any potential effect of putative endotoxin contamination, GST-sboCD40LT was boiled for 30 min before cell stimulation and used as a control. Indeed, this treatment is known to denature the proteins but not the endotoxins (Magalhães et al., 2007). Moreover, we also stimulated endothelial cells with LPS (1–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to estimate the effects of a low concentration of LPS in this test. Culture medium was then recovered and tested for MCP-1 production by ELISA according to the manufacturer's instructions (Kingsfisher Biotech, Saint Paul, MN, USA, Cat. N° VS0083B-002).

2.7.2. Induction of B lymphocyte proliferation and aggregation

The second functional test was a bovine B cell proliferation and aggregation assay performed with recombinant bovine interleukin (IL)-4 as a co-stimulus (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, Cat. N° 2469-BL). Briefly, bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood by centrifugation on a Histopaque gradient (Histopaque 1077, Sigma, St. Louis, MO, USA, Cat. N° 10771). PBMC were first labeled with mouse IgM directed to bovine CD21 (clone BAQ15A, Divbio Science, Ulvenhout, The Netherlands), or with mouse IgG1 directed to bovine CD3 (clone MM1A, VMRD, Pullman Washington, WA, USA), CD4 (clone CACT138A, VMRD, Pullman Washington, WA, USA), CD8 (clone CACT80C, VMRD, Pullman Washington, WA, USA) or CD14 (clone CAM36A, VMRD, Pullman Washington, WA, USA). E-fluor 450-conjugated anti-mouse IgG1 and APC-conjugated anti-mouse IgM were used as secondary antibodies (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA, Cat. N° 48-4015-82 and 17-5790-82 respectively). Mouse IgG1 and IgM isotypes were used as negative controls (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA, Cat. N° 14-4714-82 and 14-4752-82 respectively). CD21 positive cells corresponding to B cells were purified using fluorescence-activated cell sorting (FACS AriaIII, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium). The obtained B cell population was $>96\%$ CD21⁺ with no detectable CD3⁺ cells as determined by flow cytometry (FACS Canto II, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium). B cells were cultured in RPMI medium (Lonza, Basel,

Switzerland, Cat. N° BE12-702F) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics (penicillin (50 IU/ml) and streptomycin (50 µg/ml)) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂. Two hundred thousands B cells/well were cultured in quadruplicate in round-bottomed 96-well plates for 72 h with the different stimuli as described in Section 3. Cells were then cultured for another 18 h period in presence of 0.2 µCi/well of tritiated thymidine (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA, Cat. N° NET027Z005MC). Cells were harvested and thymidine incorporation was measured using a beta counter (Topcount, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). GST-sboCD40LT-induced aggregation of B cells was observed using a microscope (magnification 40×).

2.8. Heifers

Three healthy and non-gravid 15 month-old Holstein heifers provided by the “Ferme provinciale” (Theux, Belgium) were used in this study; they were selected after evaluation of their immunological and inflammatory status. Blood samplings were performed in order to estimate total and differential cell counts, the presence of neutrophil left shift and several biochemical parameters. Total protein, haptoglobin, albumin and fibrinogen concentrations were measured on sera. Protein electrophoresis was performed on sera and plasma. The presence of neutrophil left shift, hypergammaglobulinaemia, fibrinogen concentration > 8 g/L or haptoglobin content > 60 mg/L were considered as exclusion criteria. These heifers were acclimated during 1 month in the Faculty of Veterinary Medicine of Liège before starting the immunization protocol. All experiments were conducted with Institutional Animal Care and Use Committee approval.

2.9. Vaccine composition

The antigen fraction of the vaccine was composed of HKSA. HKSA antigen was prepared by incubating Newbould 305 *S. aureus* (American Type Culture Collection 29740, Manassas, VA, USA) at 60 °C for 75 min. Effective bacterial killing was confirmed by incubating a 100 µl aliquot in Nutrient Broth overnight at 37 °C. The adjuvant fraction of the vaccine consisted in purified GST-sboCD40LT. The GST protein alone was used as a control.

Prior to each injection, adjuvant and antigenic fractions were resuspended in 60 ml PBS buffer containing 1% bovine serum albumin. Each dose contained 7×10^9 CFU HKSA and 7 mg of either GST-sboCD40LT (sboCD40LT-adjuvanted vaccine) or GST alone (non-adjuvanted vaccine).

2.10. Immunization protocol

Heifers were injected subcutaneously close to the precrural lymph nodes (PLN) with the vaccine preparations. From day 1 to day 3, each heifer received the non-adjuvanted vaccine close to the right PLN and the sboCD40LT-adjuvanted vaccine close to the left one. Three weeks later (from day 21 to day 23), heifers were boosted using the same injection strategy. Seven days after the last injection, heifers were sacrificed. PLN were then harvested, weighed and processed for further analyses.

2.11. In vitro lymph node cell proliferation assay

PLN were cut into 5 mm-wide slides and crushed under sterile conditions. Cell suspension was filtered on a 70 µm cell strainer and centrifugated for 15 min at $850 \times g$ at 4 °C. Cells were then resuspended in RPMI (Lonza, Basel, Switzerland, Cat. N° BE12-702F) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics (penicillin (50 IU/ml) and streptomycin (50 µg/ml)). Cell count was performed 3 times for each lymph node using a

Thoma-Zeiss counting chamber. Cell suspension was adjusted to 2×10^6 cells/ml and 200,000 cells/well were cultured in triplicates in round-bottomed 96-well plates. PLN cells were left untreated or were restimulated either with 5×10^6 CFU/ml HKSA or 125 µg/ml ovalbumin (OVA) used as an irrelevant antigen. They were cultured for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂. After 3 days, cells were cultured for another 18 h period in presence of 0.2 µCi/well of tritiated thymidine (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA, Cat. N° NET027Z005MC). Cells were then harvested and thymidine incorporation was measured using a beta counter (Topcount, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

2.12. CD4⁺ and CD8⁺ T cell count

Total PLN cells were harvested and resuspended as described above, washed with PBS containing 0.5% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide and incubated 40 min with Alexa 647-labeled anti-CD8 and RPE-labeled anti-CD4 antibodies (respectively MCA837A647 and MCA1653PE, Bio Rad, Hercules, CA, USA). Cells were then analyzed by flow cytometry (FACS Canto II, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium).

2.13. In vitro CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation assay

Total PLN cells were harvested and resuspended as described above. Cells were incubated with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; 5 µM in PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat. N° C34554) for 10 min at 37 °C, washed in PBS containing fetal calf serum, and then resuspended in RPMI (Lonza, Basel, Switzerland, Cat. N° BE12-702F) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics (penicillin (50 IU/ml) and streptomycin (50 µg/ml)). 200,000 cells/well were cultured in triplicates in round-bottomed 96-well plates. Cells were left untreated or were restimulated with either 5×10^6 CFU/ml HKSA or 125 µg/ml OVA. They were cultured for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂. After 3 days, cells were harvested and proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T cells were counted by flow cytometry based on their CFSE content. CFSE fluorescence intensity is divided by at least two in proliferating cells. Results were presented as the ratio between the percentage of proliferating cells in the left PLN (*i.e.* the adjuvanted vaccine-treated PLN) and the right PLN (*i.e.* the non-adjuvanted vaccine-treated PLN).

2.14. Statistical analysis

Statistical evaluation of differences between means was performed using Student's *t* tests ($p < 0.05$). For the statistical analysis related to PLN cell counts and proliferation, the effect of treatment was evaluated using a type 2 ANOVA test ($p < 0.05$). Results are presented as means \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Production of a functional bovine CD40L

3.1.1. Expression and purification of GST-sboCD40LT

The first part of this study was dedicated to the production of a functional recombinant trimeric form of bovine CD40L. It has been shown that multimeric soluble forms of CD40L have more potent biological activity than soluble CD40L lacking a multimerization domain (Fanslow et al., 1994). This prompted us to add a trimerization motif to the N terminus of the TNF homologous region (natural soluble form; amino acids 113–261) of bovine CD40L to produce what we expected to be a functional sboCD40LT (see Section 2). sboCD40LT was cloned into the entry vector pENTR/TEV/D-TOPO vector, subcloned into the prokaryotic vector pDEST15 and

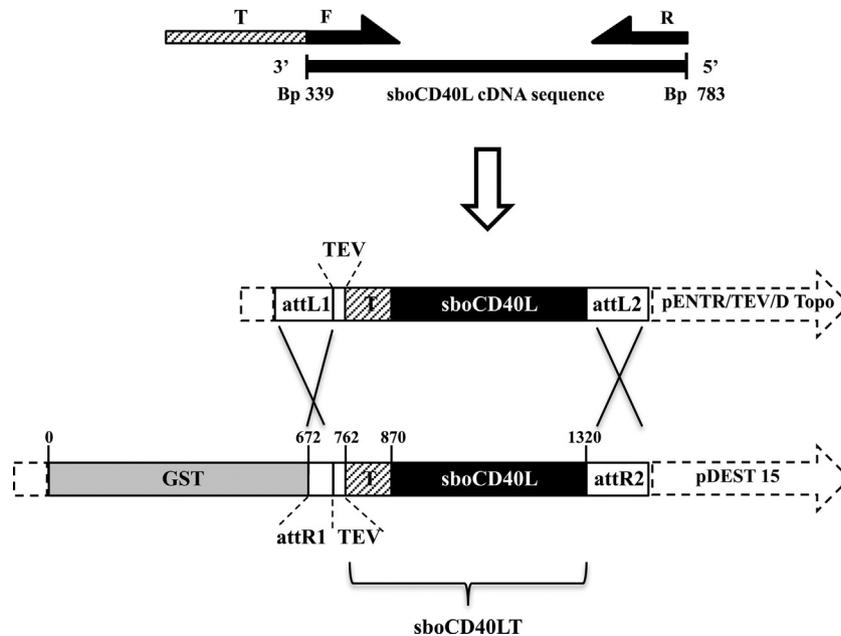


Fig. 1. Cloning of a soluble recombinant trimeric form of bovine CD40L (sboCD40LT). The PCR-amplified CD40L cDNA fragment (referred to as sboCD40L) corresponds to the TNF homologous region of bovine CD40L (natural soluble form; amino acids 113–261; bp 339–783) preceded by an isoleucine motif encouraging trimerization, the sequence of which was incorporated in the forward primer (hatched box; T). This fragment was cloned into an entry vector pENTR/TEV/D-TOPO vector and subcloned by recombination into the prokaryotic vector pDEST15 that allows the fusion of GST at the N terminus of the sboCD40LT protein. attL1, attL2, attR1 and attR2: recombination sites; F: forward primer; R: reverse primer; T: isoleucine zipper trimerization sequence; TEV: tobacco etch virus protease recognition site.

produced as a GST-fused protein (GST-sboCD40LT). As a control, we produced the GST protein alone. Detailed constructions are schematized in Fig. 1. After protein production in bacteria and extraction as described in Section 2, each sample was analyzed by western-blot for efficient protein production (Fig. 2A). Each protein migrated very close to the predicted molecular mass. The calculated molecular masses for GST-sboCD40LT and GST alone were 49.9 and 28.8 kDa, respectively. The efficiency of purification was studied using Coomassie staining (Fig. 2B). The preparations of purified GST-sboCD40LT and GST proteins showed a single band when

gels were stained with Coomassie, whereas unpurified extracts displayed several bands, demonstrating the purity of the preparations.

3.1.2. Multimerization potential of GST-sboCD40LT

We next studied the structure of GST-sboCD40LT by SDS-PAGE under reducing and nonreducing conditions and by native electrophoresis. Under SDS-mercaptoethanol (SDS-ME) reducing conditions, the GST-sboCD40LT protein was found to have the expected size (~50 kDa), corresponding to the monomeric form of the protein (Fig. 3A, dotted arrow). However, when SDS

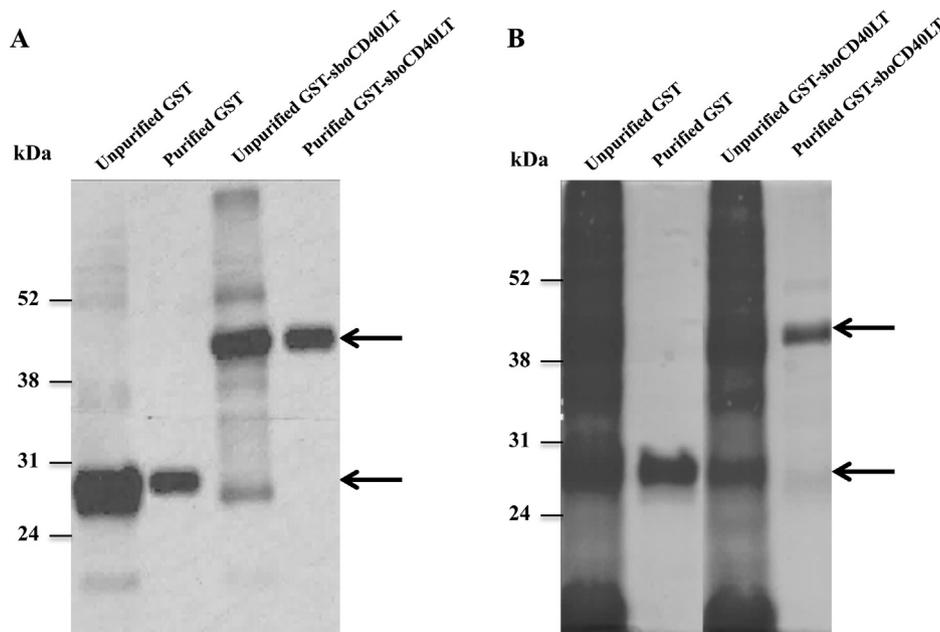


Fig. 2. Expression and purification of GST-sboCD40LT. (A) Western-blot against GST, showing GST (lower arrow; ~29 kDa) and GST-sboCD40LT (upper arrow; ~50 kDa) before and after purification. (B) Coomassie-stained gel showing the proteins obtained before and after purification of GST and GST-sboCD40LT (the lower arrow indicates GST, whereas the upper arrow shows GST-sboCD40LT).

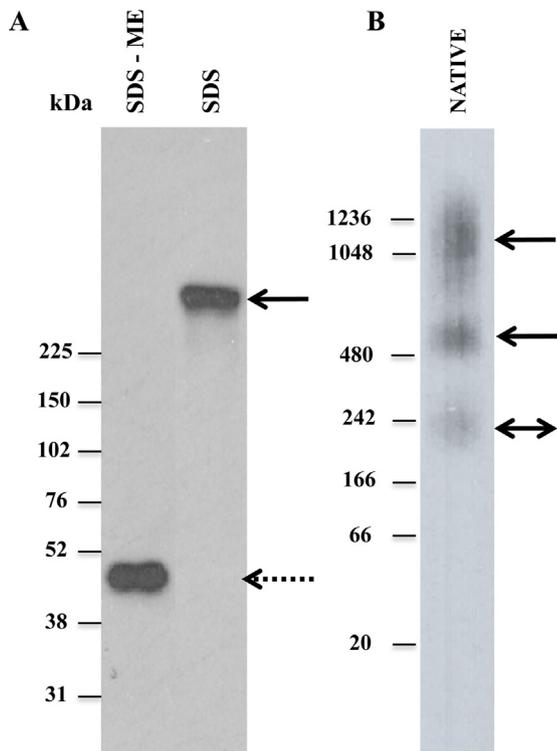


Fig. 3. Multimerization potential of GST-sboCD40LT. (A) Comparison by SDS-PAGE of purified GST-sboCD40LT extracts performed under reducing (SDS-ME) or non-reducing (SDS) conditions. (B) Analysis of GST-sboCD40LT by native-PAGE. Dotted and solid arrows respectively show monomeric and multimeric forms of the protein. The double solid arrow shows either a monomeric or a multimeric form of the protein.

nonreducing conditions were used, the 50 kDa band was no longer present and was replaced by a higher molecular weight band (Fig. 3A, solid arrow), consistent with the presence of inter-chain disulfide bonds in these proteins leading to generation of multimers. Moreover, protein analysis by native electrophoresis confirmed the presence of several bands that could correspond to different GST-sboCD40LT multimers formed by weak interactions (Fig. 3B, solid arrows). Because native electrophoresis does not allow accurate estimation of protein molecular weight, the smaller molecular weight band in the gel (solid double arrow) could represent either a monomer or a multimer of GST-sboCD40LT. These results demonstrated that GST-sboCD40LT is able to multimerize, which was encouraging given that multimers have more potent biological activity than monomers (Fanslow et al., 1994).

3.1.3. Binding of GST-sboCD40LT to the bovine CD40

The first requirement for GST-sboCD40LT to initiate the CD40-intracellular signaling cascade is to efficiently bind to bovine CD40. In order to verify this point, Cos7 cells were transfected with either a vector encoding the bovine CD40 (pcDNA3.1-CD40), or an empty vector used as a control (pcDNA3.1), before being incubated with GST alone or GST-sboCD40LT. Cells were then harvested and incubated first with anti-GST antibodies and then with goat PE-anti-rabbit IgG before being analyzed by flow cytometry. Fig. 4A shows that GST alone did not recognize pcDNA3.1- or pcDNA3.1-CD40-transfected Cos7 cells (dotted and continuous black lines, respectively). Moreover, GST-sboCD40LT did not bind to pcDNA3.1-transfected cells (dotted black line, Fig. 4B) but induced an increase in fluorescence intensity when incubated with pcDNA3.1-CD40-transfected Cos7 cells (continuous black line, Fig. 4B). Although the percentage of positive cells seemed to be low, it corresponded to the transfection efficacy level (data not shown). Taken together, these

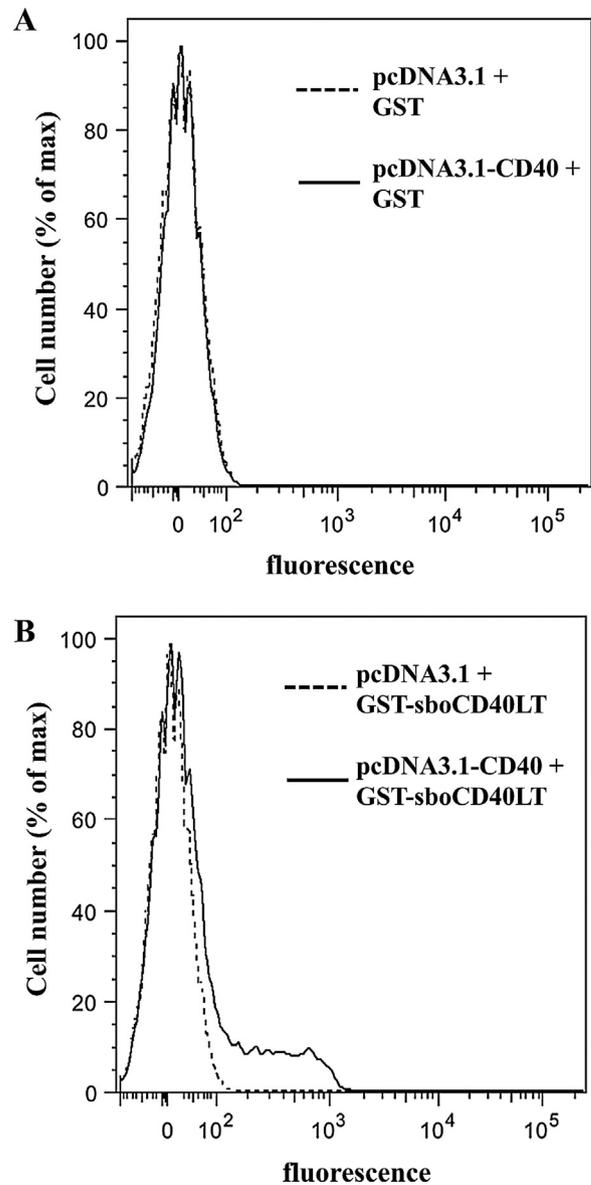


Fig. 4. Binding of GST-sboCD40LT to bovine CD40. Cos7 cells were transfected with either a vector encoding the bovine CD40 (pcDNA3.1-CD40), or an empty vector used as a control (pcDNA3.1), before being incubated with GST alone or GST-sboCD40LT. Cells were then harvested and incubated first with anti-GST antibodies and then with goat PE-anti-rabbit IgG before being analyzed by flow cytometry. (A) Fluorescence intensity of Cos7 cells transfected with either pcDNA3.1 (dotted line) or pcDNA3.1-CD40 (solid line) and incubated with GST. (B) Fluorescence intensity of Cos7 cells transfected with either pcDNA3.1 (dotted line) or pcDNA3.1-CD40 (solid line) and incubated with GST-sboCD40LT. Results are representative of three individual experiments.

results confirm the capacity of GST-sboCD40LT to bind to bovine CD40.

3.1.4. Biological activity of GST-sboCD40LT

In order to study its agonistic properties, purified GST-sboCD40LT was tested in two independent biological assays.

3.1.4.1. Bovine aortic endothelial cell activation assay. Activation of CD40 at the surface of IFN- γ -primed endothelial cells is known to result in MCP-1 production by these cells. The first assay was thus based on this property. Purified GST or GST-sboCD40LT (2–1000 ng/ml) were used to stimulate IFN- γ -pretreated bovine aortic endothelial cells for 24 h. Culture medium was then

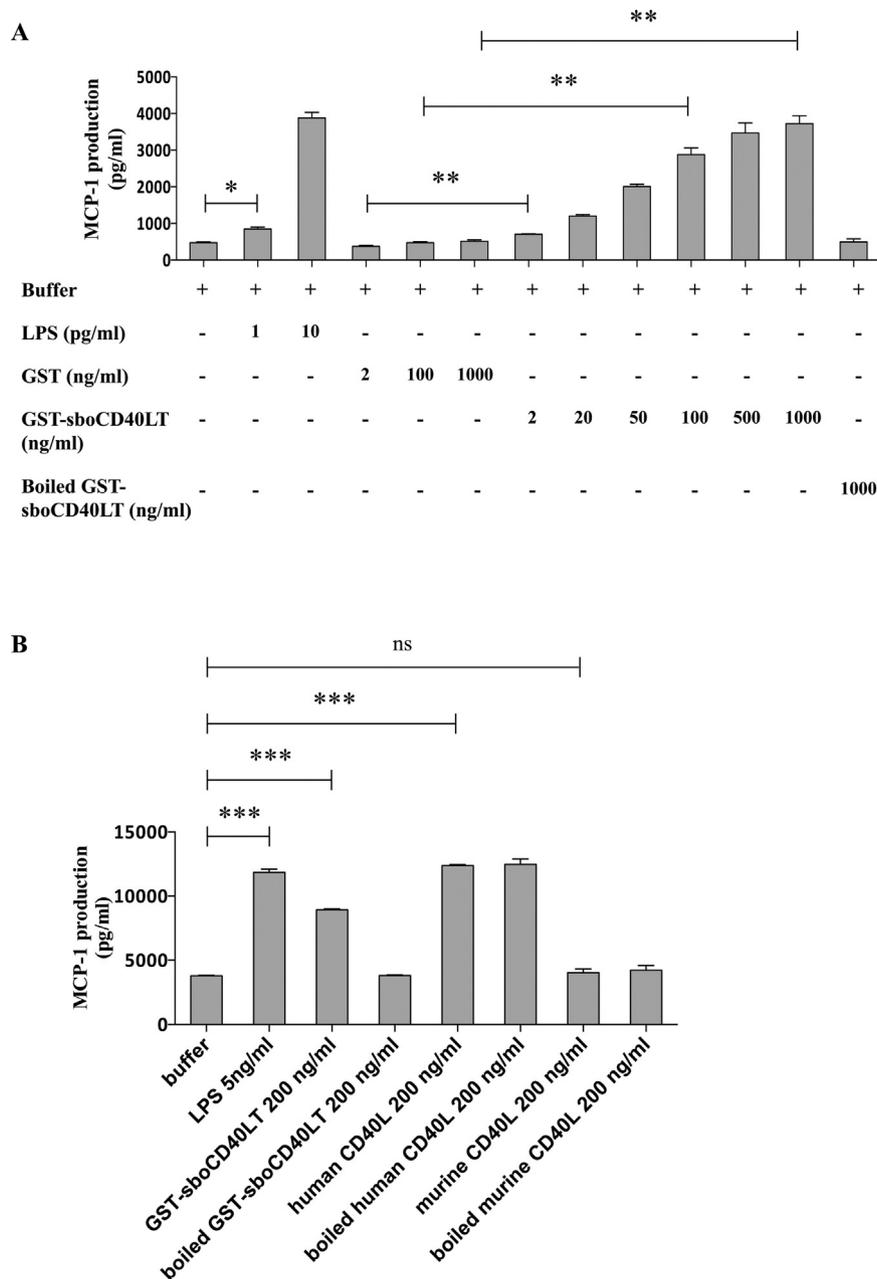


Fig. 5. (A) Stimulation of bovine aortic endothelial cells with purified GST-sboCD40LT induces MCP-1 production. Bovine aortic endothelial cells were primed for 20 h with IFN- γ before being stimulated with increasing doses of GST or GST-sboCD40LT. (B) GST-sboCD40LT is more efficient to stimulate bovine aortic endothelial cells than CD40L from other species. Bovine aortic endothelial cells were primed for 20 h with IFN- γ before being stimulated with 200 ng/ml of either GST-sboCD40LT, human or bovine CD40L. Twenty-four hours later, MCP-1 was measured by ELISA in cell supernatants. Elution buffer and boiled proteins were used as negative controls, whereas LPS was used as a positive control. Results are expressed as the mean value of duplicate cultures and are representative of three individual experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Student's t test).

recovered and analyzed for MCP-1 production by ELISA. As endothelial cells are very sensitive to endotoxins, GST-sboCD40LT was boiled for 30 min and used as a control. Stimulation of cells with GST-sboCD40LT induced a significant increase in MCP-1 production when compared with the corresponding GST controls (Fig. 5A). The biological activity was already observed with ligand concentration as low as 2 ng/ml and was dose-dependent. This effect was completely abolished when GST-sboCD40LT was boiled before endothelial cells stimulation, demonstrating that the observed effects were due to sboCD40LT and not to endotoxin contamination. We also stimulated endothelial cells with low doses of LPS (1–10 pg/ml) to estimate the effects of a low concentration of LPS in this test. Results showed that while boiled GST-sboCD40LT

proteins (1000 ng/ml) did not induce MCP-1 production, LPS at 1 pg/ml induced significant MCP-1 synthesis, suggesting that endotoxin pollution in our preparation was less than 1 pg endotoxin/ μ g of ligand (Fig. 5A).

In order to compare the efficacy of GST-sboCD40LT to that of available human and murine CD40L, IFN- γ -pretreated bovine aortic endothelial cells were stimulated with 200 ng/ml of either GST-sboCD40LT, human or murine commercial CD40L, and analyzed 24 h later for MCP-1 production. We also evaluated endotoxin contamination by treating cells with an equivalent dose of boiled recombinant proteins. Results confirmed that stimulation of cells with GST-sboCD40LT induced a significant increase in MCP-1 production and that this effect was completely abolished when

GST-sboCD40LT was boiled before treating the cells (Fig. 5B). Human CD40L also induced a significant increase in MCP-1 production but this effect was maintained at the same level when the proteins were boiled before endothelial cell stimulation (Fig. 5B), suggesting that the effects of human CD40L were not specific but due to endotoxin contamination. Murine CD40L had no significant effect on bovine endothelial cells (Fig. 5B).

3.1.4.2. B cell proliferation and aggregation assay. The biological activity of GST-sboCD40LT was also evaluated in a B cell proliferation and aggregation assay with the use of recombinant bovine IL-4 as a costimulus. Bovine B cells were isolated as described in Section 2 and incubated for 72 h with increasing doses of GST, GST-sboCD40LT or LPS in the presence of recombinant bovine IL-4 (30 ng/ml). Cells were then cultured for another 18 h period in the presence of tritiated thymidine and proliferation was measured using a beta counter. GST-sboCD40LT already induced a significant B cell proliferation at a dose of 20 ng/ml and this effect increased in a dose dependent manner (Fig. 6A). At similar doses, GST had nearly no effect and LPS had an effect about 10 times weaker than GST-sboCD40LT (Fig. 6A). Activation of CD40 on B cells is also known to induce their aggregation (Barrett et al., 1991). In agreement with these previous observations, we observed that GST-sboCD40LT was able to induce B cell aggregation in a dose-dependent manner, while neither GST nor LPS induced any aggregation (Fig. 6B).

The efficacy of GST-sboCD40LT was also compared to that of existing human and murine CD40L using this functional test (data not shown). Human CD40L induced a significant B cell proliferation but, contrary to GST-sboCD40LT, the effect was not completely abolished when proteins were boiled before cell stimulation, suggesting that most of the effect was due to endotoxin contamination. The real proliferation induced by human CD40L was thus 4 times lower than that induced by GST-sboCD40LT. Murine CD40L had no significant effect on B cell proliferation. Results obtained for B cell aggregation were comparable to those obtained for proliferation.

3.2. Immunization of cows with HKSA adjuvanted with GST-sboCD40LT induces HKSA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses

As mentioned earlier, cellular and CTL immune responses against intracellular pathogens have been obtained on several instances in mice through the use of CD40 activators as vaccinal adjuvants. We have moreover shown that this strategy was efficient in a mouse model of *S. aureus*-induced mastitis (Wallemacq et al., 2012). To provide a proof-of-concept, in a small number of animals, that purified GST-sboCD40LT could also be able to promote not only CD4⁺ but also CD8⁺ T cell responses against inoculated antigens, three heifers were injected subcutaneously close to the PLNs with the vaccine preparations. Briefly, each heifer received from day 1 to day 3 the non-adjuvanted vaccine (HKSA + GST) close to the right PLN and the sboCD40LT-adjuvanted vaccine (HKSA + GST-sboCD40LT) close to the left one. Three weeks later (from day 21 to day 23), heifers were boosted using the same injection strategy. Seven days after the last injection, heifers were sacrificed. PLN were then harvested, weighed and processed for further analyses.

During the immunization protocols, palpation of the PLN zones revealed a significant increase in the size of the left PLNs, when compared with the right PLNs. This increase in size already occurred 2 days after the second vaccine injection and suggested a strong immune response in the PLNs receiving the sboCD40LT-adjuvanted vaccine compared with those receiving the non-adjuvanted vaccine.

Seven days after the last vaccine injection, heifers were sacrificed and the PLNs were harvested for analysis. PLNs were first weighed and processed to estimate the total PLN cell counts. Left

PLNs, which were injected with the GST-sboCD40LT-adjuvanted vaccine, were significantly heavier than right PLNs, which were injected with the non-adjuvanted vaccine (Fig. 7A). This weight increase was correlated with a significant increase in the total cell numbers in the left PLNs compared to the right ones (Fig. 7B). Moreover, evaluation by flow cytometry of T cell counts revealed that GST-sboCD40LT treatment induced a significant increase in both CD4⁺ and CD8⁺ cell numbers when compared with treatment with GST alone (Fig. 7C and D). Finally, cells from left PLNs exhibited a significant higher proliferative response in the presence of HKSA compared to cells isolated from right PLNs (Fig. 8A). This higher proliferative response was associated with a significant increase in both CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation in the left PLNs compared to the right ones (Fig. 8B–E). These effects were antigen-specific. Indeed, PLN cells did not proliferate *in vitro* when they were either left unstimulated or stimulated with OVA rather than HKSA (Fig. 8A).

Taken together, these results show that immunization of cows with a combination of HKSA and GST-sboCD40LT, used as an adjuvant, favors the development of not only a CD4⁺ T cell-mediated immune response but also a cellular immune response characterized by the proliferation of antigen-specific CD8⁺ T cells.

4. Discussion

As described before, in cattle, numerous infections due to intracellular pathogens such as bacteria or viruses remain difficult to control efficiently with current prophylactic and curative treatments due to the intracellular localization of these microbes (Halasa et al., 2007; Middleton, 2008; Buddle et al., 2013; Jamal and Belsham, 2013; Olsen, 2013; Ridpath, 2013; Raaperi et al., 2014; Sacco et al., 2014). Nevertheless it has also been shown in numerous studies that the use of CD40L as vaccinal adjuvant protected against intracellular pathogens in different non-bovine systems (Beland et al., 1998; Gurunathan et al., 1998; Tripp et al., 2000; Sin et al., 2001; Harcourt et al., 2003; Gómez et al., 2009; Cao et al., 2010; Gupta et al., 2014). We therefore hypothesized that such a vaccine strategy could also be efficient in the control of intracellular infection in cattle. However, no recombinant bovine CD40L was available yet. The first part of this study was therefore dedicated to the production of a functional soluble trimeric form of bovine CD40L.

We produced a soluble trimeric form of bovine CD40L by adding a trimerization motif to the N terminus of the TNF homologous region of bovine CD40L (sboCD40LT); sboCD40LT was produced as a GST-fused protein (GST-sboCD40LT) and we used GST protein alone as control.

Firstly, we demonstrated that GST-sboCD40LT was able to form multimers. We have also shown by flow cytometry that our protein was capable of specific binding to bovine CD40 receptor expressed at the surface of Cos7 cells transfected with plasmids coding for bovine CD40. The choice of using, for this test, transfected-Cos7 cells in place of primary bovine cells naturally expressing the CD40 receptor was justified by the wish to have a good negative control. Indeed only the total absence of bovine CD40 receptor at cell surface could highlight potential non-specific binding of GST-sboCD40LT.

Next, GST-sboCD40LT was shown to be active *in vitro* in stimulating both bovine endothelial cells and B cells. Results obtained in these biological *in vitro* assays showed that sboCD40LT was efficient at low doses, ranging from 2 ng/ml (endothelial cell stimulation) to 20 ng/ml (induction of B cell proliferation). The dose used for B cell proliferation assay was very low when compared with those that were used in other studies evaluating the biological activity of trimeric soluble CD40L in other species (Mazzei et al., 1995; Morris et al., 1999; Haswell et al., 2001). For example, a dose of 1 µg/ml

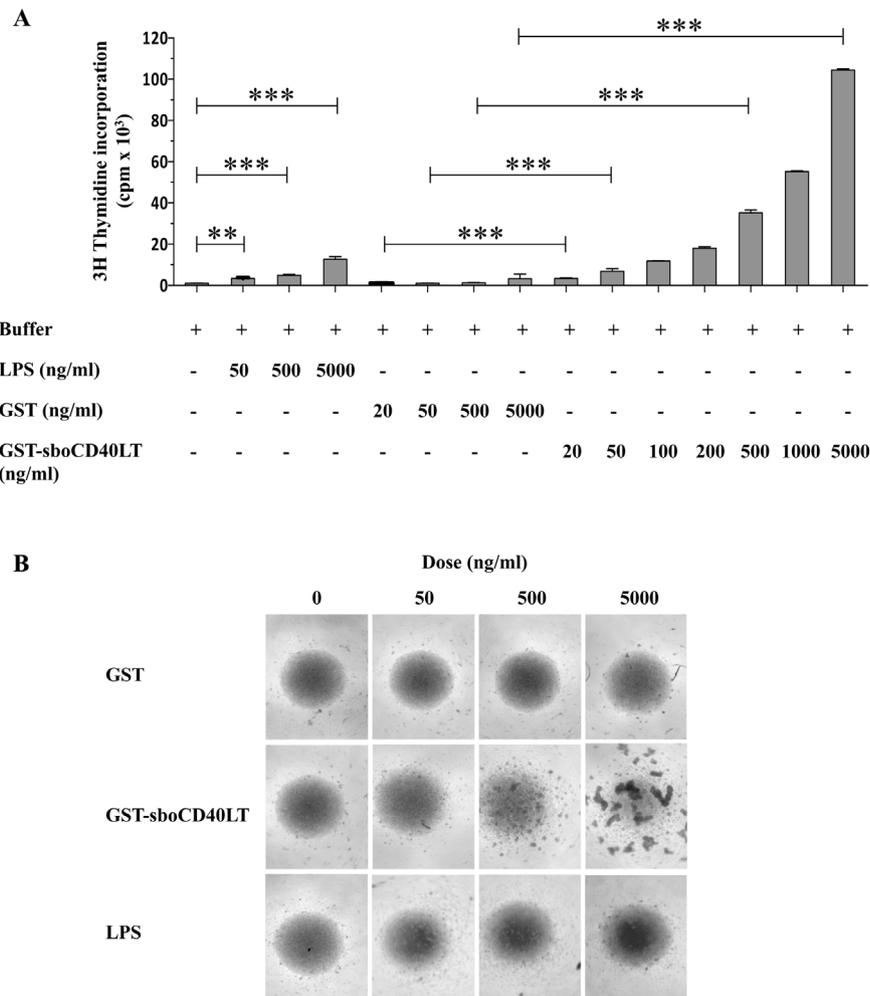


Fig. 6. GST-sboCD40LT induces B cell proliferation and aggregation. Bovine B cells were isolated by FACS and cultured for 90 h in the presence of IL-4 and increasing doses of either GST-sboCD40LT, GST or LPS. (A) B cell proliferation assay. Tritiated thymidine was added to cells for the last 18 h of culture and thymidine incorporation was estimated using a beta counter. Results are expressed as the mean cpm of quadruplicate cultures and are representative of three individual experiments (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Student's t test). (B) B cell aggregation was observed with a light microscope (magnification $\times 40$). Results are representative of three individual experiments.

of a soluble trimeric form of human CD40L is necessary to induce an only 5-fold increase in B cell proliferation compared to control (Mazzei et al., 1995) and nearly the same effect is obtained with the same dose of a soluble trimeric form of murine CD40L (Haswell et al., 2001). With the same dose, we obtained in this study a 50-fold increase in B cell proliferation, demonstrating the potency of sboCD40LT. Moreover, while Morris and colleagues also obtained a significant effect with 20 ng/ml of soluble human trimeric CD40L on B cell proliferation, they only had a 12-fold increase of proliferation with a 1 μ g/ml dose (Morris et al., 1999).

We also used these *in vitro* biological assays to compare the activity of GST-sboCD40LT with that of human and murine commercial CD40L, and showed that GST-sboCD40LT was much more active than these commercial products. Indeed, murine CD40L was neither able to activate bovine endothelial cells to produce MCP-1 nor to induce bovine B cell proliferation or aggregation. Human CD40L had no effect on bovine endothelial cells, and while a little effect was observed on B cells for human CD40L, the use of boiled proteins as control revealed that this effect was partially due to endotoxin contamination. We also showed that that GST-sboCD40LT was 4 times more active than human CD40L on bovine B cells.

Moreover, our tests performed with boiled GST-sboCD40LT demonstrated that GST-sboCD40LT can be considered as endotoxin free (contrary to the human commercial CD40L) and that it could

therefore be used for *in vivo* assays without any additional treatment.

In this study, we next demonstrated that immunization of cows with HKSA combined with GST-sboCD40LT, used as an adjuvant, is able to induce significant antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses.

Many studies testing different forms of CD40L as vaccinal adjuvant did not obtain both antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses but most often only one out of the two. Stone and collaborators in 2006 used plasmids coding for dodecameric CD40L as adjuvant with plasmids coding for HIV antigens in mice and elicited strong specific CD8⁺ T cell responses but no significant CD4⁺ or antibody responses (Stone et al., 2006). In 2014, another study using adenovirus encoding the same dodecameric form of CD40L fused to HIV-1 Gag antigen as vaccine in mice showed a complete protection against vaccinia-Gag challenge mediated by a strong CD8⁺ T cell response (Gupta et al., 2014). Likewise, immunization of mice with plasmids coding for trimeric CD40L together with *Leishmania major* antigens was able to control subsequent infection with this parasite (Gurunathan et al., 1998). In this study, the use of depleting anti-CD8 antibodies demonstrated that this protection was mainly mediated by CD8⁺ CTL cells. Most of these studies observed an effect on only CD8⁺ T cell responses, which most often correlated with protection. In contrast, Sin and colleagues in 2001 co-immunized mice with plasmids coding for CD40L and plasmids coding for a HSV

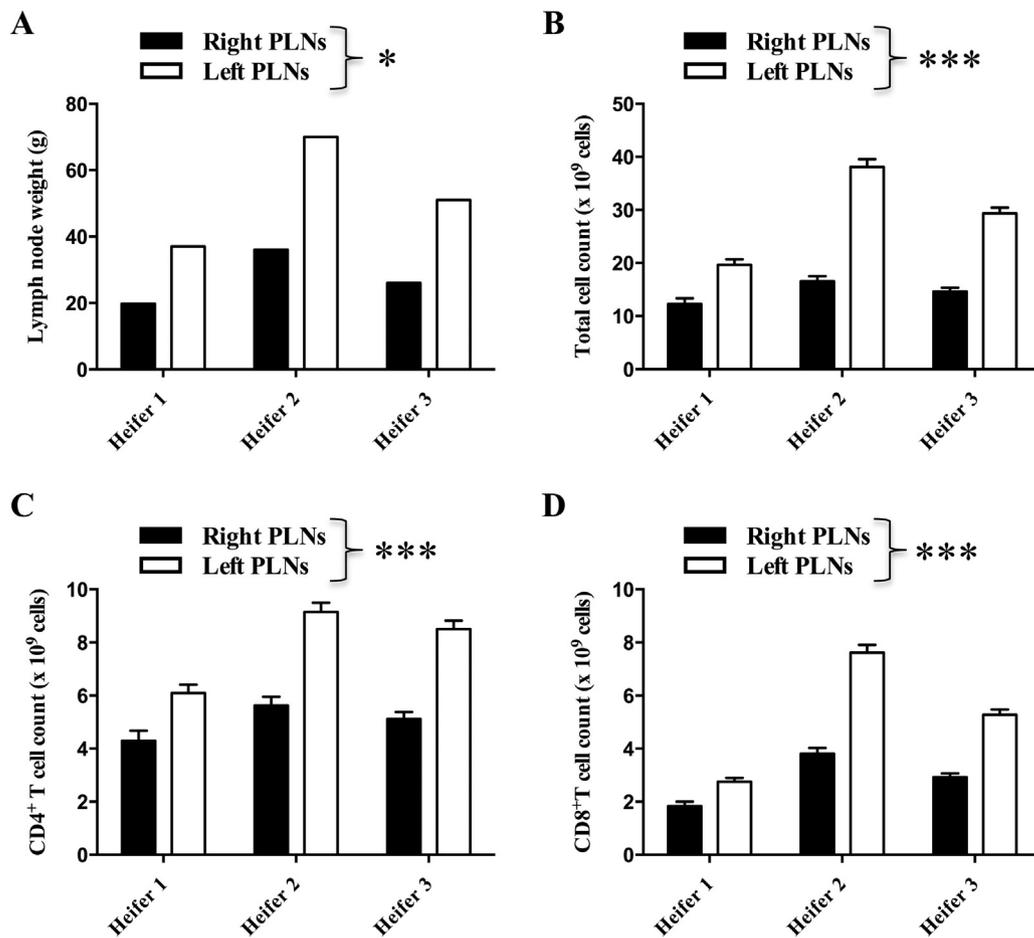


Fig. 7. Heifer immunization with HKSA and GST-sboCD40LT induces an increase in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in PLNs. Three heifers were immunized at days 1, 2, 3, 21, 22 and 23 by subcutaneous injection, close to the PLNs, with the non-adjuvanted vaccine (HKSA + GST; right PLNs; black boxes) or the GST-sboCD40LT-adjuvanted vaccine (HKSA + GST-sboCD40LT; left PLNs; white boxes). Seven days after the last vaccine injection (day 30), heifers were sacrificed and the PLNs were harvested for analyses. (A) PLN weights. (B) Total PLN cell counts. CD4⁺ (C) and CD8⁺ (D) cells were counted by flow cytometry. Results are presented as means \pm SD for each heifer. Results obtained in the left PLNs were significantly different from those in the right PLNs (* p < 0.05; *** p < 0.001; type 2 ANOVA).

gD and observed a good protection against HSV-2 challenge mediated in this case by Th1-type CD4⁺ T cells (Sin et al., 2001). Several other teams have however observed an increase in both CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses (Peter et al., 2002; Liu et al., 2008; Auten et al., 2012), which is in line with our own results. Indeed, Peter and collaborators increased the mean survival time of mice suffering from preexisting melanoma by treating them with adenovirus encoding for CD40L and IL-2 and observed mainly CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the regressing tumors (Peter et al., 2002). Likewise, Liu and colleagues boosted the immunogenicity of HIV-1 canarypox vaccine by co-immunization of mice with CD40L expressing canarypox vector; this boost was mediated by enhanced HIV-1-specific CD8⁺ CTL and CD4⁺ T cell responses (Liu et al., 2008). Finally, Auten and collaborators have also shown that co-immunization of mice with plasmids coding for CD40L and a mycobacterial antigen enhanced specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses (Auten et al., 2012).

Immunization with HKSA alone is known to elicit only moderate immune responses (Lim et al., 2006), an observation that we have confirmed in the present study. Administration of GST-sboCD40LT seems therefore an efficient mean to convert weak immune responses into stronger CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in the draining lymph nodes. Induction of more pronounced CD8⁺ T cell responses is particularly important given that these cells are known to be essential for eliminating intracellular pathogens. It is known that CD40 activation in DCs leads to heightened ability to present antigens and to produce cytokines and chemokines

(Quezada et al., 2004). Moreover, upon CD40 activation, DCs are capable of capturing exogenous antigens for the generation of MHC class I/peptide complexes by cross-presentation and of polarizing the immune responses toward CTL responses mediated by specific CD8⁺ T cells (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Review of literature shows that it is a good effective strategy to induce specific CD8⁺ T cell responses in mice by activating CD40 in the presence of an exogenous antigen and toll-like receptor (TLR) agonists (Ahonen et al., 2004; Wells et al., 2008). HKSA is known to activate TLR2 and TLR4 (Arbibe et al., 2000; Yang et al., 2008). Although TLR2 and TLR4 activation has not been evaluated here, these previous observations suggest that both the activation of CD40 in APCs by GST-sboCD40LT and the activation of TLR2 and TLR4 by HKSA itself favored the development of cellular responses mediated by CD8⁺ T cells in our study.

Although the proof-of-concept provided in this study only concerns *S. aureus*, the proposed approach using GST-sboCD40LT as a vaccine adjuvant could be coopted for other bovine diseases implicating intracellular pathogens (bacteria or viruses) for which a cellular immune response is needed. Moreover, the use of killed pathogens offers a very safe solution against a lot of infectious agents. Although killed pathogens generally suffer from low immunogenicity, our vaccine strategy seems to be able to convert this low immunogenicity into stronger antigen-specific CD4⁺ but also CD8⁺ T cell responses against these killed pathogens. Finally, sboCD40LT, unlike human and mouse CD40L, is a self protein that

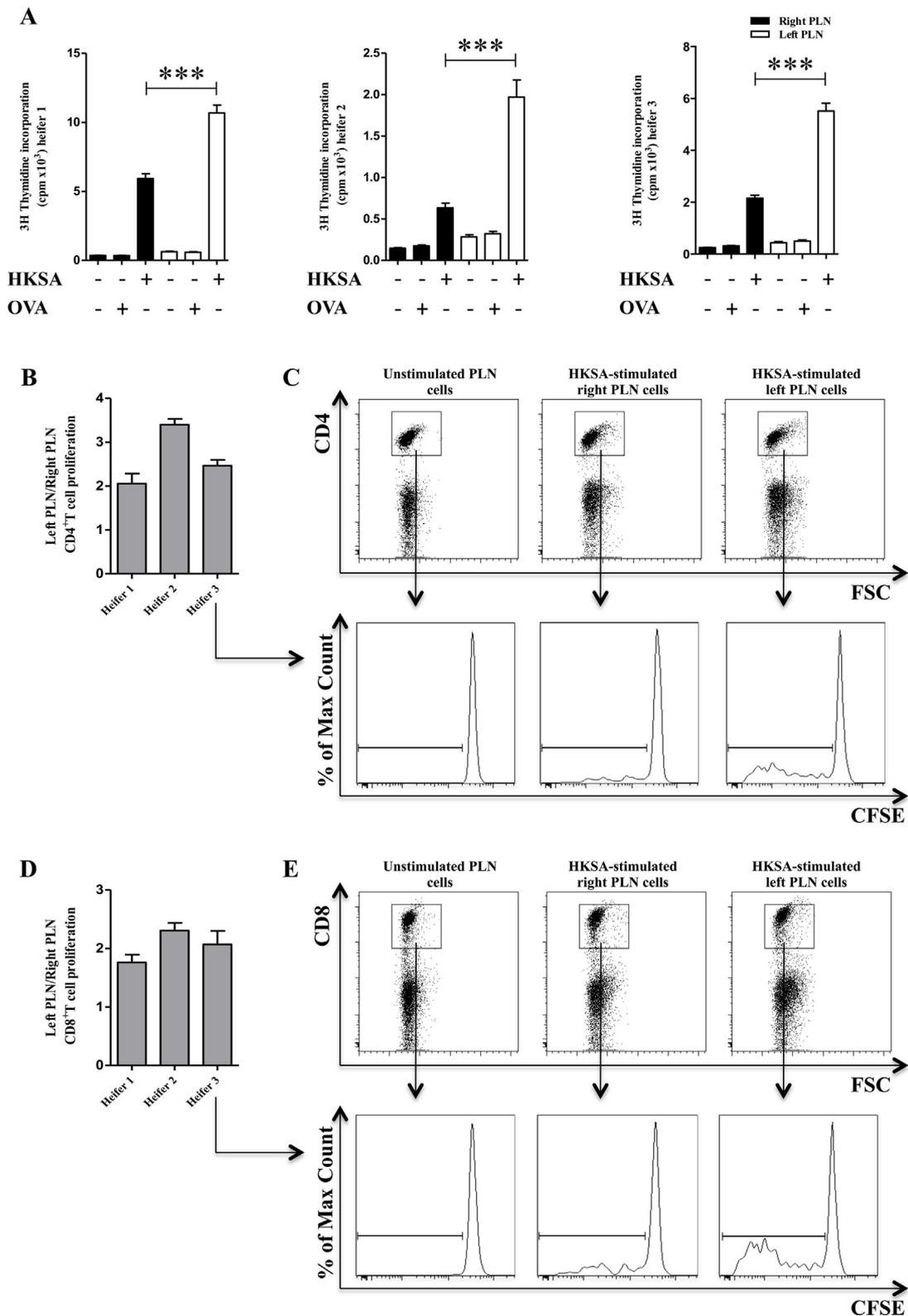


Fig. 8. Immunization of heifers with HKSA and GST-sboCD40LT induces significant antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. Three heifers were immunized at days 1, 2, 3, 21, 22 and 23 by subcutaneous injection, close to the PLNs, with the non-adjuvanted vaccine (HKSA+GST; right PLNs) or the GST-sboCD40LT-adjuvanted vaccine (HKSA+GST-sboCD40LT; left PLNs). Seven days after the last vaccine injection (day 30), heifers were sacrificed and the PLNs cells were collected. PLN cells (200,000 cells/well) were left untreated or were restimulated with either OVA (125 µg/ml; irrelevant antigen) or 5 × 10⁶ CFU/ml HKSA and cultured during 90 h at 37 °C. Tritiated thymidine was added to cells for the last 18 h of culture and proliferation was estimated by the measure of thymidine incorporation using a beta counter (A) (***) *p* < 0.001; Student's *t* test). Globally, results obtained in the HKSA-restimulated left PLNs were significantly different from those in the right PLNs (*p* < 0.001; type 2 ANOVA). At the same time, another fraction of PLN cells was labeled with CFSE and cultured at 200,000 cells/well. Cells were left untreated or were restimulated with 5 × 10⁶ CFU/ml HKSA and cultured during 72 h at 37 °C. Cells were then labeled with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies and analyzed for CD4⁺ (B, C) and CD8⁺ (D, E) T cell proliferation by flow cytometry based on their CFSE content (CFSE fluorescence intensity is divided by at least two in proliferating cells). Results are presented as means ± SD of the ratio between proliferating cells in the left PLN and those in the right PLN (B, D). Detailed representative results for one of the three heifers are shown for CD4⁺ (C) and CD8⁺ (E) T cells. Results obtained in the left PLNs were significantly different from those in the right PLNs (*p* < 0.001; Student's *t* test).

has the advantage to be non immunogenic in cattle. sboCD40LT could therefore be injected several times in the same animal if booster doses are required. The vaccine administration strategy adopted in this study implicates large volumes and repetitive injections that are not compatible with routine use. Indeed this restricting experimental protocol aimed above all at validating the tested therapeutic principle and needs to be adapted to herd medicine imperatives.

5. Conclusions

Vaccination is the most cost-effective approach to control infectious diseases in cattle. If vaccines can prevent many infectious diseases, it is considered to be particularly difficult to develop safe and effective vaccines against intracellular pathogens. The eradication of intracellular pathogens needs the development of appropriate CTL responses mediated by specific CD8⁺ T cells. In this study, we have produced a functional GST-sboCD40LT and have demonstrated, in a proof-of-concept study, that CD40 triggering by using this homologous recombinant protein induces a significant increase in both HKSA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells responses in draining lymph nodes. This vaccine strategy, although only applied to *S. aureus* in this study, could be implemented to other intracellular pathogens for which a cellular immune response is required.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank Dr. Sandra Ormenèse and Raafat Stephan from the Cell Imaging and Flow Cytometry GIGA Technological Platform for FACS analyses, and Cédric François, Raja Fares and Ilham Sbai for excellent technical and secretarial assistance. This work was supported by a Public-Private Partnership (PPP, N° 917006) between the Walloon Region (Service Public de Wallonie–Direction générale opérationnelle de l'Économie, de l'Emploi & de la Recherche – DG06), Pfizer Animal Health, and the University of Liège.

References

- Ahonen, C.L., Dooze, C.L., McGurran, S.M., Riter, T.R., Wade, W.F., Barth, R.J., Vasilakos, J.P., Noelle, R.J., Kedl, R.M., 2004. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8⁺ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J. Exp. Med.* 199, 775–784.
- Arbibe, L., Mira, J.P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J., Knaus, U.G., 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1, 533–540.
- Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Smith, T.D., Maliszewski, C.R., Clark, E.A., Smith, C.A., Grabstein, K.H., Cosman, D., Spriggs, M.K., 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357, 80–82.
- Auten, M.W., Huang, W., Dai, G., Ramsay, A.J., 2012. CD40 ligand enhances immunogenicity of vector-based vaccines in immunocompetent and CD4⁺ T cell deficient individuals. *Vaccine* 30, 2768–2777.
- Baccam, M., Bishop, G.A., 1999. Membrane-bound CD154, but not CD40-specific antibody, mediates NF- κ B-independent IL-6 production in B cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 3855–3866.
- Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E., Rousset, F., 1991. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 251, 70–72.
- Barrett, T.B., Shu, G., Clark, E.A., 1991. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J. Immunol.* 146, 1722–1729.
- Beland, J.L., Adler, H., Del-Pan, N.C., Kozlov, W., Sung, J., Fanslow, W., Rimm, I.J., 1998. Recombinant CD40L treatment protects allogeneic murine bone marrow transplant recipients from death caused by herpes simplex virus-1 infection. *Blood* 92, 4472–4478.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., Heath, W.R., 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478–480.
- Billiau, A., Matthys, P., 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70, 849–860.
- Buddle, B.M., Parlane, N.A., Wedlock, D.N., Heiser, A., 2013. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 136–146.
- Cao, J., Wang, X., Du, Y., Li, Y., Wang, X., Jiang, P., 2010. CD40 ligand expressed in adenovirus can improve the immunogenicity of the GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Vaccine* 28, 7514–7522.
- Diehl, L., den Boer, A.T., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Schumacher, T.N., Melief, C.J., Offringa, R., Toes, R.E., 1999. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat. Med.* 5, 774–779.
- Fanslow, W.C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M.G., Spriggs, M.K., Armitage, R.J., 1994. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin. Immunol.* 6, 267–278.
- French, R.R., Chan, H.T., Tutt, A.L., Glennie, M., 1999. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat. Med.* 5, 548–553.
- Gómez, C.E., Nájera, J.L., Sánchez, R., Jiménez, V., Esteban, M., 2009. Multimeric soluble CD40 ligand (sCD40L) efficiently enhances HIV specific cellular immune responses during DNA prime and boost with attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC expressing HIV antigens. *Vaccine* 27, 3165–3174.
- Gupta, S., Termini, J.M., Raffa, F.N., Williams, C.A., Kornbluth, R.S., Stone, G.W., 2014. Vaccination with a fusion protein that introduces HIV-1 gag antigen into a multimeric CD40L construct results in enhanced CD8⁺ T cell responses and protection from viral challenge by vaccinia-gag. *J. Virol.* 88, 1492–1501.
- Gurunathan, S., Irvine, K.R., Wu, C.Y., Cohen, J.J., Thomas, E., Prussin, C., Restifo, N.P., Seder, R.A., 1998. CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge. *J. Immunol.* 161, 4563–4571.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O., Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.* 29, 18–31.
- Harbury, P.B., Zhang, T., Kim, P.S., Alber, T., 1993. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262, 1401–1407.
- Harcourt, J.L., Brown, M.P., Anderson, L.J., Tripp, R.A., 2003. CD40 ligand (CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice. *Vaccine* 21, 2964–2979.
- Haswell, L.E., Glennie, M.J., Al-Shamkhani, A., 2001. Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. *Eur. J. Immunol.* 31, 3094–3100.
- Hollenbaugh, D., Grosmaire, L.S., Kullas, C.D., Chalupny, N.J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R.J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., 1992. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J.* 11, 4313–4321.
- Jabara, H.H., Fu, S.M., Geha, R.S., Vercelli, D., 1990. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J. Exp. Med.* 172, 1861–1864.
- Jamal, S.M., Belsham, G.J., 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res.* 44, 116.
- Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., Pober, J.S., 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4342–4346.
- Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., Thomas, D., 1995. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 3, 1031–1039.
- Lauterbach, H., Pätzold, J., Kassub, R., Bathke, B., Brinkmann, K., Chaplin, P., Suter, M., Hochrein, H., 2013. Genetic adjuvantation of recombinant MVA with CD40L potentiates CD8 T cell mediated immunity. *Front. Immunol.* 4, 251, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00251>.
- Leroux-Roels, G., 2010. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 28, C25–C36.
- Lim, S.Y., Bauermeister, A., Kjoanaas, R.A., Ghosh, S.K., 2006. Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 2, assessment of efficacy in the induction of protective immune responses to lethal bacterial infections in mice. *J. Immune Based Ther. Vaccines* 4, 5.
- Liu, J., Yu, Q., Stone, G.W., Yue, F.Y., Ngai, N., Jones, R.B., Kornbluth, R.S., Ostrowski, M.A., 2008. CD40L expressed from the canarypox vector, ALVAC, can boost immunogenicity of HIV-1 canarypox vaccine in mice and enhance the in vitro expansion of viral specific CD8⁺ T cell memory responses from HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. *Vaccine* 26, 4062–4072.
- Magalhães, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C., Penna, T.C.V., Pessoa Jr., A., 2007. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10, 388–404.
- Mazzei, G.J., Edgerton, M.D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J.F., Bernard, A., Allet, B., Bonnefoy, J.Y., 1995. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J. Biol. Chem.* 270, 7025–7028.
- Middleton, J.R., 2008. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines* 7, 805–815.
- Morris, A.E., Remmele Jr., R.L., Klinke, R., Macduff, B.M., Fanslow, W.C., Armitage, R.J., 1999. Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154). *J. Biol. Chem.* 274, 418–423.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S., 1989. Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243, 538–542.
- Olsen, S.C., 2013. Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Rev. Sci. Tech.* 32, 207–217.

- Paulie, S., Rosén, A., Ehlin-Henriksson, B., Braesch-Andersen, S., Jakobson, E., Koho, H., Perlmann, P., 1989. The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction. *J. Immunol.* 142, 590–595.
- Peter, I., Nawrath, M., Kamarashev, J., Odermatt, B., Mezzacasa, A., Hemmi, S., 2002. Immunotherapy for murine K1735 melanoma: combinatorial use of recombinant adenovirus expressing CD40L and other immunomodulators. *Cancer Gene Ther.* 9, 597–605.
- Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., Noelle, R.J., 2004. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 307–328.
- Raaperi, K., Orro, T., Viltrop, A., 2014. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet. J.* 201, 249–256.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., Matzinger, P., 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474–478.
- Ridpath, J.F., 2013. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals* 41, 14–19.
- Rolph, M.S., Kaufmann, S.H., 2001. CD40 signaling converts a minimally immunogenic antigen into a potent vaccine against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 166, 5115–5121.
- Sacco, R.E., McGill, J.L., Pillatzki, A.E., Palmer, M.V., Ackermann, M.R., 2014. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Vet. Pathol.* 51, 427–436.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., Melief, C.J., 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature* 393, 480–483.
- Sin, J.I., Kim, J.J., Zhang, D., Weiner, D.B., 2001. Modulation of cellular responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen-specific helper T cell type 1 CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo. *Hum. Gene Ther.* 12, 1091–1102.
- Stone, G.W., Barzee, S., Snarsky, V., Kee, K., Spina, C.A., Yu, X.F., Kornbluth, R.S., 2006. Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J. Virol.* 80, 1762–1772.
- Thienel, U., Loike, J., Yellin, M.J., 1999. CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell. Immunol.* 198, 87–95.
- Tripp, R.A., Jones, L., Anderson, L.J., Brown, M.P., 2000. CD40 ligand (CD154) enhances the Th1 and antibody responses to respiratory syncytial virus in the BALB/c mouse. *J. Immunol.* 164, 5913–5921.
- van Kooten, C., Banchereau, J., 2000. CD40–CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67, 2–17.
- van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., Medema, J.P., van der Voort, E.I., Franssen, M.F., Offringa, R., Melief, C.J., Toes, R.E., 2002. CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(–) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5561–5566.
- Wallemacq, H., Bedoret, D., Pujol, J., Desmet, C., Drion, P.V., Farnir, F., Mainil, J., Lekeux, P., Bureau, F., Fiévez, L., 2012. CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed *Staphylococcus aureus* immunization in mice: a new vaccine strategy for staphylococcal mastitis. *Vaccine* 30, 2116–2124.
- Wells, J.W., Cowled, C.J., Farzaneh, F., Noble, A., 2008. Combined triggering of dendritic cell receptors results in synergistic activation and potent cytotoxic immunity. *J. Immunol.* 181, 3422–3431.
- Würtzen, P.A., Nissen, M.H., Claesson, M.H., 2001. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand. J. Immunol.* 53, 579–587.
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R., Günther, J., Draing, C., von Aulock, S., Schubert, H.J., Seyfert, H.M., 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45, 1385–1397.
- Yi, Q., Szmánia, S., Freeman, J., Qian, J., Rosen, N.A., Viswamitra, S., Cottler-Fox, M., Barlogie, B., Tricot, G., van Rhee, F., 2010. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma: intranodal injections of idiotype-pulsed CD40 ligand-matured vaccines led to induction of type-1 and cytotoxic T-cell immune responses in patients. *Br. J. Haematol.* 150, 554–564.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2016/0480/15

ISBN 978-2-87543-087-8



9 782875 430878