



HAL
open science

Effet des agrégats de protéines sur la maturation des cellules dendritiques : implication dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques

Yann Gallais

► To cite this version:

Yann Gallais. Effet des agrégats de protéines sur la maturation des cellules dendritiques : implication dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques. Immunité innée. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS102 . tel-01521577

HAL Id: tel-01521577

<https://theses.hal.science/tel-01521577>

Submitted on 12 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS102

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat : Immunologie

Par

Mr Yann Gallais

Effet des agrégats de protéines sur la maturation des cellules dendritiques.
Implication dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques

Thèse présentée et soutenue à Châtenay Malabry, le 11 Mai 2016

Composition du Jury :

Dr. Maillère, Bernard
Dr. Moris, Arnaud
Dr. Teillaud, Jean-Luc
Dr. Davoust, Jean
Pr. Watier, Hervé
Pr. Pallardy, Marc
Dr. Turbica, Isabelle

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-encadrante de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres de mon jury, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Ainsi, je remercie Arnaud Moris et Jean-Luc Teillaud pour le temps consacré en tant que rapporteurs. Je remercie également Jean Davoust, Bernard Maillère et Hervé Watier pour leur participation en tant qu'examineurs.

Ma gratitude va à mes encadrants de thèse Isabelle Turbica et Marc Pallardy. Marc, j'espère qu'après ces 3 années et demie, tu te souviens enfin de mon prénom (et non Romain ne soutiens pas une seconde fois). Merci de m'avoir finalement trouvé un financement de thèse. Tu sais toujours donner le cap (même quand ça ne me plaît pas !!), et les discussions que nous avons eu ont toujours été très enrichissantes. Isabelle, merci pour ta disponibilité au quotidien et ta patience à toute épreuve. Tu as toujours trouvé les mots justes pour me remotiver dans les moments de doute, et toujours été à l'écoute quand il le fallait.

Je remercie tout particulièrement Sylvie Chollet-Martin. Vous m'avez accueilli dans l'équipe il y a plusieurs années maintenant. Merci pour votre bienveillance et votre optimisme à toute épreuve, grâce auquel le projet ectosomes aura finalement abouti. J'ai fait mes premiers pas dans un labo de recherche sur ce projet, et travailler avec vous aura été une très belle expérience. J'en profite pour remercier Aude Gleizes, pour tes conseils et ton franc-parler. Naturellement, je remercie grandement Roseline Gorges. Roseline, ton calme olympien (ahah), je pense manque à tout le monde. Tu m'as enseigné les bases de la culture cellulaire et l'art de la numération.... (Roseliiiiiiiiine, j'ai une num' à faire, t'es occupée ???) Eh oui, malgré tes « quelques » coups de gueule (promis j'arrête avec ça), travailler avec toi aura toujours été un moment agréable. Merci à Lorena Barrientos, j'aurais eu le plaisir de travailler avec toi, et de partager de longues discussions, sur la science, le monde entier... toujours autour d'une bonne bouteille de Martini. Au final, commencer dans la recherche dans un tel environnement n'est pas donné à tout le monde, je peux donc m'estimer très chanceux.

Je remercie également Saadia Kerdine-Rômer et Armelle Biola-Vidamment, pour leurs conseils et leur soutien permanent. Vous m'aurez permis de mieux appréhender la biologie moléculaire, et vous aurez toujours été des oreilles attentives, malgré vos emplois du temps chargés. Luc de Chaisemartin, grand maître du yoga, de la zenitude... et des macarons, merci pour ta sérénité communicative.

Un grand merci à ma binômette, Natacha Szely. J'ai perdu le compte du nombre de poches de sang, mais ça se compte en (beaucoup de) dizaines de litres. Tu m'auras enseigné l'art de l'optimisation du protocole (évolutions, continents, tout ça tout ça...) et de l'organisation, notamment. Ton aide sur les manips (allez, aujourd'hui on se fait 20 plaques de qPCR, let's go) m'aura été très précieuse et les aura égayé. J'en profite pour remercier Jérôme Kerzerho, pour ses protocoles. Promis le brevet « Cosmo » est entre de bonnes mains ! Merci à vous deux pour les soirées passées à refaire le monde, tout en liquidité ;).

Je veux aussi remercier Marie-Hélène Damiens, Isabelle Boristhènes, Benoît Noël et Muriel Berthault. MHD, nos longues conversations matinales autour de la balancelle vont me manquer. Isa, merci pour les colis, les lavages express de mes flacons et ta bonne humeur quotidienne. Benoît, ton humour aura été d'un grand soutien, notamment pendant le traitement des poches. Enfin, Mumu, merci pour t'être occupée des commandes urgentes (enfin toutes les commandes quoi), et pour nos discussions de bon matin.

Je remercie grandement François-Xavier Legrand et Arnaud Leroy, pour m'avoir enseigné les secrets de la caractérisation des protéines.

Je remercie également Laurent Mascarell et Claire Guéguen pour les interactions que nous avons eu sur le projet ectosomes, ce fut très enrichissant.

Merci à Romain Génard, mon voisin de bureau, mon pote de galères sur ces 3 années. Notre escapade tourangelle résume très bien à mon sens notre relation.... Un peu de science, pas mal de déconne, de la bière....et une chèvre?!? (Go goats, go !).

Doux Jésus, j'en suis déjà à remercier Marie de Bourayne. On en aura eu des sueurs froides avec les co-cultures, les marquages intra (et meeeeerde le cytomètre est encore en rade.... Bon, bah on file à la Pitié !), mais au final on s'en sera toujours sorti, dans la joie et la bonne humeur. Marie-Alix Espinasse, ton sens de l'optimisation culinaire et ton explosivité n'ont d'égal que ta sympathie. Marie-Eliane Azoury, ton calme permanent restera la plus grande énigme scientifique jamais résolue. Vanessa Granger, on aura eu l'occasion de faire quelques poches ensemble, et je ne sais pas qui de nous deux aura le plus râlé ;).

Ca fait un peu ancien combattant, mais je vais maintenant remercier les « jeunes » du labo. Chloé Raffalli et Rami Bechara, mes nouveaux collègues de bureau, merci de supporter mon langage fleuri et mes coups de sang. En tout cas vous aurez été des voisins Nickel (petite dédicace Rami ;)). Doumet Helou (Bonjour, ça va bien ??). On n'aura pas eu l'occasion de beaucoup échanger, toi et ton second degré, mais je te souhaite le meilleur avec les souris. Et

enfin à Myriam Nabhan, merci pour ton soutien... et surtout bon courage. J'espère ne pas trop t'avoir dégouté du sujet, tu verras, on y trouve quand même des bons côtés ;).

On dit souvent que la thèse est une épreuve. Et cette épreuve, si j'en suis venu à bout, et c'est grâce à mes proches, cette troupe de choc, mon équipe de super-héros. Une deuxième thèse complète ne serait pas suffisante pour vous exprimer mes sentiments.

A mes parents, Marie-Claire et Jean-Marie, qui ont toujours cru en moi. Vous m'avez toujours guidé, en me laissant la liberté de choisir ma voie, vous m'avez toujours soutenu, toujours rassuré dans les moments de doute. Vous serez toujours un exemple !

A mes sœurs, Audrey et Marie-Aude. Merci pour les devoirs de Maths et de Philo, le dimanche après midi... Grâce à vous j'ai compris que ces domaines n'étaient pas pour moi :p. merci pour tout, si j'en suis là aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous.

Enfin, je ne peux que conclure qu'avec la personne qui se tient juste en face de moi, en train de rédiger à son tour son manuscrit, ma « DS » ;), ma source d'inspiration, mon déficit bancaire :p mais aussi ma richesse, merci à toi, Aude. Merci de m'avoir supporté au quotidien, d'avoir été là quand il fallait, dans les bons comme dans les moins bons moments. On aura souvent râlé, pesté, on se sera souvent lamenté, mais au final, j'arrive au bout, et toi très prochainement ! On aura formé un duo de choc, et cette épreuve nous aura je pense, encore plus soudé. Si l'avenir ressemble à ce qu'on a vécu pour le moment, et bien je signe tout de suite. En attendant, on s'refait un p'tit circle-pit ? \m/

Je remercie également tous les donneurs anonymes qui m'auront permis de réaliser toutes ces manip. Le RER B pour m'avoir transporté au début de ma thèse... Et la C3, pour tous ces trajets. Enfin, merci à la grande famille du heavy fuc**** metal (remercier un à un tous les groupes serait trop long), pour les heures d'écoute musical. Rien de mieux que d'attaquer le matin avec des riffs endiablés et le roulement de la batterie !

Sommaire

Avant-propos	1
I. Les protéines thérapeutiques	3
1. Présentation générale.....	3
2. Modalités de production et de purification des protéines thérapeutiques	4
2.1 Les systèmes d'expression	4
2.2 La purification.....	6
3. L'importance de la stabilité des protéines thérapeutiques	9
3.1 L'instabilité chimique	9
3.2 L'instabilité physique.....	10
4. Les anticorps monoclonaux	11
4.1 Structure générale des anticorps	11
4.2 Les modifications post-traductionnelles des anticorps.....	12
4.3 Les différentes classes d'anticorps chez l'Homme	13
4.4 Le développement des anticorps thérapeutiques	14
4.4.1 Les différentes générations d'anticorps.....	14
4.4.2 Optimisation des anticorps pour leur emploi en thérapeutique	16
1. Modalités de l'administration des protéines thérapeutiques	19
2. L'hormone de croissance	20
3. Le Rituximab.....	25
II. Le problème de l'agrégation dans les spécialités pharmaceutiques de protéines thérapeutiques.....	27
1. Définition.....	27
2. Mécanismes de formation des agrégats	29
2.1 Intermédiaires partiellement ou totalement dénaturés.....	29
2.2 Auto-association.....	30
2.3 Liaison chimique directe et dégradations chimiques.....	31
3. Formation des agrégats au cours de la production industrielle des protéines	32
4. Méthodes d'analyse des agrégats formés durant la production	35
5. Formation des agrégats après la libération des lots de protéines.....	42
6. Modélisation <i>in silico</i> des agrégats	43
III. Protéines thérapeutiques et système immunitaire, quelles interactions possibles ?.....	45

Sommaire

1. Les cellules dendritiques	45
1.1 Les différents sous-types de cellules dendritiques chez l'Homme	46
1.1.1 Les cellules dendritiques du sang	46
a. Les cellules dendritiques myéloïdes	47
b. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	47
1.1.2 Les cellules dendritiques des tissus	48
a. Les cellules de Langerhans	48
b. Les cellules dendritiques du derme	48
c. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes	49
1.1.3 Les cellules dendritiques inflammatoires	49
2. Le rôle des cellules dendritiques : un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative ..	50
2.1. La capture et la présentation des antigènes	50
2.2. La maturation et la migration des cellules dendritiques	54
2.3. Activation et orientation des lymphocytes T	56
2.4. Les voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques	62
2.4.1 Les voies induites par l'engagement des Toll like receptors (figure 15)	63
2.4.2 Les voies induites par les récepteurs Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like (NLR)	65
2.4.3 Les voies induites par les récepteurs de la famille des lectines de type C	66
2.4.4 Les voies induites par les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G	67
2.4.5 La voie NF- κ B (Figure 18)	71
2.4.6 La voie des Mitogen Associated Protein Kinases	73
a. p38 MAPK	74
b. ERK	74
c. JNK	74
2.4.7 La voie PI3K	75
2.4.8 La signalisation induite au cours de la phagocytose	76
3. La mise en place de la réponse lymphocytaire B	78
IV. L'immunogénicité des protéines thérapeutiques, causes et conséquences	81
1. Le développement d'« Anti-Drug Antibodies » (ADA), quelles conséquences ?	81
2. Les méthodes de détection des Anti-Drug Antibodies	84
3. Facteurs influençant l'immunogénicité des protéines thérapeutiques	87
3.1. Le patient	87
3.1.1 Statut immunologique	87

3.1.2	La pathologie	88
3.1.3	Le fond génétique.....	88
3.2	Le traitement.....	89
3.2.1	La durée du traitement et les doses injectées	89
3.2.2	Les voies d'administration.....	89
3.3	Le produit	90
3.3.1	Degré de non-soi	90
3.3.2	La présence d'épitopes T.....	92
3.3.3	Les glycosylations et la PEGylation.....	93
3.3.4	Les propriétés immuno-modulatrices de la protéine.....	94
3.3.5	La formulation	94
3.3.6	Les contaminants et impuretés	95
3.4	La présence d'agrégats.....	96
3.4.1	Corrélations chez les patients	96
3.4.2	Mises en évidence dans les modèles animaux.....	97
3.4.3	Etudes in vitro.....	99
	Objectifs du travail	101
	Résultats: Article	103
	Therapeutic human growth hormone and IgG aggregates trigger dendritic cells activation and polarize CD4+T cells responses.	103
	Résultats complémentaires :.....	139
	Mécanismes intracellulaires induits lors de l'interaction des cellules dendritiques avec les agrégats d'hormone de croissance.....	139
1.	Introduction	139
2.	Matériel et méthodes	141
2.1	Production et caractérisation des agrégats de hGH.....	141
2.2	Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains	142
2.3	Traitement des moDC par les agrégats de hGH	142
2.4	Isolement des ARN, Reverse Transcription et PCR quantitative (RT-qPCR)	143
2.5	Analyse protéique par western blot.....	143
3.	Résultats.....	145
3.1	Caractérisation des agrégats	145
3.2	Les agrégats de GH modulent l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines dans les DC	146
3.3	Implication des voies de signalisation	147

Résultats complémentaires : Etude de la modulation des fonctions des cellules dendritiques par les agrégats d'anticorps, dans le cadre Projet ABIRISK	151
1. Introduction	151
2. Présentation de l'étude.....	154
3. Matériel et méthode.....	156
3.1 Traitement des moDC par les anticorps natifs ou agrégés	156
3.2 Analyse des transcrits de cytokines et chimiokines par PCR quantitative (RT-qPCR)	157
4. Résultats.....	157
Les agrégats d'anticorps modulent différemment l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines.....	157
Discussion	161
Perspectives.....	169
Bibliographie.....	171
Annexes.....	199
Annexe 1: Effet des agrégats d'Infliximab de Shear Stress sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines	199
Annexe 2: Protein kinase CK2 controls T cell polarization through dendritic cells activation in response to contact sensitizers	201
Annexe 3: Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization.....	243

Index des figures

Figure 1: Schéma général des étapes de production d'une protéine thérapeutique.	7
Figure 2: Structure des différents isotopes d'anticorps.....	11
Figure 3: Les différentes générations d'anticorps.....	15
Figure 4: Structure tertiaire de l'hormone de croissance humaine.....	21
Figure 5: Mécanismes d'agrégation des protéines en solution.....	29
Figure 6 : Représentation schématique des spectres d'analyse de la taille des protéines de diverses méthodes d'analyse.	37
Figure 7: Spectres CD associés aux structures secondaires des protéines.....	40
Figure 8: Voies d'internalisation des antigènes dans les cellules présentatrices d'antigène.....	51
Figure 9: Voies de présentation des Ag par les DC.....	54
Figure 10: Expression de cytokines, chimiokines et marqueurs de surface par les cellules dendritiques immatures ou matures.....	56
Figure 11: La synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T.....	57
Figure 12: Les principales molécules de co-stimulation sur les cellules dendritiques et lymphocytes.....	58
Figure 13: Molécules co-inhibitrices sur les cellules dendritiques et lymphocytes T.....	59
Figure 14: Polarisation des LyT CD4+ selon les cytokines sécrétées par les DC.....	60
Figure 15: Voies de signalisation activées dans les cellules dendritiques par les TLR.....	65
Figure 16: Expression des FcγR par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques chez l'Homme.....	69
Figure 17: Voies de signalisation activées par les FcγR (a) activateurs et (b) inhibiteurs.....	70
Figure 18: Voies de signalisation classique (a) et alternative (b) de NF-κB.....	73
Figure 19: Effet de la PI3K sur les voies de signalisation activées en réponse à une stimulation TLR.....	76
Figure 20: Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des "ruffles" membranaires.....	77
Figure 21: Méthodes de détection des ADA.....	84
Figure 22: Capacité de détection des ADA par les différentes méthodes en présence de protéine thérapeutique.....	85
Figure 23: Détection des anticorps neutralisants par un test fonctionnel avec gène rapporteur.....	86
Figure 24: Analyse de l'hormone de croissance humaine native ou agrégée par dichroïsme circulaire.....	145
Figure 25: Analyse de l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines par qPCR.....	147
Figure 26: Analyse de la phosphorylation des protéines impliquées dans les voies d'activation induites par les agrégats d'hormone de croissance.....	148
Figure 27: Analyse des transcrits de CCL3 et CXCL10 en réponse aux agrégats de GH en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de différentes protéines de signalisation.....	149
Figure 28: Organisation du Consortium ABIRISK.....	152
Figure 29: Démarche expérimentale pour l'étude de l'activation des moDC par les agrégats d'anticorps.....	156
Figure 30: Effet des agrégats d'Infliximab (Heat Stress L2) sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines après 6h ou 24h de stimulation.....	158

Sommaire

Figure 31: Heat map : Effet des agrégats d'Infliximab, Rituximab, Natalizumab et Adalimumab (Heat Stress et shear stress, L2) sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines après 6h ou 24h de stimulation.....	159
Figure 32: Schéma général de l'interaction entre les agrégats et les cellules dendritiques et ses conséquences phénotypiques et fonctionnelles.....	168
Figure 33: Effet des agrégats d'Infliximab (Shear Stress L2) sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines après 6h ou 24h de stimulation.....	199

Index des tables

Tableau 1: Avantages et Inconvénients des systèmes de production des protéines thérapeutiques	6
Tableau 2: Anticorps monoclonaux thérapeutiques approuvés en Europe et/ou aux Etats-Unis en Mai 2015.....	18
Tableau 3: Spécialités d'hormone de croissance autorisées en France.....	23
Tableau 4: Classification des agrégats de protéines.....	28
Tableau 5 : Restrictions de la pharmacopée européenne sur la présence de particules dans les préparations de protéines thérapeutiques.	36
Tableau 6: Phénotype et localisation des différents sous-types de cellules dendritiques	46
Tableau 7: Les différents ligands des TLR humains.	63
Tableau 8: Récepteurs Fc pour les IgG chez l'homme.....	68
Tableau 9 : L'immunogénicité des protéines thérapeutiques.	81
Tableau 10 : Facteurs influençant l'immunogénicité des protéines thérapeutiques.....	87
Tableau 11: Amorces utilisées pour la qPCR.....	143
Tableau 12: Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot.....	144
Tableau 13: Analyse de l'hormone de croissance humaine native et agrégée par chromatographie d'exclusion de taille.....	146
Tableau 14: Anticorps utilisés pour l'étude WP3.6 et indications thérapeutiques	153
Tableau 15: Descriptif des conditions de stress appliquées aux solutions d'anticorps.....	154
Tableau 16: Concentrations des solutions d'anticorps employées pour la réalisation des différents stress.	155

Sommaire

Abréviations

ADA: Anti-Drug Antibody	GH: Hormone de croissance
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	GM-CSF: Grannulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Ag: Antigène	HSA: Human Serum Albumin
AP-1 : Activator Protein-1	HLA: Human Leukocyte Antigen
ARNm : Acides ribonucléiques messagers	ICOS: Inducible T cell Co-Stimulator
CCL : Chemokine (C-C motif) ligand	IDO: Indoleamine 2,3 DiOxygenase
CXCL : Chemokine (CXC motif) ligand	IFN: Interféron
CCR : Récepteur aux chimiokines	Ig: Immunoglobuline
CD : Cluster de Différenciation	IKKβ: Inibitor Kappa B (IkB) Kinase beta
CDR : Complementarity Determining Region	IL: Interleukine
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinases
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	IRF: Interferon Regulatory Factor
DAMP: Danger Associated Molecular Pattern	ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
DC: Cellule Dendritique	ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
DC-SIGN: DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin	JNK: c-Jun N-terminal kinases
DLS : Dynamic Light Scattering	LPS: Lipopolysaccharide
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay	LyB : Lymphocyte B
EMA : European Medicines Agency	LyT: Lymphocyte T
EPO: Erythropoïétine	MAPK: Mitogen Assciated Protein Kinase
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase	MM: Masse Moléculaire
Fab: Fragment antigen binding	MoDC: DC humaines issues de monocytes
Fc: Fragment constant	MyD88: Myeloid Differentiation factor 88
FcR: Fc Receptor	Nab: Neutralizing antibody
FDA: Food and Drug Administration	NF-κB: Nuclear Factor kappa B
FoxP3: Forkhead box P3	NLR: Nod-Like Receptor

Abréviations

OL: Organe Lymphoïde

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PEG: Polyéthylène Glycol

PRR: Pathogen Recognition Receptor

PS80: Polysorbate 80

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

SEC: Size Exclusion Chromatography

STAT: Signal transducer and activator of Transcription

TCR : Récepteur des lymphocytes T

Th1 : Lymphocyte T auxiliaire de type 1

Th2 : Lymphocyte T auxiliaire de type 2

Th17 : Lymphocyte T auxiliaire de type 17

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

Treg : Lymphocyte T régulateur

TLR: Toll Like Récepteur

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

Avant-propos

L'avènement des biotechnologies a constitué une révolution dans le domaine médical, notamment grâce au développement des protéines recombinantes à visée thérapeutique, dont l'utilisation a permis de progresser dans le traitement des maladies les plus sévères. Cependant, l'un des problèmes majeurs lié à l'administration de ces protéines est leur immunogénicité, c'est à dire que les patients développent fréquemment des anticorps dirigés contre le biomédicament (ADA, pour anti-drug antibodies). Ces anticorps peuvent avoir un effet neutralisant sur la protéine entraînant une perte d'efficacité du traitement, et dans de plus rares cas, des effets néfastes dramatiques. La réduction de cette immunogénicité constitue donc un défi majeur pour les développeurs de protéines thérapeutiques.

Parmi les nombreux facteurs contributifs au processus d'immunogénicité, la présence d'agrégats de protéines dans le produit administré est depuis longtemps suspectée, néanmoins son impact sur la mise en place de réponses immunitaires est encore mal compris. Le développement d'ADA chez les patients suppose le recrutement des cellules de l'immunité, et en particulier les cellules dendritiques qui ont un rôle clé dans l'orientation des réponses immunitaires, qui pourraient prendre en charge les agrégats de protéines, et migrer ensuite dans les organes lymphoïdes pour induire une réponse lymphocytaire. De fait, les mécanismes cellulaires induits par les agrégats sont encore peu étudiés.

Ce travail de thèse a pour but de mieux documenter les interactions entre agrégats de protéines thérapeutiques et cellules dendritiques. Il consiste d'une part à étudier la capacité des agrégats à induire la maturation des cellules dendritiques, de manière à générer une réponse lymphocytaire T. D'autre part, il explore les mécanismes moléculaires subséquents à la stimulation des cellules dendritiques par les agrégats. Cette thèse s'inscrit dans le cadre du Projet ABIRISK (Anti-Biopharmaceutical Immunization: prediction and analysis of clinical relevance to minimize the RISK), consortium européen de laboratoires pharmaceutiques et académiques, dont la mission est d'intégrer différentes approches pour l'étude de l'immunogénicité des biomédicaments. L'identification de marqueurs d'activation des cellules dendritiques par les agrégats de protéines constitue un des objectifs définis par le Projet.

Le document présenté ici comporte les parties suivantes :

-L'introduction bibliographique présente dans un premier chapitre les procédés d'obtention des protéines thérapeutiques, et se focalise sur deux protéines que nous avons

Avant-propos

choisies pour modèles, l'hormone de croissance humaine, et le Rituximab, un anticorps monoclonal. Le deuxième chapitre aborde le problème de l'agrégation dans les spécialités de protéines thérapeutiques, c'est à dire les mécanismes de formation des agrégats ainsi que les méthodes mises en place pour les détecter. Un troisième chapitre est consacré à l'interaction entre les protéines thérapeutiques et le système immunitaire en se focalisant sur la mise en place d'une réponse immunitaire par les cellules dendritiques. Enfin, le dernier chapitre présente les facteurs contributifs à l'immunogénicité des protéines thérapeutiques et les conséquences associées.

-La deuxième partie du document présente le travail expérimental et les résultats qui en sont issus, ainsi qu'une discussion qui vient les commenter et établit un bilan général sur l'ensemble de l'étude.

I. Les protéines thérapeutiques

1. Présentation générale

Les avancées majeures techniques dans le domaine des biotechnologies et de l'ADN recombinant ont permis le développement d'une nouvelle classe de produits de santé, les protéines recombinantes à visée thérapeutique. Produites à grande échelle et hautement purifiées, les protéines recombinantes ont été introduites sur le marché en 1982, avec l'insuline humaine (Humulin®, Genentech). Le marché des produits biotechnologiques s'est alors rapidement étendu, et représente à l'heure actuelle 30% des produits thérapeutiques mis sur le marché (Brinks et al., 2011). Ce marché est en expansion permanente, et les chances de réussite du développement de ces produits sont considérées comme supérieures par rapport aux substances chimiques (Pavlou and Reichert, 2004).

Une différence majeure des protéines thérapeutiques par rapport aux molécules chimiques est leur masse moléculaire (MM). Les protéines sont constituées de longues chaînes polypeptidiques et possèdent généralement une MM comprise entre 10 et 150 kilo-Dalton (kDa), tandis que les drogues chimiques ont une MM généralement inférieure à 1 kDa. Par ailleurs les protéines thérapeutiques bénéficient d'une activité et d'une spécificité très élevée, et ce à faible concentration, ce qui en limite les effets secondaires (Wang, 1999). Ces molécules sont actuellement abondamment utilisées, principalement dans des pathologies de type auto-immunes, oncologiques ou inflammatoires. Elles peuvent également servir à traiter des déficits innés ou acquis chez les patients.

L'obtention des protéines thérapeutiques est un procédé long, incluant la culture des cellules productrices, la purification et la formulation du produit, qui doit être optimisée pour l'administration aux patients. Le procédé général sera développé ci-après, et les exemples de deux protéines, l'hormone de croissance et le Rituximab (un anticorps monoclonal) seront développés.

2. Modalités de production et de purification des protéines thérapeutiques

La production des protéines thérapeutiques utilise divers systèmes d'expression, aussi bien des cellules procaryotes ou eucaryotes, ainsi que des animaux transgéniques. L'utilisation d'un système particulier sera dictée par les caractéristiques physico-chimiques et l'origine de la protéine à produire, l'utilisation de celle-ci (mode d'injection, fréquence...), ainsi que les quantités nécessaires pour traiter les patients. Enfin, le coût de production peut également entrer en considération.

Dans la majorité des cas, la protéine sera étrangère pour la cellule-hôte, et les modifications post-traductionnelles peuvent par conséquent différer du produit original. En effet, on considère qu'environ 5% du protéome inclut des enzymes réalisant plus de 200 types de modifications post-traductionnelles. Ces modifications dépendent de l'espèce voire du type cellulaire utilisé. La nature de la glycosylation est importante dans la mesure où des différences vis-à-vis de la protéine originale peuvent avoir un impact sur l'activité biologique, la stabilité, la pharmacocinétique ou encore l'immunogénicité de la protéine recombinante. Notamment, bien que les cellules procaryotes puissent parfois produire des glycoprotéines, la structure des glycosylations est différente de celles obtenues dans une cellule eucaryote (Dell et al., 2010). Dans le cas de protéines thérapeutiques non glycosylées comme l'hormone de croissance, un système d'expression procaryote (comme *E. Coli*) peut en revanche s'avérer intéressant, notamment de par le coût de production relativement faible par rapport à d'autres systèmes d'expression.

2.1 Les systèmes d'expression

Les protéines thérapeutiques actuellement sur le marché sont produites par génie génétique via différents systèmes recombinants d'expression. Les systèmes les plus couramment utilisés sont *E. Coli* et les lignées de cellules de mammifères, mais d'autres systèmes tels que la levure ou les cellules d'insecte sont aussi employés. Chaque système dispose de divers avantages, mais également de limites qui vont être détaillés ci-après (tableau 1).

La production en microorganisme présente de nombreux avantages. En effet, ils peuvent être cultivés en grande quantité et à faible coût. La bactérie la plus communément utilisée pour la production de protéines thérapeutiques est *E. Coli*. La première protéine produite par génie génétique et autorisée sur le marché fut l'insuline recombinante humaine en 1982, produite par ce microorganisme dont l'utilisation présente plusieurs avantages. Tout d'abord, il a longtemps

servi de modèle d'étude pour la génétique procaryote, sa biologie moléculaire est par conséquent bien connue. De plus, il est possible de faire exprimer de fortes quantités de protéine hétérologue (l'expression de la protéine recombinante pouvant atteindre jusqu'à 30% de la production protéique totale). Enfin, il s'agit d'un organisme à croissance rapide, dans un milieu de faible coût. L'un des défauts majeurs de ce système est l'expression intracellulaire des protéines (Ni and Chen, 2009). Cela nécessite des étapes supplémentaires pour récupérer et purifier les protéines d'intérêt. Par ailleurs, la forte expression de protéines hétérologues intracellulaires induit la formation de corps d'inclusion (Ventura and Villaverde, 2006), ce qui nécessite des étapes de solubilisation de la protéine avant de la purifier. Il est de plus nécessaire d'apporter un soin particulier à l'élimination des molécules de lipopolysaccharide, exprimés à la surface de l'organisme.

La production de protéines recombinantes en cellules de levure présente plusieurs avantages. Tout d'abord, leur biologie moléculaire a été étudiée en détail, ce qui facilite leur manipulation génétique. Leur croissance est relativement rapide, et elles sont capables d'effectuer les modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations. Cependant, le schéma de glycosylation diffère de celui observé pour la protéine native (Çelik and Çalık, 2012). Par ailleurs, l'expression de la protéine hétérologue ne peut représenter au maximum que 5% du total de protéines, ce qui est faible, comparé à une production dans *E. Coli*.

Les avancées techniques en génétique ont permis l'utilisation des cellules animales pour la production en routine de protéines thérapeutiques. Le principal avantage de ces systèmes est leur capacité à pouvoir effectuer des modifications post-traductionnelles des protéines. Les cellules CHO (chinese hamster ovary) et BHK (baby hamster kidney) sont les plus utilisées actuellement. Les principaux inconvénients dans l'utilisation de ce type de cellules résident dans la complexité du milieu nutritionnel, une croissance relativement lente, ainsi qu'une plus grande sensibilité aux dommages physiques, comparé à un système comme *E. Coli*. Par ailleurs, la synthèse importante de protéine par une cellule peut conduire à une absence de repliement d'une partie des protéines produites, qui vont alors former des structures appelées agregosomes, structure regroupant des produits non repliés, mal repliés ou agrégés (Kopito, 2000). Ceci peut conduire notamment à un rendement diminué.

Paramètre	Bactérie (Procaryste)	Levure (Eucaryote)	Cellule de mammifère (Eucaryote)	Cellule d'insecte	Plante transgénique	Animal transgénique
Niveau de production	Elevée	Elevée	Faible	Moyen	Elevé	Elevé
Poids moléculaire	Faible	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé
Ponts disulfure	Possible	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Sécrétion	Non	Oui/Non	Oui	Oui (rendement faible)	Non	Oui (lait des femelles)
Etat d'agrégation	Corps d'inclusion	Agregosome	Agregosome	Agregosome	Agrégation induite par oxydation	Agregosome
Repliement	Risques de mauvais repliement	Repliement correct	Repliement correct	Repliement correct	Repliement correct	Repliement correct
Glycosylation	Limitée	Possible	Possible	Possible	Différente	Possible
Contamination par des rétrovirus	Non	Non	Possible	Non	Non	Possible
Contamination par des agents pyrogènes	Possible	Non	Non			
Coût de production	Faible	Faible	Elevé	Elevé	Faible	Relativement faible

Tableau 1: Avantages et Inconvénients des systèmes de production des protéines thérapeutiques.
Adapté de Crommelin et al., 2013; Houdebine, 2009.

En général, les cellules peuvent être cultivées en incubateurs, qui contiennent le milieu liquide approprié pour leur croissance. Les cellules peuvent y être en suspension, immobilisées ou encore maintenues dans une matrice. La culture pour la production industrielle s'effectue généralement dans des fermenteurs pour les cellules bactériennes ou en bioréacteurs pour les cellules de mammifère.

Les systèmes de production alternatifs tels que les cellules d'insecte, les plantes ou animaux transgéniques tendent à se développer, dans un souci d'augmentation des rendements de production et d'abaissement des coûts. Ainsi, la production d'antithrombine par des chèvres transgéniques permet théoriquement de diminuer le coût par gramme de protéine d'au moins un facteur 10 (Houdebine, 2009), alors que la production de protéines par les plantes permet de réduire les coûts de fonctionnement de 20 à 90%. Cependant les protéines thérapeutiques issues de ces systèmes restent pour le moment encore minoritaires.

2.2 La purification

Isoler la protéine d'intérêt du surnageant de milieu de culture est une des étapes critiques dans les procédés de fabrication des produits de biotechnologie. Généralement, cette étape a un coût supérieur à celui de l'étape de production. Pour un anticorps monoclonal par

exemple, l'élimination des virus par filtration représente 40% du prix de production du produit (Gottschalk, 2006). Le schéma basique des différentes étapes de purification d'une protéine thérapeutique est représenté ci-après (figure 1) :

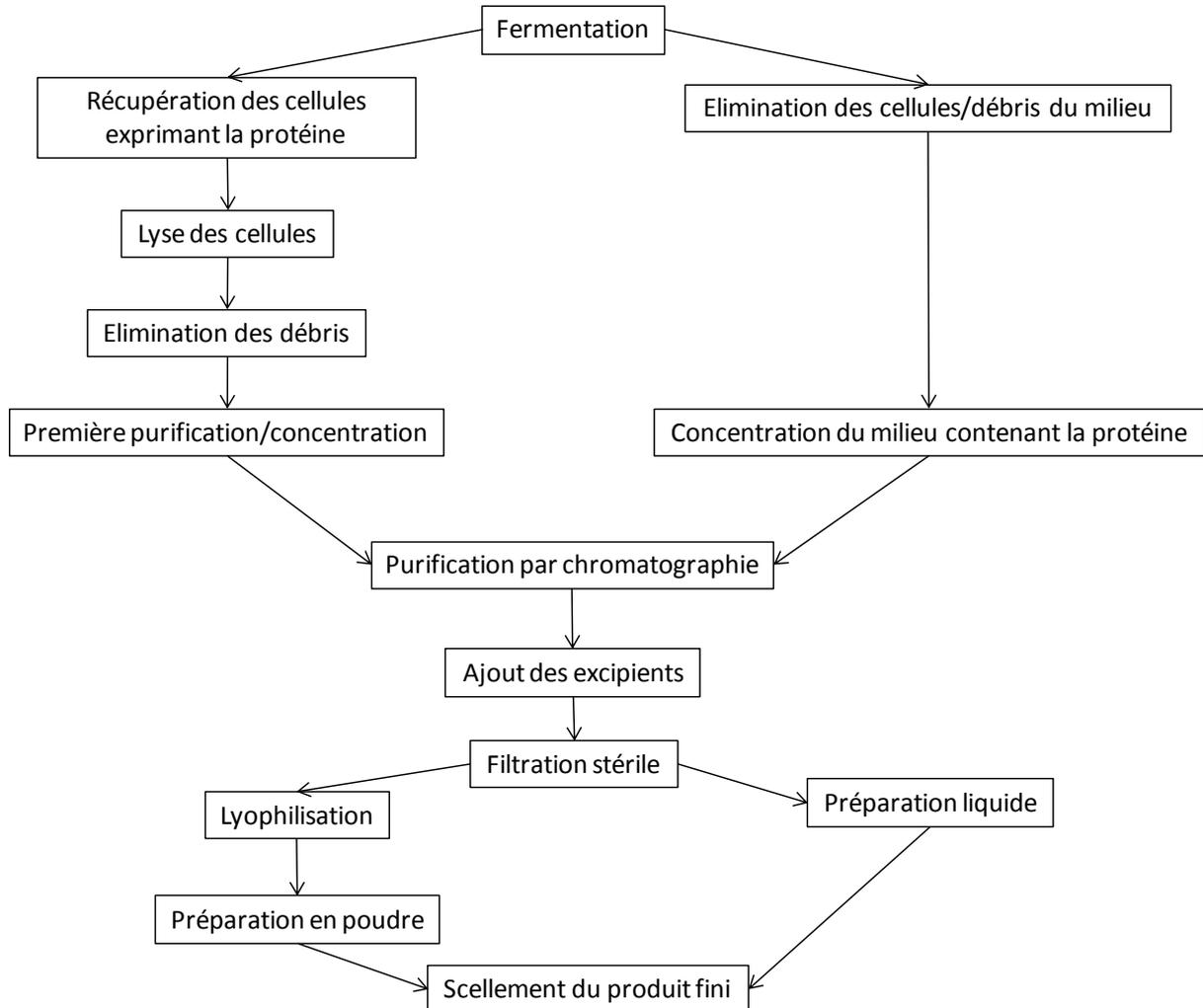


Figure 1: Schéma général des étapes de production d'une protéine thérapeutique.
D'après (Walsh, 2003)

De manière générale, les protéines issues de culture de cellules animales sont sécrétées dans le milieu de culture, tandis que les protéines issues de cultures de cellules procaryotes s'accumulent dans les cellules. La première étape de la purification correspond à l'élimination des cellules, débris et particules. Dans le cas de protéines sécrétées dans le milieu, une centrifugation directe peut être réalisée. Dans le cas où la protéine est exprimée de manière intracellulaire, il faut d'abord récupérer les cellules, les lyser, avant d'éliminer les débris. Cette dernière étape peut également être réalisée par centrifugation ou par filtration.

L'étape qui suit est généralement la concentration des protéines, dans le but de réduire les volumes d'échantillons à traiter et de procéder à une première étape de purification grossière (clarification). L'une des techniques à disposition est alors la précipitation des protéines en utilisant par exemple des sels de sulfate d'ammonium, ou des solvants comme l'éthanol. L'ultrafiltration est néanmoins une méthode plus fréquemment employée. Elle consiste à mettre en contact les protéines en solution avec une membrane disposant de pores pouvant être de différentes tailles (sélectionnées en fonction de la taille de la protéine à isoler). En mettant la solution sous pression, le milieu va passer à travers la membrane, entraînant les protéines ayant une masse moléculaire (MM) inférieure à celui des pores. La protéine d'intérêt, ayant une MM supérieure, restera dans la phase supérieure, et se retrouvera ainsi concentrée. La technique d'ultrafiltration est une technique couramment utilisée car elle est relativement peu coûteuse, rapide, et fournit un bon rendement (Marichal-Gallardo and Álvarez, 2012).

La concentration permet une diminution drastique du volume d'échantillon, néanmoins, la protéine est encore à ce moment là en présence d'autres protéines contaminantes. Une combinaison de chromatographies est alors réalisée, constituant la purification résolutive. Différents principes de séparation des protéines sur la base de différents paramètres physicochimiques sont utilisables. Entre 2 et 4 types de chromatographies sont en général réalisés. La filtration sur gel et la chromatographie échangeuse d'ions sont les plus communes. La chromatographie d'affinité est celle qui, lorsque cela est possible, est privilégiée, en raison de sa haute spécificité, qui permet d'obtenir un niveau élevé de pureté, de l'ordre de 98-99% (Marichal-Gallardo and Álvarez, 2012). La purification résolutive a notamment pour but d'éliminer les contaminants liés au produit, c'est à dire les formes apparentées de la protéine : agrégats, protéines tronquées, mal repliées, mal glycosylées, qui sont les plus difficiles à séparer du produit d'intérêt.

Les préparations thérapeutiques contiennent les protéines d'intérêt, mais également divers autres produits pouvant jouer un rôle sur la stabilité de la substance active, ou modifier différentes caractéristiques du produit final. Cette étape, la formulation, consiste donc en l'ajout de divers excipients, la filtration du produit à travers des filtres de 0.22 μm , afin de générer un produit stérile, et éventuellement la lyophilisation du produit s'il doit être libéré sous cette forme. Le choix de la forme de la préparation (liquide ou lyophilisée) est dicté par la stabilité de la protéine en solution.

3. L'importance de la stabilité des protéines thérapeutiques

Bien que l'amélioration des techniques de purification ait rendu possible l'utilisation clinique des protéines recombinantes, un des enjeux majeurs du développement de protéines à usage thérapeutique est leur stabilité. En effet, une dénaturation ou une modification peut rendre la protéine moins active, voire inactive, mais également faire apparaître des épitopes potentiellement immunogènes. La stabilité des protéines peut être modifiée soit par des dégradations chimiques, soit par des changements de son état physique.

3.1 L'instabilité chimique

De nombreuses voies de dégradation chimique des protéines ont été mises en évidence. Elles peuvent avoir un impact plus ou moins prononcé sur l'activité de la protéine, en fonction du site où elles vont intervenir. La déamidation est l'une des voies majeures de dégradation chimique. Induite par différents facteurs tels que le pH, la température, ou la force ionique, elle implique l'hydrolyse des amides des chaînes latérales des Asparagines et Glutamines, avec la formation d'un intermédiaire succinimide. C'est un phénomène qui touche différents types de protéines, aussi bien les anticorps, que des protéines plus petites comme l'hormone de croissance (Manning et al., 2010). Il a notamment été montré que la déamidation de la chaîne légère du Trastuzumab (anticorps monoclonal dirigé contre la molécule HER2) de l'Asparagine 30 en acide aspartique réduisait l'activité de la protéine d'environ 30% (Harris et al., 2001). Le pH semble être un des éléments clés dans la déamidation induite par succinimidation. En effet, il a été montré une forte dépendance du pH sur la déamidation d'une Asparagine d'une IgG1, ce phénomène étant amplifié suite au stockage du produit à pH 7 (Zheng and Janis, 2006).

La dégradation induite par oxydation est l'autre voie de dégradation chimique majeure qui peut intervenir, et ce tout au long de la chaîne de production de la molécule, par exemple au cours des étapes de purification, de formulation, ou encore au cours du stockage de la protéine. Toute protéine contenant des Histidines, Méthionines, Cystéines, Tyrosines et Tryptophanes peut être endommagée suite à des réactions avec des espèces réactives de l'oxygène. Le degré d'oxydation d'une protéine est conditionné par des facteurs à la fois intrinsèques (la flexibilité du peptide, sa structure générale), et extrinsèques (le pH et le type de tampon, par exemple). On distingue l'oxydation site-spécifique de celle non-spécifique et qui inclut notamment la photo-oxydation (Manning et al., 2010).

Les autres modifications chimiques sont l'isomérisation des Asparagine et Acide aspartique, la β élimination touchant les résidus Cystéine, Serine, Thréonine et Phénylalanine et Lysine, la fragmentation par hydrolyse des liaisons fragiles Asp-X, Ser-X, Thr-X, et l'échange des ponts disulfure inter ou intra-chaines.

Enfin, la glycation des protéines intervient lorsqu'elles sont incubées en présence de sucres réducteurs, comme le glucose, lactose, fructose ou maltose, ce qui limite leur utilisation dans les formulations. Cependant, il a été montré que des sucres réducteurs pouvaient être formés *in situ*. Smales et collaborateurs ont notamment démontré que l'inactivation virale à haute température conduit à une hydrolyse du sucrose (Smales et al., 2002). Ce phénomène a également été observé au cours d'études sur le stockage des produits formulés avec du sucrose. La glycation peut avoir des effets opposés en fonction de la protéine et des sites impliqués. Ainsi, il a été montré qu'elle pouvait avoir un effet bénéfique sur la stabilité de certaines protéines (Flores-Fernández et al., 2010), ou au contraire, diminuer celle-ci. Par ailleurs, du fait de l'encombrement stérique qu'elle génère, la glycation peut diminuer voire inhiber l'activité de la protéine (Wang et al., 2014).

3.2 L'instabilité physique

L'instabilité physique d'une protéine correspond aux processus qui aboutissent à une modification de l'état son physique sans qu'il n'y ait de changement dans sa composition chimique. On retrouve quatre processus majeurs : la dénaturation, l'adsorption à une surface hydrophobe, l'agrégation et la précipitation.

La structure initiale de la protéine est appelée « état natif », et la dénaturation correspond à la perte de cette structure tridimensionnelle. La perte de structure peut être induite par différents facteurs, notamment la température élevée, qui semble être la cause majeure de la dénaturation des protéines. En général, la dénaturation par la chaleur est un phénomène irréversible, les protéines ainsi dépliées s'associant rapidement pour former des agrégats. A l'inverse, il est connu depuis 1961 que les protéines peuvent également se dénaturer à basse température. La congélation de l'eau va conduire à la concentration des protéines. Or, même en présence de stabilisateurs, comme les sucres, la température de transition à l'état de glace de ce concentré est nettement inférieure à -20°C . C'est-à-dire qu'une protéine aura la même mobilité en solution congelée à -20°C que dans à une solution liquide (Manning et al., 2010).

4 Les anticorps monoclonaux

4.1 Structure générale des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Les immunoglobulines sont composées de domaines constants (C), et de domaines variables (V). Ces domaines sont localisés au sein de 4 chaînes polypeptidiques, 2 chaînes lourdes (H, pour Heavy), et 2 chaînes légères (L pour Light), identiques entre elles, et reliées par des ponts disulfures. Les chaînes lourdes comprennent chacune 3 à 4 domaines constants (notés de C_H1 à C_H4), ainsi que 1 domaine variable (V_H). Les chaînes légères pour leur part comprennent 1 domaine constant (C_L), et un domaine variable (V_L). Un anticorps monomérique entier possède une masse d'environ 150 kDa, chaque chaîne lourde faisant environ 50 kDa, tandis que les chaînes légères possèdent elles une masse de 25 kDa. Cette association particulière aboutit à une structure en forme de « Y » qui est néanmoins mobile en solution. Différents types (ou isotypes) d'anticorps ont été mis en évidence, les IgG, IgA, IgE, IgM et IgD. Les isotypes diffèrent les uns des autres en terme de séquence et de structure, mais conservent tous, sous forme monomérique, cette forme en « Y » (Schroeder and Cavacini, 2010).

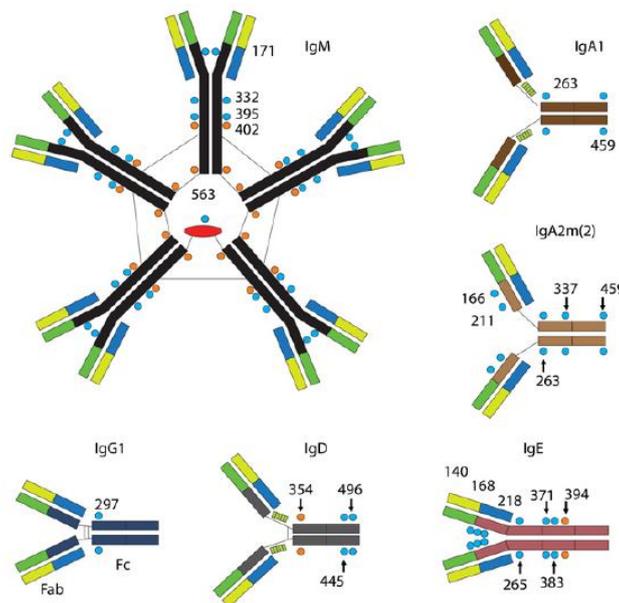


Figure 2: Structure des différents isotypes d'anticorps.

Les sites de glycosylation sont indiqués par la numérotation des acides aminés. D'après Schroeder et al., 2010

La partie variable des anticorps contient 6 régions hypervariables, les CDR (Complementarity Determining Regions), de 5 à 15 acides aminés formant des boucles entre des régions dites charpentes (FR pour Framework). Ces boucles, en formant des interactions non

covalentes, peuvent se rapprocher dans l'espace, et ainsi former le paratope, région responsable de l'interaction de l'anticorps avec un épitope spécifique. Les régions hypervariables sont propres à chaque anticorps, et la variabilité de séquence ainsi que l'organisation spatiale sont responsables de la spécificité d'un anticorps pour un épitope donné. Un anticorps possédant deux paratopes-un à chaque région variable- peut ainsi lier deux molécules d'antigène.

La partie constante, quant à elle, est caractérisée par une séquence en acides aminés proche d'un anticorps à l'autre au sein d'un même isotype. Cette région est peu voire pas impliquée dans la reconnaissance de l'antigène, elle est cependant nécessaire pour assurer les différentes fonctions effectrices de l'anticorps.

La structure des anticorps peut également être caractérisée par les fragments obtenus par clivage enzymatique. En effet, deux enzymes, la pepsine et la papaïne permettent de dissocier les différentes parties de l'anticorps. La papaïne va cliver la protéine juste en dessous de la région C_H1, libérant ainsi 2 fragments Fab (Fragment having the antigen binding site) du fragment Fc (Fragment cristallisable). La pepsine quant à elle clive l'anticorps au niveau des ponts disulfures présents dans la région charnière, libérant ainsi les Fab, reliés entre eux. Ce fragment est nommé F(ab)₂. La région charnière est déterminante dans la flexibilité de l'anticorps. Cela permet notamment à la protéine d'interagir avec l'antigène dans différents plans de l'espace.

4.2 Les modifications post-traductionnelles des anticorps

Le fragment Fc des immunoglobulines contient des résidus glucidiques. Le nombre et la position des glycosylations varient en fonction de l'isotype. Par exemple, les IgG présentent 2 N-glycosylations au niveau du domaine C_H2 sur l'asparagine 297 (Asn 297). Le motif de base est un heptamère qui se compose de N-acétylglucosamine et de mannose. A ce motif conservé peut s'ajouter un nombre variable de résidus fucose, sur le résidu N-acétylglucosamine, ou d'acides sialiques à son extrémité. Il a ainsi été montré que plus de 30 motifs différents pouvaient être produits sur la structure de base heptamérique (Parekh et al., 1985).

Les glycosylations de la région Fc jouent un rôle non seulement dans la stabilité structurale de la protéine mais également sur sa capacité à interagir avec les récepteurs FcγR. En effet, il a été montré qu'une absence de glycosylation abroge l'interaction de l'anticorps avec les FcγR. Par ailleurs, il est maintenant bien connu que la composition du motif oligosaccharidique influence également l'activité de l'anticorps. En effet, l'absence de fucosylation augmente les

capacités effectrices des IgG, comme l'ADCC, mais également la liaison au Fc γ RIII. Enfin, la présence de O-glycosylations dans la région charnière des IgA et IgD protège ces anticorps des protéases (Arnold et al., 2007).

4.3 Les différentes classes d'anticorps chez l'Homme

Cinq classes d'anticorps ont été identifiées chez l'Homme, selon leurs propriétés physicochimiques, leurs structures et leur concentration sérique : Les IgG, les IgE, les IgA, les IgM et les IgD. Il existe également 4 isotypes d'IgG : IgG₁, IgG₂, IgG₃, et IgG₄. Les IgG₃ ont une demi-vie réduite, de l'ordre de 7 jours, car elles ne se fixent pas sur le FcRn. Les autres isotypes, eux, ont une demi-vie bien supérieure, environ 21 jours, car leur affinité pour le FcRn prévient une dégradation rapide par les protéases sériques et permet un recyclage des molécules captées par les cellules endothéliales (Magdelaine-Beuzelin et al., 2009). Par ailleurs, les IgG₃ possèdent une région charnière beaucoup plus longue que les autres IgG (62 acides aminés contre 15 pour les IgG₁ et 12 pour les IgG₂ et IgG₄). Ceci rend les IgG₃ plus sensibles aux protéases que les autres IgG, en particulier à l'élastase humaine (Baicl et al., 1980). Actuellement, les anticorps thérapeutiques sur le marché sont donc des IgG₁, IgG₂ et IgG₄, afin de favoriser une demi-vie maximale.

Les IgG₁, IgG₂ et IgG₄ diffèrent dans leurs fonctions effectrices, pour la fixation des Fc γ R ou de leur capacité à lier le complément. Les IgG₁ sont capables de fixer tous les récepteurs Fc γ R ainsi que le complément, se dotant ainsi de capacités effectrices supérieures aux autres isotypes. En effet, les IgG₂ et IgG₄ fixent peu ou pas les Fc γ R et le complément, leurs fonctions effectrices sont donc réduites. Ceci peut s'avérer être un avantage dans le cas par exemple de maladies inflammatoires, où une activation des cellules immunitaires (NK, DC) par les Fc γ R n'est pas souhaitée, celle-ci pouvant notamment entraîner une production de cytokines. C'est pourquoi l'utilisation d'IgG₂ ou IgG₄ présente un intérêt certain. Cependant les IgG₄ présentent une instabilité dans la région charnière qui aboutit à la production de demi-anticorps, pouvant représenter entre 10 et 30% du total. Ces demi-anticorps peuvent notamment échanger leur fragment Fab avec les IgG₄ endogènes (Labrijn et al., 2009). Le développement d'IgG₂ thérapeutiques peut également être problématique, ces anticorps présentant des réarrangements des ponts disulfide, ce qui conduit à la formation de dimères ou d'isomères. L'IgG₁ constitue donc la majorité des anticorps développés à des fins thérapeutiques. L'ingénierie des protéines a rendu possible la modification des anticorps, notamment l'optimisation des fonctions effectrices.

4.4 Le développement des anticorps thérapeutiques

La découverte des plasmocytes comme source d'anticorps en 1948 par Astrid Fagraeus, puis le développement de la technique d'hybridome par Milstein et Köhler en 1975 (Kohler and Milstein, 1975) ont aboutit à l'essor des anticorps dans l'arsenal thérapeutique. Le premier anticorps monoclonal thérapeutique à avoir été accepté par la FDA (Food and Drug Administration) est le muromonab (OKT3) en 1986, un anticorps dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T (Cosimi et al., 1981). Bien qu'efficace pour limiter les réactions inflammatoires impliquées dans les rejets de greffe, l'apparition d'effets secondaires importants a mis un frein au développement d'anticorps thérapeutiques murins. Parmi ces effets, le développement chez les patients d'anticorps dirigés contre celui administré (HAMA, pour human anti-murine antibody), neutralisant l'effet thérapeutique (Schroff et al., 1985). Ces limites ont conduit au développement de nouvelles générations d'anticorps.

4.4.1 Les différentes générations d'anticorps

Les anticorps murins furent les premiers anticorps thérapeutiques développés. Les importants effets secondaires associés font qu'ils sont aujourd'hui les moins nombreux sur le marché, avec 5 produits autorisés.

Une nouvelle génération d'anticorps, présentant à la fois des séquences murines et humaines, fait rapidement son apparition au cours des années 1980 (Boulianne et al., 1984). Le premier anticorps dit chimérique, l'Abciximab (Réopro®) arrive sur le marché en 1994. Depuis, 8 anticorps chimériques ont été approuvés et ont obtenu une autorisation de mise sur les marchés européens et américains (Ecker et al., 2015). Ce développement a été rendu possible par les progrès de la biologie moléculaire dans les années 1980, et qui ont notamment permis de cloner les gènes codant pour les immunoglobulines. Ainsi, les régions variables et hypervariables des anticorps thérapeutiques murins ont pu être isolées, clonées et greffées sur des régions constantes d'immunoglobulines humaines (Orlandi et al., 1989). Par ailleurs, cela a permis l'utilisation de diverses lignées cellulaires pour la production, en remplacement des hybridomes. Le principal intérêt de ces anticorps résidait dans la possible réduction de l'immunogénicité par rapport aux anticorps murins. Cependant, il a rapidement été montré que les patients traités

avec ces nouveaux produits développaient tout de même des réponses dirigées contre ces anticorps (Hwang and Foote, 2005).

En 1986, un nouveau type d'anticorps fait son apparition, les anticorps humanisés. Ils sont produits à partir de la forme chimérique d'un anticorps, en greffant les régions variables murines autour des régions hypervariables humaines formant le paratope. Ainsi, ces anticorps ne présentent que 10% de séquence murine (Jones et al., 1986). L'humanisation des anticorps est un procédé lourd, sans garantie de résultat. La greffe des régions variables humaines autour des CDRs murines résulte souvent en un anticorps de mauvaise affinité et de faible spécificité pour la cible. Il est donc nécessaire d'apporter des modifications supplémentaires, comme des mutations ponctuelles dans les CDR ou dans les régions « framework » (Fr) afin de restaurer les propriétés de l'équivalent murin initial (Wu et al., 1999). Malgré ces difficultés d'ingénierie, les anticorps humanisés représentent la classe la plus utilisée à l'heure actuelle, avec 17 molécules sur les marchés européen et américain (Ecker et al., 2015).

La présence de réactions immunes contre les anticorps humanisés a conduit au développement d'anticorps complètement humains, afin de les rendre « invisibles » vis-à-vis du système immunitaire (figure 3). Différentes technologies ont été développées pour ce faire : une approche cellulaire, utilisant des lymphocytes B humains, une approche dite de phage display, avec la création de banques de fragments variables d'anticorps, et enfin une approche génétique impliquant des souris transgéniques pour les gènes codant les immunoglobulines humaines (Ducancel and Muller, 2012).

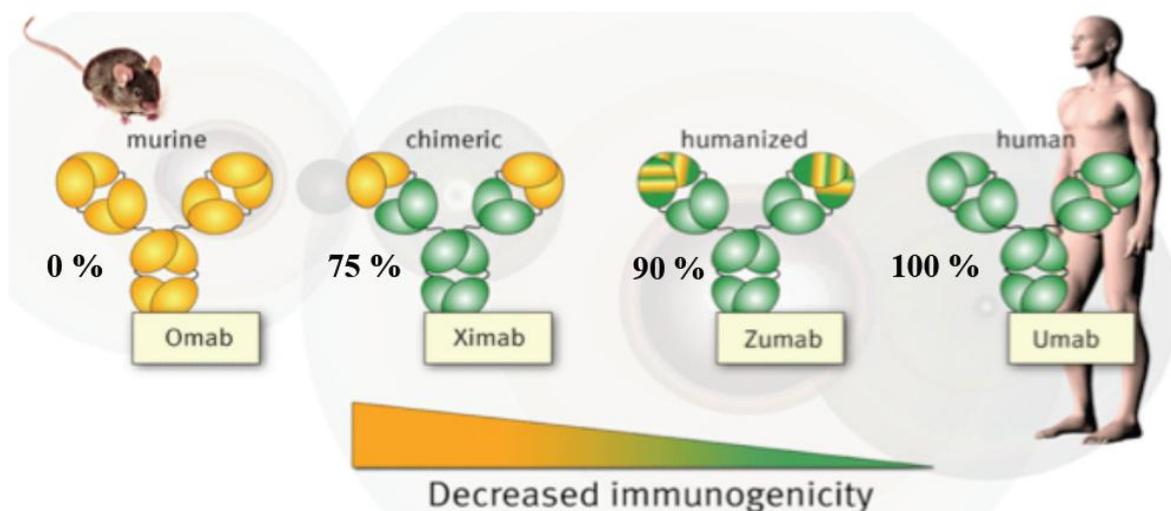


Figure 3: Les différentes générations d'anticorps.

Source : Joost Bakker, Genmab

4.4.2 Optimisation des anticorps pour leur emploi en thérapeutique

Réduire le développement des réponses immunes contre les anticorps monoclonaux thérapeutiques reste une des préoccupations majeures dans le développement de molécules plus efficaces et plus sûres. Mais un autre aspect important est l'optimisation de ces anticorps, à savoir améliorer leurs propriétés fonctionnelles et/ou biochimiques. Ceci consiste à optimiser l'affinité et la spécificité pour l'antigène, les fonctions effectrices, mais également d'améliorer leur pharmacocinétique et leur biodistribution. Ces différentes caractéristiques peuvent être modifiées en jouant sur l'architecture de l'anticorps, au niveau des CDR, en changeant l'isotype ou en modifiant les motifs de glycosylation de la région Fc, mais également en modifiant le format de l'anticorps (à savoir sa taille, sa valence, la conjugaison à d'autres molécules, ou en le rendant multispécifique). Ces anticorps sont pour la plupart encore en phase de développement ou en phase clinique précoce. Néanmoins, quelques-uns sont déjà sur le marché, comme le brentuximab vedotin (un immunoconjugué composé d'un anticorps anti-CD30 couplé à la monométhyl auristatine E, un poison du fuseau mitotique), ou le catumaxomab, un anticorps bispécifique issu d'une fusion de deux hybridomes, l'un de souris, et l'autre de rat.

Un récapitulatif des anticorps autorisés en 2015 par les agences de santé européenne et américaine est présenté dans le tableau 2.

Dénomination internationale	Nom commercial	Cible/type d'Ac	Indication première	Année d'autorisation aux Etats-Unis	Année d'autorisation en Europe
Dinutuximab	Unituxin	GD2, IgG1 chimérique	Neuroblastome	En attente de décision	2015
Secukinumab	Cosentyx	IL17Aa, IgG1 humaine	Psoriasis	2015	2015
Nivolumab	Opdivo	PD1, IgG4 humaine	Mélanome	En attente de décision	2015
Blinotumomab	Blinicyto	CD19, CD3, scFv murin bispécifique	Leucémie lymphoblastique aigüe	En révision	2014
Pembrolizumab	Keytruda	PD1, IgG4 humanisée	Mélanome	En attente de décision	2014
Ramucirumab	Cyramza	VEGFR2, IgG1 humaine	Cancer gastrique	2014	2014
Vedolizumab	Entyvio	Intégrine $\alpha4\beta7$, IgG1 humanisée	Colite, maladie de Crohn	2014	2014

Introduction : Les protéines thérapeutiques, généralités

Siltuximab	Sylvant	IL-6, IgG1 chimérique	Maladie de Castelman	2014	2014
Obinutuzumab	Gazyva	CD20, IgG1 humanisée	Leucémie lymphoïde chronique	2014	2013
Ado-trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2, IgG1 humaine, immunoconjugué	Cancer du sein	2013	2013
Raxibacumab	/	B anthraxis, IgG1 humaine	Anthrax	/	2012
Pertuzumab	Perjeta	HER2, IgG1 humanisée	Cancer du sein	2013	2012
Brentuximab vedotin	Adcetris	CD30, IgG1 chimérique, immunoconjugué	Lymphome Hodgkinien, Lymphome à larges cellules	2012	2011
Belimumab	Benlysta	BLys, IgG1 humaine	Lupus érythromateux disséminé	2011	2011
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4, IgG1 humaine	Mélanome métastatique	2011	2011
Denosumab	Proliz	RANK-L, IgG2 humaine	Perte osseuse	2010	2010
Tocilizumab	Actemra	IL-6R, IgG1 humanisée	Arthrite rhumatoïde	2009	2010
Ofatumumab	Arzerra	Cd20, IgG1 humaine	Leucémie chronique	2010	2009
Canakinumab	Ilaris	IL-1 β , IgG1 humaine	Syndrome de Muckle-Wells	2009	2009
Golimumab	Simponi	TNF, IgG1 humaine	Arthrite rhumatoïde et psoriasique, spondylarthrite ankylosante	2009	2009
Ustekinumab	Stelara	IL-12/23, IgG1 humaine	Psoriasis	2009	2009
Certolizumab pegol	Cimzia	TNF, Fab humanisé, pégylé	Maladie de Crohn	2009	2008
Catumaxomab	Removab	EPCAM/CD3, Anticorps bispécifique Rat/souris	Ascite maligne	2009	/
Eculizumab	Soliris	C5, IgG2/4 humanisée	Hémoglobulinurie paroxystique nocturne	2007	2007
Rabinizumab	Lucentis	VEGF, Fab humanisé	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	2007	2006
Panitumumab	Vectibix	EGFR, IgG2 humaine	Cancer colorectal	2007	2006
Natalizumab	Tysabri	Intégrine α 4, IgG4 humanisée	Sclérose en plaque	2006	2004

Introduction : Les protéines thérapeutiques, généralités

Bevacizumab	Avastin	VEGF, IgG1 humanisée	Cancer colorectal	2005	2004
Cetuximab	Erbix	EGFR, IgG1 chimérique	Cancer colorectal	2004	2004
Efalizumab	Raptiva	CD11a, IgG1 humanisée	Psoriasis	2004#	2003#
Omalizumab	Xolair	IgE, IgG1 humanisée	Asthme	2005	2003
Tositumomab-1131	Bexxar	CD20, IgG2a murine	Lymphome non-Hodgkinien	/	2003
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20, IgG1 murine	Lymphome non-Hodgkinien	2004	2002
Adalimumab	Humira	TNF, IgG1 humaine	Arthrite rhumatoïde	2003	2002
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H, Lemtrada	CD52, IgG1 humanisée	Leucémie myéloïde chronique#, Sclérose en plaque	2001#, 2013	2001#, 2014
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Cd33, IgG4 humanisée	Leucémie myéloïde aigüe	/	2000#
Trastuzumab	Herceptin	HER2, IgG1 humanisée	Cancer du sein	2000	1998
Infliximab	Remicade	TNF, IgG1 chimérique	Maladie de Crohn	1999	1998
Palivizumab	Synagis	RSV, IgG1 humanisée	Prévention des infections respiratoires par le virus syncytal	1999	1998
Basiliximab	Simulect	IL-2R, IgG1 chimérique	Prévention du rejet de greffe de rein	1998	1998
Daclizumab	Zenapax, Zinbryta	IL-2R, IgG1 humanisée	Prévention du rejet de greffe de rein, sclérose en plaque	1999#, en révision	1997#, en révision
Rituximab	Mabthera, Rituxan	CD20, IgG1 chimérique	Lymphome non-Hodgkinien	1998	1997
Abciximab	Reopro	GPIIb/IIIaa, Fab d'IgG1 chimérique	Prévention des caillots de sang dans l'angioplastie	1995	1994
Muromonab-CD3	Orthoclone Okt3	CD3, IgG2a murine	Rejet de greffe de rein	1986	1986#

Tableau 2: Anticorps monoclonaux thérapeutiques approuvés en Europe et/ou aux Etats-Unis en Mai 2015.

#: Retiré du marché, ou vente arrêtée pour l'indication première, d'après Janice M. Reichert, PhD, Reichert Biotechnology Consulting LLC

1. Modalités de l'administration des protéines thérapeutiques

Les peptides et protéines, à l'inverse des petites molécules, ne sont généralement pas actifs après administration orale. Ceci est principalement dû à deux facteurs : la haute activité enzymatique gastro-intestinale, et la faible perméabilité de la muqueuse.

La plupart des protéines thérapeutiques sont donc formulées pour être injectées par voie parentérale. Les trois voies majeures d'administration sont la voie intraveineuse (IV), la voie sous-cutanée (SC) et la voie intramusculaire (IM).

L'injection IV constitue la principale voie d'administration des anticorps thérapeutiques. Celle-ci permet une biodisponibilité totale ainsi qu'une distribution rapide du produit. Enfin, contrairement aux autres voies, elle permet l'injection de grands volumes de produit. Cependant, cette voie nécessite souvent une hospitalisation, ce qui a pour effet d'augmenter de manière significative le coût du traitement.

L'administration par voie SC libère le produit dans l'espace interstitiel de l'hypoderme, appelé également tissu sous-cutané. L'hypoderme se situe entre la peau et l'aponévrose musculaire. Après injection, la protéine peut être transportée jusqu'à la circulation systémique selon deux voies, en fonction de sa masse moléculaire. Généralement, les peptides et les petites protéines (de MM inférieure à 1 kDa) quittent le site d'injection par les vaisseaux sanguins. Les protéines de poids moléculaire supérieur à 16 kDa sont en revanche absorbées par le système lymphatique (Tang et al., 2004). Le site d'injection SC peut s'avérer déterminant pour l'absorption lymphatique ainsi que pour la prise en charge de la protéine par les organes lymphoïdes. Ainsi chez l'Homme, il a été observé notamment pour l'hormone de croissance humaine ou l'insuline (Beshyah et al., 1991; ter Braak et al., 1996), une différence des taux d'absorption des produits après des injections SC à différents sites. La concentration maximale de protéine retrouvée dans le sérum suite à une injection SC est variable d'un produit à l'autre. L'un des avantages majeurs de cette voie d'injection réside dans le fait que les patients peuvent s'auto-administrer le produit, réduisant ainsi de manière significative le coût du traitement.

L'une des difficultés dans la détermination des voies d'injection est de déterminer la biodisponibilité du produit. Celle-ci peut varier entre les espèces, il est donc difficile de transposer les résultats obtenus dans un modèle animal à l'Homme. Par ailleurs, cette biodisponibilité est très variable, et peut s'avérer faible, selon la protéine étudiée (Vugmeyster, 2012). Une biodisponibilité diminuée peut en partie être attribuée à la dégradation ou la métabolisation de la protéine au site d'injection. La dégradation au point d'injection a notamment été suggérée pour diverses protéines, comme l'hormone de croissance ou

l'érythropoïétine (Porter and Charman, 2000). Un autre point important qui va déterminer la voie d'injection de la protéine thérapeutique est la pharmacocinétique de celle-ci. En effet, une injection par voie IV va induire une augmentation soudaine et importante de la concentration plasmatique de la protéine thérapeutique. A l'inverse, une injection SC va conduire à une augmentation progressive de la concentration plasmatique, la concentration maximale (C_{max}) de la protéine thérapeutique étant atteinte dans les heures suivant l'injection pour les petites protéines, tandis qu'il faudra plusieurs jours, dans le cas des protéines plus volumineuses (comme les anticorps) pour atteindre cette C_{max}. Cette diffusion plus lente du produit peut s'avérer intéressante dans les cas où l'on recherche un effet prolongé. Ceci permet notamment de réduire les fréquences d'injection, ce qui peut représenter un gain économique, ainsi qu'un gain de confort pour les patients. Dans d'autres cas, une protéine peut avoir des effets différents en fonction de sa concentration. C'est par exemple le cas de la leuproréline, un analogue de la GnRH (Gonadotrophine Releasing Hormone). En effet, ce peptide est indiqué dans les cas de cancer de la prostate, où une diminution de la sécrétion gonadotrope est recherchée. Or, il est connu que la GnRH, à forte concentration stimule la sécrétion de la FSH et de la LH, tandis qu'à faible concentration, elle a un effet régulateur négatif. Dans le but d'éviter les pics de concentration de leuproréline, qui auraient un effet opposé à celui recherché, la voie SC est préconisée dans le traitement du cancer de la prostate (Periti et al., 2002).

2. L'hormone de croissance

L'hormone de croissance humaine (GH, pour growth hormone), ou Somatropine, est une protéine essentielle pour la croissance et le développement. La GH est impliquée dans diverses voies métaboliques, comme la lipolyse, la stimulation de la synthèse protéique et l'inhibition du métabolisme du glucose. Elle fut isolée et identifiée pour la première fois à la fin des années 1950, à partir d'extraits d'hypophyse prélevés sur des cadavres ou chez des patients ayant subi une hypophysectomie. La première utilisation clinique de la GH remonte à 1957, avec le traitement d'enfants souffrant d'hypopituitarisme, soit une diminution de la sécrétion des hormones sécrétées normalement par l'hypophyse, dont fait partie la GH. Entre 1957 et 1985, les études cliniques utilisèrent principalement la GH extraite de l'hypophyse. La séquence codante de la protéine fut pour la première fois isolée en 1979, et la première utilisation de la GH recombinante date de 1982. L'utilisation de cette nouvelle source de GH a été privilégiée suite à l'apparition de nombreux cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob, une pathologie neurodégénérative fatale, chez les patients qui recevaient les préparations de GH dérivées

d'hypophyses contaminées par le prion. Ce risque de contamination des lots de GH d'extraction a conduit à leur retrait par la FDA sur les marchés américain et européen en 1985.

La forme majoritaire de la GH circulante est une protéine de 22 kDa non glycosylée. Composée de 191 acides aminés, elle présente 2 ponts disulfure, entre les acides aminés 53 et 165, et entre les acides aminés 182 et 189. Sa structure tridimensionnelle comprend 4 hélices alpha antiparallèles ainsi que 3 mini-hélices (figure 4).

La GH possède deux sites de fixation à son récepteur (site 1 et site 2), et peut ainsi lier deux récepteurs simultanément. L'interaction se déroule de la manière suivante : l'hormone interagit tout d'abord avec un premier récepteur via son site 1, établissant ainsi une interaction de forte affinité. La surface de liaison est composée d'une partie de l'hélice 1, et de la majeure partie de l'hélice 4. Le site 2 semble alors exposé, permettant ainsi d'établir une interaction cette fois de faible affinité avec un second récepteur (Kaabi, 2012).

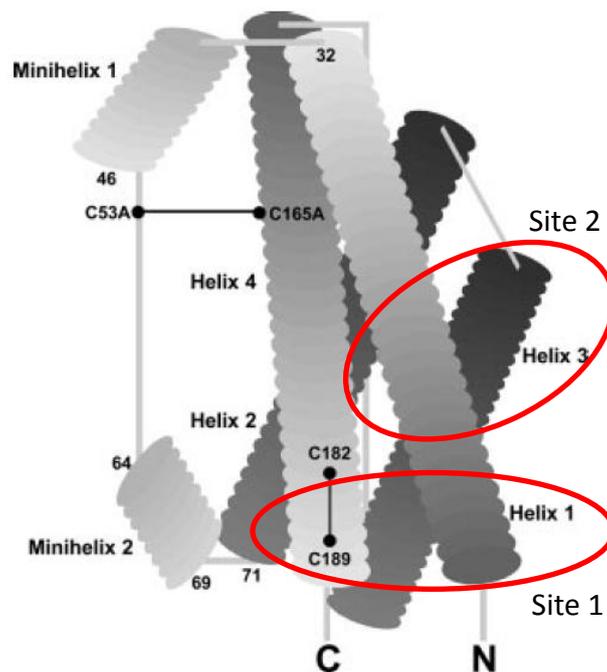


Figure 4: Structure tertiaire de l'hormone de croissance humaine.

Les deux sites de fixation de l'hormone de croissance à son récepteur sont indiqués en rouge. Modifiée d'après Iliev et al., 2005

L'hormone de croissance est sécrétée de manière pulsatile par les cellules somatotropes, situées dans l'hypophyse antérieure. Sa sécrétion change au cours du développement. Sa production est maximale au cours de la gestation et de la puberté, puis elle décline au cours de

l'âge, d'environ 10-15% toutes les décennies entre 20 et 70 ans. La sécrétion de GH varie également en fonction du sexe, de l'activité physique, l'obésité, et dans de nombreuses pathologies. La GH endogène est sécrétée sous forme de « bursts » sur une période de 24h, avec des variations dans les fréquences, l'amplitude et la durée. Entre ces périodes de « burst », peu de GH est détectable dans le sang. La concentration plasmatique maximale de GH endogène est observée au cours de la nuit, lorsque les bursts sont les plus importants et les plus fréquents, et est d'environ 10-30 ng/mL. La GH stimule la croissance du cartilage et de l'os de manière directe via le récepteur à la GH, ou de manière indirecte via l'augmentation locale d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1). Les actions métaboliques qui peuvent être directement contrôlées par la GH incluent l'augmentation de la concentration de glucose circulant ou encore l'augmentation brutale de la concentration d'acides gras circulants. De nombreux effets de la GH semblent être indirects, médiés par l'augmentation locale d'IGF-1, comme l'augmentation de la synthèse protéique du muscle, la croissance des muscles squelettiques, ou encore la modulation de certaines fonctions des lymphocytes T (Crommelin et al., 2013).

Le récepteur de l'hormone de croissance (GHR) est un membre de la famille des récepteurs de cytokine hématopoïétique. Il est trouvé dans la plupart des tissus humains, cependant il est exprimé majoritairement sur les hépatocytes. Jusqu'à 50% de la GH circulante est liée à une ou deux protéines de liaison, les GHBP (GH binding protein). Ces protéines maintiennent la GH dans la circulation sanguine, en agissant comme compétiteur pour l'interaction de l'hormone avec son récepteur, car elles présentent une séquence identique au domaine de liaison présent sur le récepteur (Fisker, 2006). L'activation du récepteur par la GH nécessite la dimérisation de deux molécules de récepteur pour une molécule de GH. A faible concentration, l'hormone fixe d'abord une molécule de récepteur via son site de liaison n°1, avant que le second site n'interagisse avec une seconde molécule de récepteur. Une concentration élevée de GH circulante va induire l'interaction d'une molécule de GH par molécule de récepteur, mais empêche ainsi la dimérisation de ce dernier et son activation (Wells, 1996).

Suite à sa dimérisation, le GHR induit l'activation de JAK2, membre de la famille des Janus tyrosine kinases. Celle-ci va phosphoryler notamment le GHR sur différents résidus Tyrosine, permettant ainsi une fixation de STAT1, STAT3 et STAT5 (Signal of Transducers and Activators of Transcription) sur celui-ci. Les STATs seront alors à son tour activés par phosphorylation via JAK2. Ils vont alors migrer au noyau, où ils induiront la transcription de différents gènes, tels que *c-fos*, induits par un hétéro ou homodimère STAT1/STAT3 (Carter-Su et al., 1996, 2015). La signalisation médiée par le GHR peut également conduire à une activation de la mitogen activated protein kinase (MAPK) ERK (Extracellular Regulated Kinase), impliquée dans la

régulation de la croissance et/ou la différenciation cellulaire, et notamment l'expression de *c-fos* et *c-jun* (Carter-Su et al., 2015).

Plusieurs spécialités de GH ont été développées au cours des années, les spécialités disponibles en France sont répertoriées dans le tableau 3. La plupart ont été produites en système bactérien (*E. Coli*), mais quelques-unes ont été développées chez la levure (*S. Cerevisiae*) ou en cellules de mammifères (cellules murines C127). La GH produite chez *E. Coli* peut contenir un résidu méthionine en N-terminal. La séquence naturelle de la GH humaine est alors obtenue par clivage enzymatique de cette méthionine durant le procédé de purification, ou en induisant la sécrétion de la GH dans le périplasma bactérien où le peptide signal est éliminé par la cellule, et la partie N-terminale naturelle de la protéine est révélée. La GH peut être produite dans le périplasma soit sous forme soluble et correctement repliée, soit dans des corps d'inclusion, nécessitant ainsi l'extraction, la dénaturation puis le repliement de la protéine. La GH est libérée de la bactérie par choc osmotique si la protéine est produite dans le périplasma ou par lyse mécanique si elle est produite dans le cytoplasme. La GH synthétisée en cellules de mammifère ou en levures est transportée à travers le réticulum endoplasmique et sécrétée directement dans le milieu de culture.

Source	Nom commercial	Forme du produit
Bactérie (<i>E. Coli</i>)	Zomacton®	Poudre lyophilisée
	Nutropinaq®	Liquide
	Omnitrope®	Poudre lyophilisée
	Genotonorm®	Poudre lyophilisée
	Umatrope®	Poudre lyophilisée
	Norditropine®	Liquide
Cellules de mammifère (Cellules murines C127)	Saizen®	Poudre lyophilisée

Tableau 3: Spécialités d'hormone de croissance autorisées en France

Les doses ainsi que la voie d'administration à utiliser pour l'injection de GH exogène furent établies avec la GH dérivée de l'hypophyse, chez des patients déficients. Initialement, cette GH était administrée trois fois par semaine, par injection intramusculaire (IM). Il fut démontré par la suite qu'une injection quotidienne par voie sous-cutanée (SC) avait également un effet bénéfique sur la croissance des patients par rapport à la voie IM (Hansen, 2002). Actuellement, la GH est donc administrée quotidiennement, par voie SC, souvent de manière autonome par les

patients. L'utilisation de la GH recombinante cible généralement deux axes majeurs de son action biologique : la promotion d'une croissance linéaire chez l'enfant et la modulation du métabolisme.

La GH peut être utilisée aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte, selon des indications différentes :

Chez l'enfant

- L'indication majeure de la GH recombinante est le remplacement à long terme de la GH endogène chez des enfants présentant des défauts de croissance dus à un déficit de sécrétion de l'hormone. Les doses habituellement utilisées varient entre 0,08 et 0,35 mg/kg/semaine, administrées quotidiennement par voie SC chez l'enfant pré-pubère. Des doses allant jusqu'à 0,7 mg/kg/semaine sont utilisées chez les adolescents. Ce traitement conduit à une augmentation de la vitesse de croissance, et peut conduire à une augmentation de la taille adulte finale (Hintz et al., 1999). La thérapie chez l'enfant est généralement continue, jusqu'à ce que la croissance soit achevée, déterminée par la fusion de l'épiphyse (extrémité des os longs). Les spécialités utilisées sont Genotonorm®, Saizen®, Zomacton®, Nutropinaq®, Omnitrope®, Umatrope®, Norditropine®.
- Une autre indication pour l'administration de GH est le syndrome de Turner, maladie observée chez les filles et causée par une perte partielle ou totale du chromosome X, qui est caractérisée par une croissance intra-utérine et post-natale diminuée, une faible taille à l'âge adulte, un développement incomplet des ovaires et des caractères sexuels secondaires, ainsi que d'autres anomalies physiques. Bien que les taux de GH circulantes ne soient pas particulièrement faibles dans cette pathologie, l'injection de GH recombinante (0,33-0,45 mg/kg/semaine) augmente de manière significative la croissance ainsi que la taille adulte finale. Sont utilisés : Genotonorm®, Zomacton®, Nutropinaq®, Saizen®, Omnitrope®, Umatrope®, Norditropine®.
- La GH recombinante est également indiquée dans le syndrome de Prader-Willi. Seuls Genotonorm®, Omnitrope® sont indiqués pour cette pathologie.
- Insuffisance rénale chez l'enfant. Dans ce cas, l'axe GH/IGF-1 semble être impliqué. Nutropinaq®, Saizen®, Omnitrope®, Umatrope®, Noritropine® peuvent être prescrits pour traiter cette pathologie.

Chez l'adulte

- La GH est utilisée en tant que traitement substitutif chez les patients présentant un déficit somatotrope sévère. Ce déficit peut être acquis dans l'enfance, ou à l'âge adulte, suite à une hypohysectomie. La GH est alors utilisée à des doses de 0,04-0,175 mg/kg/semaine. Les différentes spécialités utilisées sont Genotonorm®, Nutropinaq®, Saizen®, Omnitrope®, Umatrope®, Norditropine®.

3. Le Rituximab

Le Rituximab fut, sous le nom commercial de Rituxan®, en 1997 le premier anticorps monoclonal à être approuvé dans le traitement pour le traitement du lymphome B non Hodgkinien. Il s'agit d'un anticorps chimérique, de type IgG1, qui fixe l'antigène CD20, molécule exprimée à la surface des lymphocytes B (LyB). En Europe, une seconde spécialité du Rituximab est utilisée, le MabThera®.

Le Rituximab est actuellement utilisé aux Etats-Unis et en Europe dans les cas suivants :

- Traitement de lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH) de bas grade ou folliculaires à cellules B CD20-positives, et dans le cas de rechute ou de maladie réfractaire ; en traitement de première ligne dans les cas de LMNH à grandes cellules B CD20-positives, en combinaison avec une chimiothérapie ; en traitement des LMNH de faible grade chez les patients présentant une stabilisation de la maladie suite à une première chimiothérapie.
- En combinaison au méthotrexate pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde modérée ou sévère (European Medicines Agency, 2010).

Le Mabthera®, est utilisée en Europe dans les cas suivants :

- Traitement des LMNH agressif diffus à grandes cellules B CD20-positives, en association avec une chimiothérapie (cyclophosphamide doxorubicine, vincristine, prednisolone)
- Traitement de lymphomes folliculaires chimio-résistants, en monothérapie
- En association avec une chimiothérapie, il est également indiqué pour le traitement de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC).

Le marqueur CD20 est exprimé par toutes les cellules B normales, ainsi que par la plupart des cellules B malignes, sur lesquelles il est surexprimé. Cette molécule est impliquée dans l'initiation du cycle cellulaire et dans la différenciation, en activant les cellules B de la phase G0 à la phase G1 (Golay et al., 1985). Appartenant à la famille des protéines à quatre passages transmembranaires, il se trouve, sous forme tétramérique, associé au BCR dans les cellules B non stimulées (Polyak et al., 2008). Il contribue à l'entrée de calcium dans la cellule suite à l'activation du BCR (Li et al., 2003). Il se dissocie ensuite du BCR pour être internalisé (Polyak et al., 2008).

Le Rituximab induit la mort des cellules tumorales CD20 positives, par un mécanisme de lyse des cellules médiée par le complément (CDC, complement dependent cytotoxicity) ou par les cellules Natural Killer (NK) (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity). Il a par ailleurs été démontré que le Rituximab induisait une mort cellulaire par apoptose des LyB (Pérez-Callejo et al., 2015).

Les études de pharmacocinétique du Rituximab ont été effectuées chez des patients traités avec le Rituxan® pour des LMNH. Le produit était alors administré à une dose de 375 mg/m²/semaine, pendant quatre semaines. La demi-vie plasmatique du produit, initialement de 76.3 heures, atteignait à la fin de l'étude 205.8 heures. Cette augmentation semble être induite par la déplétion des cellules CD20⁺. Sans ligand à fixer, la clairance du produit serait ainsi diminuée. Ceci a été par la suite confirmé par une étude montrant qu'après huit semaines de traitement, la concentration maximale de Rituximab dans le sérum passait de 243 µg/mL à 550 µg/mL (Maloney et al., 1994).

La première autorisation d'utilisation de Mabthera® dans le traitement des LMNH a été obtenue en 1998. La dose recommandée est variable selon la pathologie. Pour le LMNH, la dose est de 375 mg/m², avec des fréquences d'injection variables en fonction du statut de la pathologie, 8 cycles d'injection tous les 21 jours dans le cas du lymphome diffus à grandes cellules B, ou tous les 2 mois dans le cas d'un lymphome folliculaire. Pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, la dose est de 1000 mg, injectée par voie IV, suivie d'une seconde injection deux semaines plus tard, à la même dose.

II. Le problème de l'agrégation dans les spécialités pharmaceutiques de protéines thérapeutiques

1. Définition

L'agrégation des protéines représente l'instabilité physique la plus commune, et s'avère être un problème majeur au cours de la formulation, le transport et la manipulation des produits à visée thérapeutique. Les protéines en solution ont tendance à s'agréger en réponse à des stress environnementaux survenant lors de ces différentes étapes. Un agrégat de protéine est défini comme une espèce protéique d'un poids moléculaire supérieur au monomère. L'agrégat est donc un terme universel regroupant toutes les espèces multimériques, du dimère à l'oligomère. Il existe plusieurs mécanismes d'agrégation, qui peuvent varier en fonction de la protéine, et modifier l'état final de l'agrégat obtenu. De nombreux facteurs contribuent à ce processus, qu'ils soient intrinsèques à la protéine ou extrinsèques, conduisant notamment à la perte d'activité biologique de la protéine, et potentiellement à son immunogénicité, que nous détaillerons plus loin.

Une caractéristique importante des agrégats est la façon dont les monomères sont associés. Des interactions non covalentes faibles aboutiront généralement à la formation d'agrégats réversibles, en équilibre avec la forme monomérique de la protéine. Ces agrégats peuvent être dissociés en diluant la solution, ou par un retour aux conditions physico-chimiques initiales si celles-ci ont été modifiées (changement de pH, température...). Les agrégats irréversibles correspondent quant à eux à des espèces de haut poids moléculaire, qui ne peuvent être dissociées rapidement par addition d'agents dénaturants ou réducteurs.

La conformation des protéines formant les agrégats peut avoir un impact dans le mécanisme de formation ces derniers. Une protéine en solution peut être en état de repliement correct - état natif - ou partiellement/totalement dépliée. L'état natif de la protéine fait référence à sa conformation où elle est active et non agrégée. Cette nomenclature peut être utilisée pour qualifier les agrégats, en se basant sur la structure du monomère qui compose la particule.

Dans un agrégat, une protéine peut subir des modifications chimiques, que ce soit par l'établissement de liaisons entre des acides aminés, ou par altération de résidus individuels. La formation de liaisons covalentes entre protéines est d'ailleurs un facteur important dans la

génération d'agrégats irréversibles. Ces liaisons sont généralement de type disulfure réductible, soit intermoléculaire ou intramoléculaire. D'autres liaisons chimiques covalentes non-réductibles peuvent être trouvées dans les agrégats, telles que les liaisons thioéther ou dityrosine.

La morphologie globale de l'agrégat peut quant à elle fournir des informations sur le mécanisme d'agrégation, et les différents types d'agrégats formés. On distingue en effet des structures fibrillaires ou globulaires. L'analyse des propriétés optiques des agrégats est également informative, dans la mesure où elle peut permettre de discriminer les agrégats d'autres particules non protéiques, les gouttes d'huiles de silicone ou encore les bulles d'air.

La grande diversité des agrégats retrouvés, et l'absence de nomenclature standardisée ont amené Narhi et collaborateurs à proposer une classification, que nous utiliserons par la suite, et résumée dans le tableau 4 (Narhi et al., 2012). Cette classification repose sur 5 catégories, la taille de l'agrégat, sa réversibilité, sa conformation, sa morphologie et enfin la présence de modifications des liaisons covalentes. Un agrégat peut être classé dans chaque catégorie de manière indépendante. Le critère le plus communément employé est la taille, mais les termes subjectifs tels que visible/subvisible ou soluble/insoluble ne permettent pas d'effectuer une classification comparable des agrégats. C'est pourquoi Narhi et collaborateurs ont suggéré que les particules visibles correspondent à un diamètre supérieur à 100 μm , les particules subvisibles à un diamètre compris entre 1 et 100 μm , tandis que les oligomères correspondent aux plus petites particules, avec un diamètre inférieur à 100 nm. Selon cette classification, les agrégats ayant une taille inférieure à 1000 nm sont dits solubles, et ceux supérieurs à cette taille sont considérés comme insolubles.

Critère	Classification
Taille	<100 nm; 100-1000 nm; 1-100 μm ; >100 μm
Réversibilité	Réversible; Irréversible; Dissociable
Structure Secondaire ou Tertiaire	Native; Partiellement Dénaturée; Dénaturée; Amyloïde
Modifications	Oxydation; Liaisons chimiques
Morphologie	Nombre de monomères; Morphologie Interne; Structure ; Propriétés optiques

Tableau 4: Classification des agrégats de protéines.

Par Narhi et al., 2012

2. Mécanismes de formation des agrégats

Les protéines s'agrègent selon différents mécanismes qui sont résumés dans la figure 6, en se basant sur la description de Wang et al (Wang et al., 2010a).

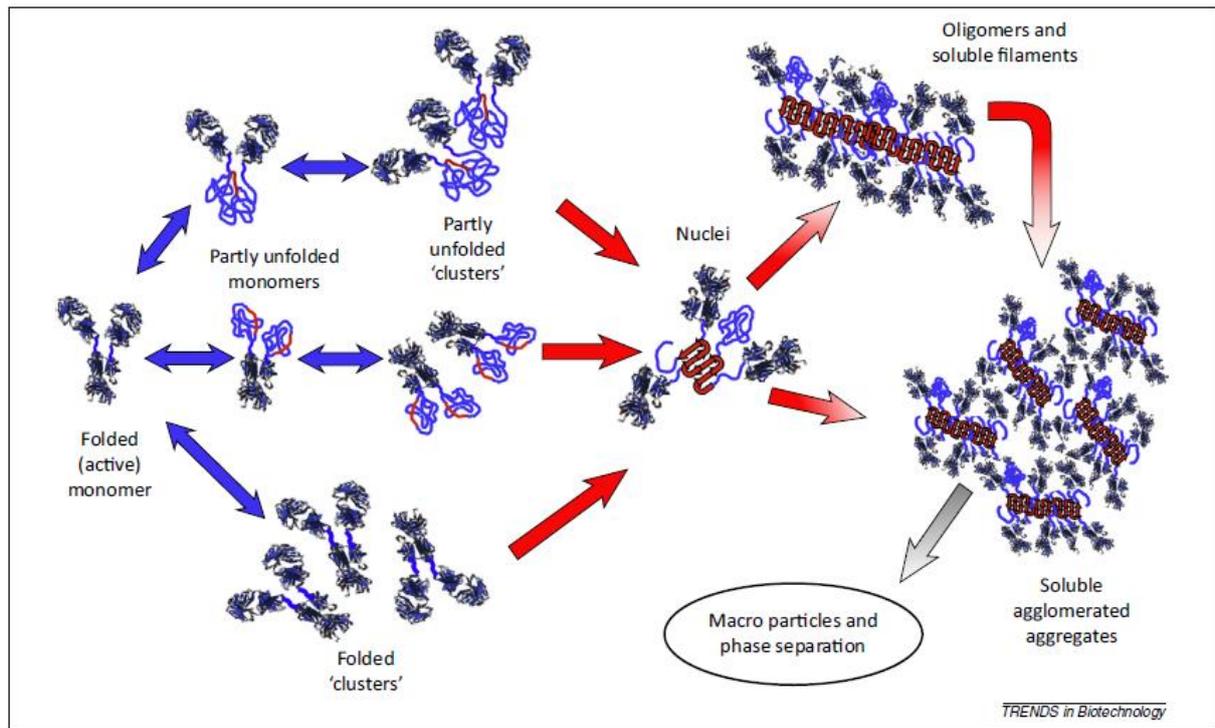


Figure 5: Mécanismes d'agrégation des protéines en solution.
Roberts et al., 2014

2.1 Intermédiaires partiellement ou totalement dénaturés

Les protéines en solution sont en équilibre permanent entre un état replié et partiellement déplié (ou état Intermédiaire), ces états étant également en équilibre avec la forme totalement dépliée ou dénaturée de la protéine. Les intermédiaires partiellement dépliés ont été décrits, dès 1954 comme les principaux précurseurs de l'agrégation. Cette observation a depuis été confirmée par d'autres études (Zhang et al., 2008). Les forces qui gouvernent le repliement d'une protéine sont aussi responsables des interactions entre les acides aminés de deux molécules voisines. On retrouve notamment les forces de van der Waals et l'attraction hydrophobe entre les chaînes latérales et le squelette, la maximisation des ponts hydrogènes permettant de stabiliser la protéine, la réduction de l'encombrement stérique ou des torsions énergétiquement

défavorables, la maximisation de l'entropie des chaînes latérales et l'optimisation des répulsions électrostatiques, et enfin la minimisation des interactions défavorables entre les acides aminés et le solvant (Roberts, 2014).

Les formes intermédiaires de la protéine offrent une plus grande flexibilité que la forme repliée et exposent plus leurs régions hydrophobes. Ces dernières vont interagir, induisant le repliement intrinsèque de la protéine. Cependant, si ces interactions se font entre 2 molécules différentes, il y aura formation d'un dimère, qui pourra éventuellement aboutir à la formation d'un oligomère, puis d'un agrégat qualifié de noyau initiateur. Les agrégats produits initialement sont solubles, mais l'association de plusieurs noyaux forment de plus gros agrégats qui deviennent insolubles lorsque leur taille devient trop importante, et finissent par précipiter. En revanche, une protéine totalement dépliée aura moins facilement tendance à s'agréger, ses régions hydrophobes étant pour la plupart enfouies, donc isolées du solvant (Uversky et al., 1999).

2.2 Auto-association

Certaines protéines peuvent spontanément s'agréger dans leur forme native, sans passer par un état intermédiaire dénaturé. Ceci est dû à des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes qui rapprochent plusieurs monomères natifs pour former un cluster. Il a notamment été montré que les fragments Fabs des anticorps contiennent des régions favorables à l'agrégation ou APR, pour Aggregation Prone Region, présentes dans les CDR (Wang et al., 2010b), directement impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. Cette même étude montre également la présence d'APR dans la région Fc, mais bien que proches de sites de liaison à diverses protéines (Fc récepteurs, FcRn, protéine A ou protéines G), ces APR ne semblent pas interférer sur les capacités d'interaction de l'anticorps avec ces ligands. Par ailleurs, il est également connu qu'une concentration protéique élevée va conduire ou accélérer la formation d'oligomères, et induire potentiellement la formation d'agrégats irréversibles plus larges (Wang, 2005). L'insuline est notamment connue pour s'agréger de cette manière (Pekar and Frank, 1972). A l'inverse, la dilution des protéines, en réduisant les interactions intermoléculaires, permet de dissoudre les petits oligomères formés (Saluja and Kalonia, 2008).

La glycosylation est une modification post-traductionnelle des protéines pouvant conduire au camouflage de régions hydrophobes. Mais l'utilisation de systèmes bactériens va conduire à la production de protéines non glycosylées, pouvant favoriser l'agrégation de ces protéines, comme cela a été montré pour l'IFN β . Il existe 2 types d'IFN β , produits dans 2

systèmes cellulaires différents. En effet, l'IFN- β 1a (commercialisé sous les noms d'Avonex® et de Rebif®) est produit en cellules CHO. Il présente ainsi un schéma de glycosylation similaire à l'IFN- β endogène humain. En revanche, l'IFN β 1b (Betaferon®) est produit chez *E. Coli* et est ainsi non glycosylé. Il a été montré que les préparations d'Avonex contenaient moins de 5% d'agrégats tandis que les préparations de Betaferon en contenaient environ 15% (Barnard et al., 2013). Cette observation a également été faite dans le cas des anticorps, où l'absence de N-glycosylation aboutit à la formation de dimères, avant de former des agrégats de plus haut poids moléculaire (Onitsuka et al., 2014).

2.3 Liaison chimique directe et dégradations chimiques

Comme vu précédemment, au cours des différentes étapes de production/ purification les protéines peuvent subir des dégradations chimiques, conduisant à un pontage entre les chaînes latérales des acides aminés, aboutissant ainsi à la formation d'agrégats. La réaction la plus commune est la formation ou l'échange intermoléculaire de ponts disulfures. Ce mécanisme fait principalement intervenir les Cystéines localisées à la surface de la protéine. Celles-ci peuvent être oxydées formant ainsi une liaison de type pont disulfure, ou initier des interactions disulfures inter-protéines par l'intermédiaire de groupements thiols. Ces interactions sont induites suite à la formation d'un groupement thiol ionisé, l'ionisation étant dépendante du pH de la solution. Même en absence de Cystéine libre, les protéines peuvent s'agréger par échange de ponts disulfures. Dans le cas de l'insuline notamment, il a été montré que des réactions de β -élimination pouvaient conduire à la formation de ponts disulfure inter-chaînes. Une étude a également montré une implication de Lysines dans le pontage de fragments Fc d'anticorps soumis à un stress thermique (Zhao et al., 2013).

Des mécanismes de dégradation tels que l'oxydation, la dimérisation, la déamidation, l'hydrolyse et la glycation ont également été décrits comme augmentant la capacité d'agrégation des protéines car les dégradations chimiques ont toujours un impact sur les propriétés physiques d'une protéine (structure secondaire et/ou tertiaire, hydrophobicité). L'oxydation des Méthionines peut notamment avoir un impact sur la conformation des régions Fc des anticorps (Zhang et al., 2014). L'addition d'atomes d'oxygène peut aboutir à la répulsion de résidus Méthionines initialement proches. Cette modification de la structure peut avoir pour conséquence une plus grande exposition de la région concernée au solvant, aboutissant à une plus grande sensibilité à l'agrégation.

L'exposition d'une protéine à la lumière peut également avoir des conséquences sur sa stabilité, par exemple en photolysant les ponts disulfures naturellement présents dans la

protéine. Ceci peut avoir pour conséquence un dépliement local de la protéine, et peut également promouvoir la formation de nouveaux ponts disulfures intermoléculaires, favorisant ainsi l'agrégation (Davies, 2003). Cette formation de néo-ponts disulfures a également été observée dans le cas du récepteur soluble du TNF- α : l'irradiation par les UV conduit à une oxydation des résidus Trp, formant ainsi des radicaux thiols, et promouvant la formation de ponts disulfures (Roy et al., 2009).

En conclusion, la cinétique d'agrégation semble être la suivante : un monomère présente des régions favorables à l'agrégation (soit de manière spontanée, comme dans le cas des anticorps, soit que la protéine se trouve dans un état partiellement déplié). Ce monomère est alors sous forme dite « active » pour l'agrégation. Ceci conduira ensuite à la formation de dimères, puis d'oligomères. Il peut alors y avoir formation soit d'agrégats dits amorphes, c'est-à-dire des agrégats ne présentant pas de structure amyloïde, soit la formation d'un noyau. Ce dernier se définit comme le plus petit agrégat irréversible. La formation de ce noyau est une étape relativement lente, qui va ensuite aboutir à une phase de croissance de l'agrégat qui sera plus rapide. Finalement, les protéines arriveront à un équilibre entre agrégats et monomères.

3. Formation des agrégats au cours de la production industrielle des protéines

La chaîne de production des protéines inclut de nombreuses étapes pouvant favoriser leur agrégation. La culture cellulaire est une étape particulièrement critique et favorable à ce phénomène. En effet, les agrégats peuvent représenter jusqu'à 30% de la quantité de protéines produites au cours de cette étape (Kramarczyk et al., 2008).

La phase d'augmentation de biomasse est la première étape de la production des protéines à l'échelle industrielle. Il a été montré qu'une production trop importante de protéines hétérologues par les cellules-hôte pouvait entraîner leur agrégation, l'accumulation des agrégats, et ainsi former des structures appelées corps d'inclusion chez *E. Coli* et agregosomes dans les systèmes eucaryotes (Kopito, 2000). Ce problème peut pour partie être corrigé, en isolant ces corps d'inclusion, et en resolubilisant les protéines agrégées dans des tampons contenant de l'urée et divers détergents tels que le SDS ou le chlorure de guanidium (Vallejo, Rinas, 2004). Cependant ce type de procédure est long, complexe, et ne garantit pas une bonne récupération de protéines natives et actives (Ventura and Villaverde, 2006). L'ajustement des conditions de culture (température, pH...) (Hao et al., 2007), l'utilisation de surfactants ou d'autres additifs

semblent efficaces dans l'inhibition de l'agrégation au cours de cette étape de fermentation/expression (Bahrami et al., 2009; Wang, 2005).

Au cours de la culture des cellules en bioréacteur, les protéines sécrétées directement dans le milieu vont être soumises à divers stress favorisant leur agrégation. Une répartition homogène des nutriments et des cellules est nécessaire. Parmi les bio-réacteurs utilisés, le stirred-tank utilise un système de pales pour assurer l'homogénéisation des cultures. Ces pales peuvent induire des forces de cisaillement et d'agitation. D'autre part, les protéines peuvent rester plusieurs jours dans le milieu de culture, en attendant qu'une quantité suffisante soit produite. Les protéines déjà produites vont alors être soumises aux variations de pH du milieu. On pourra également observer une accumulation de métabolites secondaires, produits par les cellules, et notamment de l'acide lactique. Ces phénomènes peuvent aboutir à la dénaturation des protéines, les rendant ainsi plus promptes à l'agrégation. La température de culture est également un élément pouvant affecter leur stabilité. Il a d'ailleurs été montré que la conservation d'un anticorps monoclonal dans un milieu de culture à 37°C favorisait son agrégation (Cromwell et al., 2006). Ainsi, dès la phase de production, les protéines sont soumises à différents stress pouvant altérer leur structure. Néanmoins, les agrégats formés durant cette étape vont pouvoir être éliminés au cours du procédé de purification.

La purification est une étape clé dans le procédé de fabrication d'une protéine thérapeutique, et permet d'obtenir un niveau de pureté très poussé tout en conservant une activité optimale de la protéine. Cependant, ce procédé peut induire la formation d'agrégats, notamment à cause des nombreuses étapes qui le constituent, par exemple l'utilisation d'un pH acide (entre pH1 et pH3) au cours de l'élution des protéines après passage sur une colonne de chromatographie d'affinité (Shukla et al., 2007). Le pH détermine le type et la distribution des charges de surface de la protéine, qui affectent non seulement les interactions permettant son repliement, mais également les interactions protéine-protéine. A pH extrême, très éloignés du point isoélectrique, les protéines sont fortement chargées. La densité de charges de surface va grandement accroître la répulsion intramoléculaire, ainsi que les interactions intermolécules, conduisant ainsi au moins à une perte partielle de structure. Théoriquement, la solubilité d'une protéine est minimale à un pH proche de son point isoélectrique (pI). En effet, la charge de surface de la protéine étant nulle, les répulsions charge-charge sont minimales, favorisant ainsi les interactions intermolécules. Ainsi à pH3, retrouvé fréquemment au cours des procédés de purification, l'insuline subit une perte importante de structure secondaire, ce qui favorise son oligomérisation (Nielsen et al., 2001).

L'homogénéisation des protéines est une étape importante au cours de la purification. Elle est particulièrement critique dans les étapes où des solutions sont ajoutées pour ajuster notamment le pH. Cette homogénéisation est induite par mélange, ou « stirring », au cours duquel les protéines peuvent se retrouver à l'interface air/liquide, favorable à leur agrégation. En plus du mélange modéré, les préparations de protéine peuvent être soumises à des forces d'agitation plus violentes, ou « shaking », qui sont accidentelles. Ces deux types de forces génèrent des agrégats de types et tailles différents (Kiese et al., 2008). Notamment, le « stirring » tend à former des agrégats insolubles, tandis que le « shaking » génère principalement des agrégats solubles (Kiese et al., 2008).

L'ultrafiltration (UF) est une méthode grandement utilisée pour la formulation des protéines. Elle est utilisée pour modifier le tampon d'une protéine et augmenter sa concentration. Au cours de l'UF, les protéines sont également soumises à des stress mécaniques, comme des stress de pompage, le procédé typique nécessitant 50 passages à travers la pompe (Vázquez-Rey and Lang, 2011). Le passage à répétition au travers de la valve va conduire à la formation de bulles d'air et de cavitations. La cavitation correspond à la formation rapide de vides ou de bulles dans le liquide qui vont rapidement se résorber, ce qui génère une onde de choc, des turbulences, ainsi qu'une augmentation locale et transitoire de température. Ceci peut ainsi conduire à la formation de radicaux libres, favorisant la formation d'agrégats. Par ailleurs, la création ou l'augmentation de l'interface air/eau semble particulièrement propice la formation d'agrégats. La propriété hydrophobe de l'air induit un alignement des protéines à l'interface, maximisant ainsi l'exposition de résidus hydrophobes. Ces réarrangements concentrés à l'interface peuvent conduire à des interactions hydrophobes et au dépliement des protéines. La proximité moléculaire à l'interface augmente la possibilité d'interactions protéine-protéine conduisant ainsi à l'agrégation (Carpenter et al., 1999).

Le maintien de la stabilité et de l'activité d'une protéine est crucial. C'est pourquoi des étapes de congélation sont nécessaires au cours de la fabrication, notamment avant la mise en conteneur final ou avant le regroupement de différents lots intermédiaires en un lot final. Plusieurs stress pourraient intervenir dans la formation d'agrégats durant cette étape, comme la formation d'une interface liquide/glace, où le changement de pH induit par la congélation, du à la cristallisation successive des différents tampons, à des températures différentes.

La lyophilisation est un procédé consistant à éliminer la phase liquide d'un produit. Il se déroule en deux étapes. La première consiste en la congélation du produit. A mesure que la température diminue, des cristaux de glace se forment. Les solutés, notamment la protéine d'intérêt, mais aussi les excipients, se concentrent ainsi dans la phase liquide restante. La

viscosité de la partie non cristallisée augmente jusqu'à ce que la mobilité moléculaire soit nulle. Une fois que la mobilité des protéines cesse, la réactivité chimique cesse. Cette solution est ainsi sous forme vitreuse, et la température à laquelle elle atteint cette forme est appelée température de transition vitreuse (ou Tg pour glass transition température). Pour la plupart des protéines, la Tg est comprise entre -40°C et -60°C. Cette première étape de congélation a donc pour but de diminuer la température sous celle de la Tg. La seconde étape de lyophilisation nécessite la création d'un vide dans l'échantillon. Lorsqu'il est établi, la température est augmentée, généralement légèrement au-dessus de 0°C. Ceci entraîne la sublimation (passage à l'état gazeux) de l'eau cristallisée, laissant ainsi le produit sous forme de poudre. Ce procédé permet la conservation prolongée des protéines thérapeutiques, qui en majorité sont conditionnées sous cette forme pendant le stockage. Cependant, l'élimination d'une partie de l'environnement hydraté d'une protéine peut conduire à son dépliement (Mukherjee et al., 2009), pouvant ainsi aboutir à l'agrégation. Deux facteurs semblent responsables de ce phénomène. Tout d'abord, la concentration de la protéine au cours du procédé favorise l'agrégation. Ensuite, les molécules d'eau forment des ponts hydrogènes avec les groupes polaires présents à la surface des protéines, laissant ainsi les chaînes latérales hydrophobes dans un environnement déshydraté. La perte des molécules d'eau va ainsi induire une modification des charges électrostatiques, conduisant à une modification de la structure de la protéine, pouvant aboutir à la formation d'agrégats.

4. Méthodes d'analyse des agrégats formés durant la production

Le contrôle qualité des protéines à usage thérapeutique consiste en un ensemble d'analyses permettant de vérifier l'intégrité structurale des molécules, leurs propriétés biologiques, ainsi que la présence d'impuretés de différents types (liées à la protéine, à la cellule-hôte, au procédé de purification et à la présence de micro-organismes). Ces analyses s'effectuent bien entendu sur le produit fini avant la libération des lots, mais également tout au long du procédé de production. Les directives de la Pharmacopée Européenne concernant l'évaluation de la présence de particules sont applicables à toute solution parentérale ou lyophilisat, notamment ceux contenant des protéines. Le terme particule fait ici référence à toute espèce non dissoute, liée ou non à la protéine. Il regroupe tous les types d'agrégats d'une taille de 100 nm (particules sub-micrométriques) à plus de 50 µm (particules visibles) (den Engelsman et al., 2011). La présence d'agrégats visibles n'est bien sûr pas acceptable. Les Pharmacopées Européenne et Américaine sont harmonisées et précisent que les préparations doivent être

« libres de toute particule visible », ou « essentiellement libres de particules visibles » (Mahler et al., 2009; Ph. Eur. 2008. 2.9.19, 2008). Elles décrivent ensuite deux méthodes principales d'analyse, la microscopie et la technique dite de « light obscuration », qui sont accompagnées de critères d'acceptation, définissant le nombre maximum de particules subvisibles autorisées par conteneur ou par millilitre dans le cas des solutions à large volume injectable. Cependant, ces techniques ne permettent l'analyse que de particules d'un diamètre allant de 2 à 100 µm, correspondant aux agrégats insolubles. D'ailleurs, la Pharmacopée Européenne n'établit des critères que pour les particules relativement larges, d'un diamètre compris entre 10 et 25 µm (Ph. Eur. 2008. 2.9.19, 2008)(Ph. Eur. 2008. 2.9.19, 2008), celles de plus petit diamètre, de 0.1 à 10 µm par exemple, ne font l'objet d'aucune limitation. Les critères d'acceptation sont résumés dans le tableau 5. Les lignes directrices fournies par l'EMA (European Medicines Agency) quant à eux ne donnent aucune restriction sur les agrégats présents dans les spécialités. Il est néanmoins spécifié que les fabricants doivent d'une part effectuer une analyse poussée du contenu en agrégats, en utilisant des méthodologies orthogonales, mais également définir des critères d'acceptation de leurs lots.

Méthode utilisée	Volume	Limites d'acceptation
Light Obscuration	> 100 mL	25 particules/mL $\geq 10\mu\text{m}$ 3 particules/mL $\geq 25\mu\text{m}$
	<100 mL	6000 particules/conteneur $\geq 10\mu\text{m}$ 600 particules/conteneur $\geq 25\mu\text{m}$
Microscopie	>100 mL	3000 particules/conteneur $\geq 10\mu\text{m}$ 300 particules/conteneur $\geq 25\mu\text{m}$
	<100 mL	12 particules/mL $\geq 10\mu\text{m}$ 2 particules/mL $\geq 25\mu\text{m}$

Tableau 5 : Restrictions de la pharmacopée européenne sur la présence de particules dans les préparations de protéines thérapeutiques.

D'après (Mahler et al., 2009).

Puisqu'il est maintenant bien connu que des stress différents aboutissent à des agrégats eux aussi différents et en proportions variables dans les préparations de protéines (Joubert et al., 2011), il est donc nécessaire d'utiliser des techniques d'analyse complémentaires, afin d'étudier de manière la plus exhaustive possible les modifications physiques et chimiques ayant conduit à l'agrégation de la protéine au cours d'un procédé de production donné. Le principal critère analysé est la taille des particules. Un arsenal de techniques a été développé dans ce but. Chacune présente des avantages et des inconvénients, pour autant les spectres de taille analysés seront différents (et donc complémentaires) en fonction de la technique utilisée, comme résumé dans la figure 7:

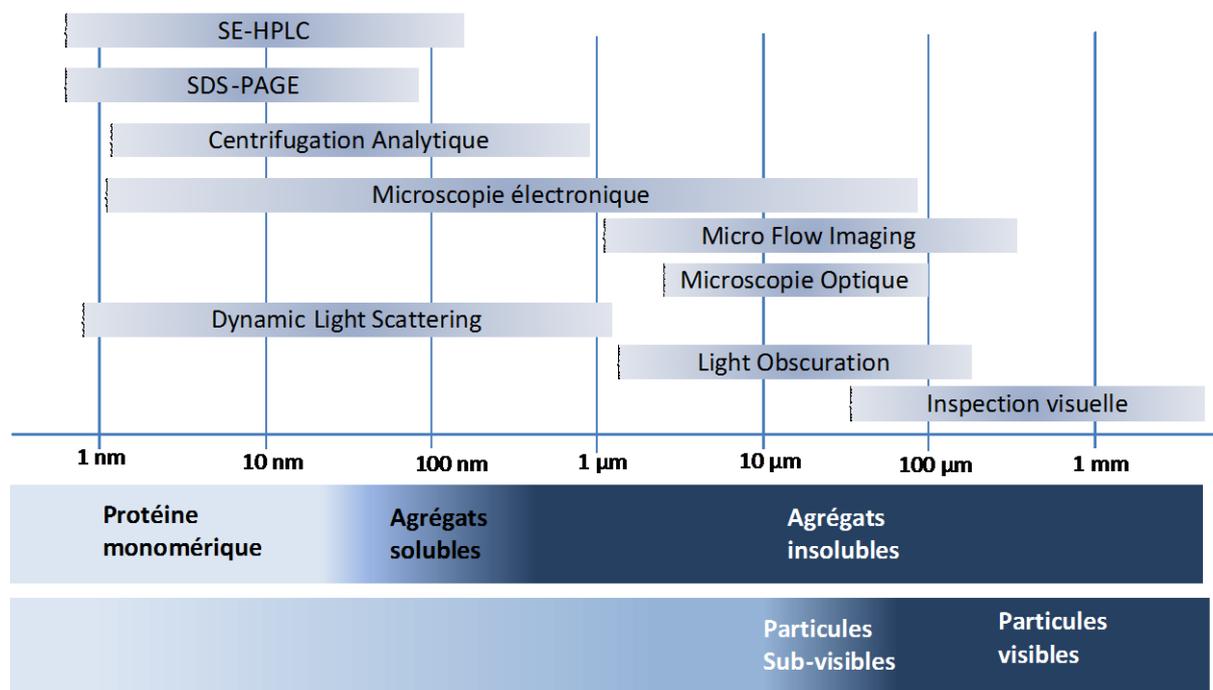


Figure 6 : Représentation schématique des spectres d'analyse de la taille des protéines de diverses méthodes d'analyse.

Les deux types de nomenclatures, ancienne et celle proposée par Nahri *et al.*, sont indiquées. Modifiée d'après Mahler *et al.*, 2009.

Parmi les techniques utilisées, la « **Light Obscuration** » (LO) est rapide et simple, permettant l'analyse des particules subvisibles présentant un diamètre entre 1 à 600 μm . Cependant, cette technique ne fait pas la distinction entre les particules de nature protéique ou autre, et les bulles d'air. Elle utilise un laser, qui va traverser une cellule contenant la solution à analyser. Chaque particule va bloquer une partie du faisceau, en fonction de son volume. Un détecteur va ensuite collecter la lumière résiduelle. Une limitation évidente de la technique est que la solution à analyser ne doit pas contenir trop de particules, une concentration trop importante pouvant créer des interférences et biaiser le comptage. Par ailleurs, cette méthode de mesure requiert un volume important (25 mL). Cela nécessite donc souvent le pool de plusieurs ampoules de préparation, et par conséquent rend la mesure relativement onéreuse. Généralement, des billes de polystyrène sont utilisées pour calibrer l'appareil. Celles-ci diffèrent grandement des particules protéiques au niveau de la forme, la transparence ou de l'index de réfraction. Ainsi, les particules translucides peuvent ne pas être analysées, une partie de la lumière passant au travers (Huang *et al.*, 2009).

Les Pharmacopées Européenne et Américaine ont approuvé l'utilisation de la **microscopie optique** pour déterminer la présence de particules dans les préparations de

protéines thérapeutiques. Elle permet l'analyse d'espèces d'un diamètre supérieur à 1 μm , isolées après filtration de la préparation totale. L'un des inconvénients majeurs de cette technique est que la filtration va induire des forces de cisaillement pouvant provoquer une dissociation des particules en espèces plus petites qui peuvent alors passer au travers du filtre. Cela peut ainsi conduire à une sous-estimation du nombre de particules dans la préparation.

D'autres techniques de microscopie permettent la détection d'agrégats dans les préparations de protéines thérapeutiques : la **microscopie à force atomique**, la **microscopie à fluorescence** et la **microscopie électronique**. Un exemple intéressant a été reporté en 2009 par Demeule et *al.* qui montrent que la combinaison de la microscopie à fluorescence et de la microscopie à transmission est efficace pour la détection d'agrégats de Trastuzumab de différentes tailles, et couvre notamment un spectre d'analyse allant du nm au μm (Demeule et al., 2009).

Le **Micro Flow Imaging** (MFI), est une technique de plus en plus utilisée pour la détection des agrégats (Barnard et al., 2011). Les particules ne sont pas isolées par filtration, l'échantillon total passe dans une cellule, où les particules sont illuminées et visualisées par une caméra avec dispositif de transfert de charge à fort grossissement (jusqu'à 200 fois) (Zölls et al., 2013). Cette technique permet non seulement la détection de particules d'un diamètre pouvant aller de 1 à 400 μm , mais également une analyse de la forme des particules ou encore la transparence des particules observées. Ce dernier paramètre permet la discrimination entre les particules d'origine protéique ou non, comme par exemple les gouttelettes d'huile de silicone (Strehl et al., 2012).

La **chromatographie d'exclusion de taille**, ou SEC (Size Exclusion Chromatography), est une méthode d'analyse parmi les plus employées. Un avantage majeur de cette technique est qu'elle permet non seulement de mesurer la taille des agrégats mais également de les quantifier. Cependant, les agrégats insolubles (d'une taille supérieure à 1 μm) ne sont pas analysables par cette technique, ceux-ci étant retenus par le filtre présent à l'entrée de la colonne. Par ailleurs, l'utilisation de standards de calibration peut amener un biais dans la détermination de la taille des particules. En effet, les protéines d'intérêt, de par leur schéma de glycosylation par exemple, peuvent avoir des propriétés d'élution différentes par rapport au standard. Ainsi, la détermination de la masse moléculaire en ne se basant que sur le temps de rétention peut amener à une erreur d'analyse, notamment par la détection de faux-positifs (Philo, 2006).

A l'instar de la SEC, **l'électrophorèse sur gel** est une technique utilisée depuis longtemps (dès les années 1960). Elle est utilisée, en conditions dénaturantes et réductrices dans le but d'estimer la masse moléculaire d'une protéine, mais également de déterminer sa

pureté et d'évaluer la présence de ponts disulfure. Globalement, cette technique permet l'analyse de protéines/particules ayant une masse moléculaire comprise entre 5 à 500 kDa, la limite de détection et la sensibilité pouvant être augmentées par l'utilisation de gels-gradients. L'utilisation de gels en condition non dénaturantes permet la détection des agrégats dans les échantillons, tandis que l'utilisation d'un détergent anionique, le SDS [sodium dodecyl (lauryl) sulfate] permet la mise en évidence d'agrégats liés de manière covalente.

La **diffraction dynamique de la lumière**, ou DLS (Dynamic Light Scattering) permet la mesure du mouvement Brownien de particules en suspension. Il s'agit du mouvement aléatoire des particules du aux chocs de celles-ci avec les molécules de solvant qui les entourent. Plus la particule est volumineuse, plus son mouvement Brownien sera lent. La viscosité d'un milieu étant liée à sa température, une connaissance précise et une stabilité de cette dernière est nécessaire au long de la mesure. A partir du mouvement Brownien le diamètre hydrodynamique de la particule peut être déterminé, à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein :

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Où $d(H)$ correspond au diamètre hydrodynamique, k à la constante de Boltzmann, T à la température, η à la viscosité du milieu, et enfin D correspond coefficient de diffusion. La mesure du diamètre hydrodynamique d'une particule fait référence à la façon dont elle diffuse dans le milieu. Ce diamètre correspond donc à celui d'une sphère présentant le même coefficient de diffusion que la particule. Ainsi, un biais de cette technique est que chaque particule est considérée comme globulaire.

L'ensemble des techniques présentées plus haut permet une caractérisation des agrégats sur la base de leur taille. Cependant, comme expliqué précédemment, les agrégats peuvent aussi présenter des altérations physiques et/ou chimiques par rapport à la protéine native. Le **Dichroïsme Circulaire**, ou CD (Circular Dichroism), correspond à la différence d'absorption entre la lumière polarisée circulaire gauche et droite par les molécules chirales. L'asymétrie d'une protéine peut être causée par des groupements liés de manière covalente ou, dans le cas des macromolécules, par la conformation de celles-ci. Tout groupement asymétrique a un CD. Celui-ci peut être dû à l'asymétrie inhérente, comme c'est le cas pour le carbone α chiral de la liaison peptidique. Cependant, dans la majorité molécules, l'asymétrie est causée par l'environnement asymétrique, le CD donnant ainsi des informations sur la structure de la protéine. Dans le cas des protéines, les chromophores d'intérêt incluent la liaison peptidique (dont l'absorption se trouve en dessous de 240 nm), les groupements aromatiques (entre 260 et

320 nm) et les ponts disulfure (qui absorbent faiblement, avec un pic à 260 nm). L'analyse du CD d'une protéine peut fournir diverses informations (Kelly et al., 2005):

- La composition en structures secondaires à partir des liaisons peptidiques qui absorbent à 240 nm ou en dessous. Pour chaque type de structure (hélice α , feuillet β ...) on peut distinguer un spectre particulier entre 160 et 240 nm, et qui sont représentés dans la figure 8.

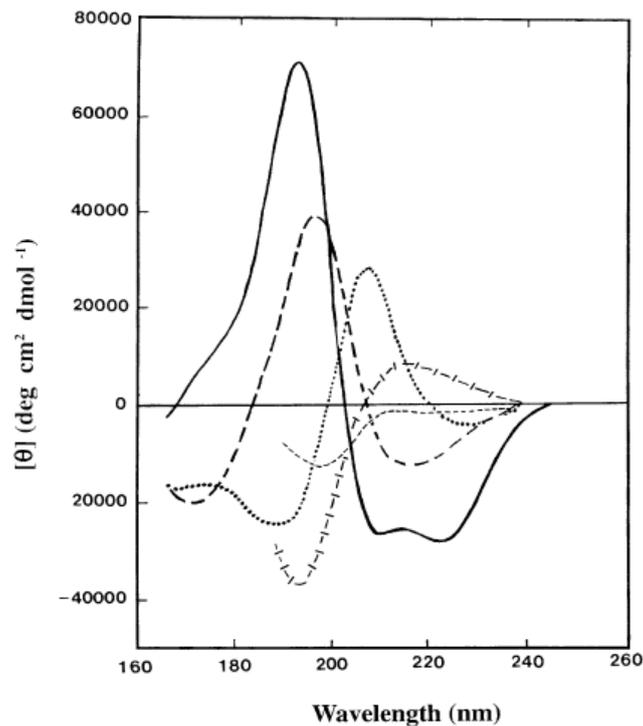


Figure 7: Spectres CD associés aux structures secondaires des protéines.

Hélice α (ligne pleine) ; feuillet β antiparallèle (tirets épais) ; coude β (pointillés) ; hélice (croisillons) ; structure irrégulière (tirets fins) (Kelly; 2005)

Un point intéressant est que l'on peut, en analysant le signal entre 208 et 222 nm, estimer le nombre d'hélices α de la protéine.

- Une « empreinte » de la structure tertiaire. Le spectre entre 260 et 320 nm correspond aux acides aminés aromatiques. Chaque acide aminé absorbe à longueur d'onde caractéristique. Par exemple, le Trp a un pic d'absorption proche de 290 nm, tandis que celui de la Tyr se situe entre 275 et 282 nm.

- L'intégrité des sites de liaison des cofacteurs
- Les changements structuraux dans la protéine

La **spectroscopie de fluorescence** est une technique très utilisée pour étudier le dépliement des protéines. La sensibilité de la fluorescence permet notamment l'utilisation de

faibles concentrations de protéine, ce qui représente un avantage important. Par ailleurs, les signaux de fluorescence sont très sensibles à la conformation des macromolécules. La spectroscopie repose sur l'émission de fluorescence soit par les résidus composant la protéine, soit par des fluorophores, après excitation par un laser.. Trois acides-aminés aromatiques fluorescent naturellement : Phe, Trp et Tyr. Le coefficient d'extinction ainsi que le rendu quantique sont faibles pour la Phe, ce qui fait qu'elle ne contribue que peu à la fluorescence de la protéine. Typiquement, on considère que la fluorescence émise est due aux Trp, ceux-ci présentant le meilleur rendu quantique. Ceci est particulièrement vrai lorsque l'on excite les protéines à une longueur d'onde de 295 nm, où le coefficient d'extinction de la Tyr est négligeable comparativement à celui du Trp. Dans l'eau, le spectre d'émission du Trp est centré entre 348 et 350 nm. Les résidus Trp sont utilisés comme des rapporteurs locaux dans les protéines, du fait de leur déplacement de Stokes dépendant du solvant, qui est relativement large (environ 60 nm dans l'eau). C'est pourquoi, la fluorescence des Trp dans la protéine est grandement dépendante de son environnement local. Par ailleurs, la plupart des groupes polaires peuvent diminuer cette fluorescence, selon divers mécanismes. Ainsi, le rendement quantique du Trp est impacté par sa position et par les interactions du résidu avec les résidus voisins. C'est pourquoi la fluorescence des Trp au sein d'une protéine peut fournir des informations sur la structure de la protéine exposée à un stress.

En conclusion, il est important de noter que les agrégats formés au cours du procédé de production des protéines présentent une hétérogénéité en taille et en caractéristiques physicochimiques, c'est pourquoi l'utilisation d'une seule technique d'analyse n'est pas suffisante pour une caractérisation exhaustive. De plus, les résultats de la caractérisation sont directement liés à la technique employée. En effet, certaines techniques, comme la DLS vont directement renseigner sur la taille des particules présentes, sans pouvoir donner d'information précise sur leur nombre ni sur leur structure. Le dichroïsme circulaire permet justement d'évaluer les modifications structurelles des protéines, mais ne fournissent aucune donnée sur la taille des agrégats. Enfin, seules les techniques de MFI et de SEC permettent d'étudier le pourcentage d'agrégats présents dans une spécialité. En conséquence, l'analyse des particules doit se faire en balayant un large spectre de tailles, et la conformation des protéines au sein des agrégats est également à préciser.

Comme nous allons le développer plus loin, la présence d'agrégats dans les spécialités de protéines est liée à la notion d'immunogénicité, il est donc nécessaire que la procédure de contrôle qualité de ces produits permette une connaissance approfondie de la quantité et la nature de ces agrégats.

5. Formation des agrégats après la libération des lots de protéines

Nous avons cité les facteurs favorisant la formation des agrégats de protéines lors de la fabrication des préparations à usage thérapeutique, et nous avons vu les différentes méthodes qui sont appliquées lors du contrôle de ces préparations pour détecter les agrégats. On peut donc considérer que les lots libérés obéissent aux normes imposées par la Pharmacopée concernant la nature, la taille et la quantité des particules que l'on peut admettre dans les spécialités protéiques. Cependant, les préparations de protéines peuvent également subir des stress au cours du stockage des lots, lors de transports et enfin au cours de la phase l'administration du produit au patient.

La température est un élément majeur dans la stabilité d'une protéine. Généralement, les protéines ont une température de fusion (T_m , température à laquelle la moitié des protéines en solution sont sous forme dénaturée) entre 40 et 80°C (Wang, 1999). L'exposition d'une protéine à une température proche du T_m peut conduire à son dépliement partiel, voire total. Une augmentation de la température accélère également les réactions chimiques telles que l'oxydation ou la déamidation. Ces phénomènes la rendent ainsi plus sensible à l'agrégation. Généralement, il est considéré que l'augmentation de la température s'accompagne d'une diminution de la stabilité de la protéine. C'est pourquoi la plupart des protéines thérapeutiques ont une température de conservation spécifiée entre 2 et 8°C (Mahler et al., 2009). L'exposition d'une préparation de protéine thérapeutique à des températures élevées, est un événement qui en principe n'arrive pas en milieu hospitalier, mais qui peut être envisageable pour des préparations liquides pouvant être auto-administrées à domicile.

D'autres types de stress peuvent en revanche avoir lieu y compris dans un environnement contrôlé, par exemple dans les salles de préparation des poches de spécialités d'anticorps monoclonaux destinés à être administrés aux patients venus en hôpital de jour. Ainsi de nombreuses études ont montré que lors de la reconstitution des solutions de protéines, le stirring, le pompage ou encore le shaking pouvaient induire la formation d'agrégats (Joubert et al., 2011; Kiese et al., 2008; Mahler et al., 2005). Ces agrégats seraient principalement dus à des forces de cisaillement, des effets thermiques locaux ou encore à la cavitation qui, comme décrit précédemment peuvent être responsables de leur formation.

6. Modélisation *in silico* des agrégats

Les techniques présentées précédemment permettent de détecter la présence des agrégats dans les spécialités. Bien qu'elles permettent d'éliminer les lots impropres à l'utilisation clinique, elles ne permettent pas d'anticiper et de corriger le problème. Dernièrement, avec les progrès effectués en modélisation, des méthodes de prédiction d'agrégation *in silico* ont été développées. Elles prédisent, au sein de la séquence protéique, les régions favorables à l'agrégation, en intégrant les différents facteurs la favorisant, tels que la proximité spatiale entre APR et régions défavorables à l'agrégation, ou encore la flexibilité de la protéine. Ceci permet par exemple de ne pas tenir compte des APR qui sont enfouies au sein de la protéine, et qui ne jouent donc pas de rôle dans les interactions protéine-protéine. De nouveaux algorithmes permettent également d'identifier les sites de nucléation en considérant non seulement les facteurs précédents, mais également la compétition entre la formation d'agrégats et la formation de structures secondaires telles que les hélices α . L'intérêt de l'utilisation de ce type d'algorithme est de déterminer quelles régions de la protéine sont susceptibles de favoriser l'agrégation, et si possible, de générer des protéines mutantes dans lesquelles ces régions ont été remplacées (De Baets et al., 2014; Obrezanova et al., 2015). Ce type de technologies commence à être envisagé dans le développement des protéines thérapeutiques et en particulier les anticorps. Une étude a récemment analysé les régions favorables à l'agrégation d'une IgG2, et généré des variants de la protéine dans le but de réduire l'agrégation induite par l'agitation, tout en préservant l'activité de l'anticorps (Clark et al., 2014).

III. Protéines thérapeutiques et système immunitaire, quelles interactions possibles ?

La plupart des protéines à usage thérapeutique sont connues pour être immunogènes et donc induire la formation d'ADA (Anti-Drug Antibody) chez certains des patients traités (Baker et al., 2010). Le développement d'ADA traduit donc une implication des lymphocytes B (LyB) dans le phénomène. Il est établi que dans certains cas, les LyB puissent jouer un rôle de manière autonome. Néanmoins, la majorité des réactions induisant une activation des LyB implique d'autres types cellulaires. De manière très schématique, une réaction immunitaire classique va impliquer des cellules présentatrices de l'antigène, ainsi que des lymphocytes T (LyT), qui vont permettre une activation optimale des LyB.

Parmi les CPA existantes, les Cellules Dendritiques (DC) jouent un rôle majeur dans la mise en place des réponses immunitaires. Il en existe différents sous-types, selon leur localisation au sein de l'organisme. L'utilisation de différentes voies d'injection pour les protéines thérapeutiques peut ainsi aboutir à la rencontre de la protéine thérapeutique avec les différents sous-types de DC existants. Ces DC peuvent ensuite interagir avec des LyT qui, à leur tour, communiqueront avec les LyB. Ce chapitre est donc consacré aux interactions entre les protéines thérapeutiques et le système immunitaire, et se focalisera sur les trois types cellulaires précédemment évoqués.

1. Les cellules dendritiques

Les Cellules Dendritiques ont été identifiées pour la première fois par Paul Langerhans en 1868, mais elles furent à l'époque confondues avec des terminaisons nerveuses. Ce n'est qu'en 1973 que Ralph Steinman et Zanvil Cohn ont isolé des cellules ayant une morphologie semblable, dans des rates de souris. Le nom de cellule dendritique est venu de leur forme étoilée. Les DC furent ensuite retrouvées dans divers organes, lymphoïdes ou non, ainsi que dans le sang (Sato and Fujita, 2007).

Les DC sont des CPA dites professionnelles. Elles ont la capacité d'internaliser (par phagocytose, endocytose...) des composants antigéniques, de les digérer et de les présenter aux Lymphocytes T spécifiques (Banchereau et al., 2000), et d'entraîner leur activation. Les DC expriment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII).

1.1 Les différents sous-types de cellules dendritiques chez l'Homme

Depuis leur découverte, les DC ont été classées en sous-populations fonctionnellement différentes. Ce classement s'effectue sur deux critères. D'une part, les différentes sous-populations ont des localisations. D'autre part, on peut classer les DC sur la base de l'expression différentielle de marqueurs de surface. La description qui suit est basée sur la classification établie par Collin *et al.* (Collin et al., 2013). L'ensemble est résumé dans le tableau 6.

DC	CD1c ⁺	CD141 ⁺	pDC	infDC	LC	CD1a ⁺	CD14 ⁺
Phénotype	HLA-DR ⁺	HLA-DR ⁺	HLA-DR ⁺	HLA-DR ⁺	HLA-DR ⁺	HLA-DR ⁺	HLA-DR ⁺
	CD11c ⁺	CD11c ⁺	CD11c ^{low}	CD11c ⁺	CD11c ⁺	CD11c ⁺	CD11c ⁺
	CD1a ⁻	CD1a ⁻	CD1a ⁻	CD1a ⁺	CD1a ⁺	CD1a ^{high}	CD1a ^{low}
	CD1c ⁺	CD1c ⁺	CD123 ^{high}	CD1c ⁺	CD1c ⁺	CD1c ⁺	CD1c ⁺
	(BDCA-1)	(BDCA-3)	BDCA-2 ⁺	CD11b ⁺	CD11b ^{+/-}	CD11b ^{high}	CD11b ^{+/-}
	CD11b ^{high}	CD11b ^{high}	BDCA-4 ⁺	CD14 ⁺	CD207 ⁺	CD207 ⁻	CD207 ⁻
	CLEC9A ⁻	CLEC9A ⁺	CD11b ^{low}	CD206 ⁺	(Langerin) E-Cadhérine ⁺		
Expression des TLR	1 ⁺ , 2 ⁺ , 3 ⁺ , 4 ⁺ , 5 ⁺ , 6 ⁺ , 7 ⁺ , 8 ⁺ , 9 ⁻	1 ⁺ , 2 ⁺ , 3 ⁺ , 4 ⁺ , 5 ⁻ , 6 ⁺ , 7 ⁻ , 8 ⁺ , 9 ⁻	1 ⁺ , 2 ⁻ , 3 ⁻ , 4 ⁻ , 6 ⁺ , 7 ⁺ , 8 ⁻ , 9 ⁺	ND	1 ⁺ , 2 ⁺ , 3 ^{low} , 4 ⁻ , 6 ⁺ , 7 ⁻ , 8 ⁻ , 9 ⁻	ND	ND
	Localisation	Sang	Sang	Sang	Site inflammatoire	Epiderme et muqueuses	Derme

Tableau 6: Phénotype et localisation des différents sous-types de cellules dendritiques
ND : non déterminé, high : forte expression, low : faible expression

1.1.1 Les cellules dendritiques du sang

On distingue deux grandes familles de DC dans le sang périphériques, les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC myéloïdes (mDC).

a. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les DC myéloïdes sont l'équivalent humain des DC conventionnelles CD11c⁺ chez la souris. Elles expriment le marqueur des progéniteurs myéloïdes CD33, ainsi que d'autres marqueurs typiques myéloïdes : CD11b, CD11c, et CD13. Bien qu'elles partagent l'expression du CD11c avec les monocytes, elles se distinguent de ces derniers par l'absence d'expression du CD14 et du CD16. Cette population peut être découpée en deux sous-classes, sur la base de l'expression du CD1c et du CD141, et chacune partage des homologies avec les DC CD11b et CD8/CD103 murines respectivement (Grabbe et al., 2000; MacDonald et al., 2002).

Les DC CD1c⁺ ou BDCA-1⁺ (Blood Dendritic Cell Antigen) représentent la population majoritaire de mDC, aussi bien dans le sang (0.6% des cellules mononuclées) que dans les tissus et les organes lymphoïdes. Elles expriment un plus large panel de TLR que les DC CD141⁺ (Hémont et al., 2012), ce qui en fait des cellules spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes extracellulaires. Elles semblent aussi être la population de mDC la plus efficace pour la capture, le transport, et la présentation antigénique aux LyT CD4⁺, mais leur capacité de « cross-présentation » des antigènes aux LyT CD8⁺ semble inférieure à celle des DC CD141⁺ (Haniffa et al., 2012).

Les DC CD141⁺, identifiables notamment par leur expression du marqueur BDCA-3, représentent 10% des mDC circulantes. Seules cellules du sang à exprimer le récepteur de chimiokines XCR1, leur rôle majeur consiste à effectuer la présentation croisée d'antigènes exogènes solubles *via* le CMH de classe I aux LyT CD8⁺ spécifiques (Bachem et al., 2012; Jongbloed et al., 2010). Elles expriment les TLR3 et TLR8, ce qui leur permet de détecter la présence d'acides nucléiques viraux (Haniffa et al., 2012). Ainsi les mDC CD141⁺ semblent spécialisées dans l'induction de la tolérance vis-à-vis du soi (Chu et al., 2012), mais également de promouvoir une réponse immunitaire à l'encontre des pathogènes intracellulaires.

b. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les DC plasmacytoïdes se différencient des mDC par les marqueurs CD303 (CLEC4E; BDCA-2), ILT7 (immunoglobulin-like transcript 7), CD123 (IL-3R), et CD304 (neuropilin; BDCA-4); elles expriment aussi le CD45RA, de façon variable, le CD2 et le CD7 (Reizis et al., 2011). Peu abondantes dans les tissus au repos, mais elles sont rapidement recrutées au niveau des sites inflammatoires. Contrairement aux mDC, les pDC possèdent une faible capacité d'endocytose de l'Ag ainsi qu'une faible expression des cathepsines S et D (molécules lysosomales impliquées dans le processus de production des peptides antigéniques) (Tel et al., 2012). Suite à une stimulation des TLR 7 et 9 par des antigènes (ADN et ARN) viraux, les pDC vont sécréter de

fortes quantités d'IFN de type I (α , β , τ et ω). Ceci aura pour conséquence d'inhiber la réplication virale et d'activer différentes réponses immunitaires telles que la fonction cytolytique des cellules Natural Killer (NK), ainsi que d'autres cellules impliquées dans la réponse antivirale comme les LyT CD8⁺ (Guillerey et al., 2012). Par ailleurs, les pDC contrôlent aussi la différenciation des LyB en plasmocytes sécrétant principalement des IgG, par l'interaction CD70/CD27 (Shaw et al., 2010). Enfin, elles sont capables d'induire une réponse LyT effectrice et pourraient induire des LyT régulateurs CD4⁺CD25⁺. Cette réponse régulatrice serait induite en réponse aux antigènes du soi, capturés par les pDC via différents récepteurs (BDCA-2, Siglec-H et DCIR) et l'expression notable de ILT7, (Reizis et al., 2011; Villadangos and Young, 2008) ainsi que l'expression du ligand de l'Inducible CO-Stimulatory molecule (ICOS-L)(Ito et al., 2007; Ogata et al., 2013).

1.1.2 Les cellules dendritiques des tissus

a. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) sont présentes dans l'épiderme, ainsi que dans les muqueuses du tractus respiratoire, de la cavité orale ou de l'appareil uro-génital (Collin et al., 2013). Elles présentent des marqueurs exprimés par divers sous-types de DC, comme le CD1a, qui leur permet de présenter des antigènes lipidiques. Les LC expriment également des molécules spécifiques, telle que la Langhérine (CD207), une lectine de type C jouant un rôle dans la présentation des Antigènes glycopeptidiques, ou la E-cadhérine, molécule d'adhésion qui permet la domiciliation de la LC dans l'épiderme. Elles possèdent également des organelles intracellulaires, les granules de Birbeck. Il s'agit d'endosomes lamellaires qui participeraient au processus de chargement de l'Ag. Les autres marqueurs exprimés par ces cellules sont le CD36, l'ATPase et le Fc ϵ R1. (Ginhoux and Merad, 2010) Elles sont capables, via l'expression des TLR, de lier des virus et des composants des bactéries gram positives (Flacher et al., 2006; Said and Weindl, 2015) qui induisent leur maturation, et leur migration vers les ganglions lymphatiques où elles présenteront les peptides antigéniques aux LyT. En plus de leur implication dans la mise en place d'une réponse immunitaire, les cellules de Langerhans ont été montrées comme pouvant induire un état de tolérance, en particulier au cours des réactions d'hypersensibilité, par la production d'IL-10 notamment (Igyarto et al., 2009; Seneschal et al., 2012)

b. Les cellules dendritiques du derme

Bien que chez la souris au moins cinq populations ont été décrites dans le derme, seules deux sous-populations ont actuellement été décrites chez l'homme: la sous-population CD1a^{high}, CD4⁺, CD209⁺, CD206⁺, CD14⁻, CD16⁻ et la sous-population CD1a^{low}, CD4⁺, CD209⁺, CD206⁺,

CD14⁺, CD16⁻. La première est présente dans la couche supérieure du derme, a une forte capacité à induire la prolifération des LyT CD4⁺ et CD8⁺ allogéniques, et produit de l'IL-15 (Klechevsky et al., 2009). La seconde semble intervenir dans la polarisation des LyT CD4⁺ en CD4⁺ follicular helper, capables d'induire la différenciation des LyB en plasmocytes sécréteurs d'IgM, IgG ou IgA (Klechevsky et al., 2009; McGovern et al., 2014).

c. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes

On retrouve dans les organes lymphoïdes deux populations de DC. Suite à leur activation, les DC présentes dans les autres tissus peuvent en effet migrer dans les OL, afin de présenter les antigènes capturés aux LyT.

En plus des DC migrantes, les OL contiennent des DC résidentes, les DC folliculaires. Présentes dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires, ainsi que dans les centres germinatifs, ces DC ont un rôle important dans la sélection des LyB mémoires. A l'inverse des autres populations de DC, elles ont une origine stromale, et n'expriment pas de molécule du CMH II. Elles présentent ainsi les antigènes aux LyB sous la forme d'un complexe immun, à l'aide des molécules CD21 et CD35 (Aguzzi et al., 2014).

1.1.3 Les cellules dendritiques inflammatoires

Au cours d'une inflammation, on va observer une modification des populations de DC et de monocytes dans les tissus et les organes lymphoïdes. Les populations majoritairement retrouvées sont les granulocytes, les pDC et les monocytes, tandis que les DC résidentes deviennent plus difficile à détecter de par leur proportion diminuée (du fait de leur migration aux OL, ou du recrutement des autres sous-types de cellules). Une nouvelle population de DC, non présente à l'état homéostatique émerge, les DC inflammatoires (infDC). Cette population a d'abord été détectée chez la souris, dans un modèle d'infection cutanée à *Leishmania major* (León et al., 2007). De nombreuses études ont ensuite confirmé l'existence de cette population particulière chez la souris, mais également chez l'homme. Cette population se distingue des autres types de DC de par son origine. En effet, les infDC se différencient *in situ* à partir de monocytes recrutés au site inflammatoire. Ces DC, une fois différenciées, migrent au ganglion lymphatique drainant, où elles pourront induire une réponse T. Le type de réponse sera dépendant de l'environnement inflammatoire dans lequel les infDC se seront différenciées. En effet, il a été montré chez la souris que les infDC pouvaient induire une réponse Th1 ou Th2. Chez l'homme, une étude montre que ces infDC, isolées à partir du liquide synovial de patients

atteints de polyarthrite rhumatoïde, induisait une réponse LyT de type 17 (Th17)(Segura and Amigorena, 2013).

Les infDC expriment à la fois des marqueurs d'autres populations de DC (CD11c, HLA-DR, CD1a, CD1c, CD172a), mais également des molécules considérées comme des marqueurs des macrophages (CD11b, CD14 et CD206). L'expression du FcεRI semble être un bon marqueur pour distinguer cette population d'infDC des DC classiques et des macrophages (Plantinga et al., 2013). Enfin, des analyses transcriptomiques par puces à ADN confirment que les DC de type inflammatoire dérivent des monocytes, et expriment une signature moléculaire proche des DC différenciées *in vitro* à partir des monocytes (Segura and Amigorena, 2013; Watchmaker et al., 2014).

2. Le rôle des cellules dendritiques : un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative

Les DC, cellules de l'immunité innée, sont des CPA dites professionnelles, en raison de leur capacité à induire l'activation des LyT naïfs. Cette fonction est possible après la capture, l'apprêtement et la présentation des antigènes par les DC.

2.1. La capture et la présentation des antigènes

On distingue trois mécanismes, présentés dans la figure 8, qui permettent à la DC de capturer les Ag: la macropinocytose, processus d'endocytose non spécifique des antigènes solubles ; la phagocytose et l'endocytose médiée par la clathrine, qui permettent l'internalisation des antigènes liés à un récepteur.

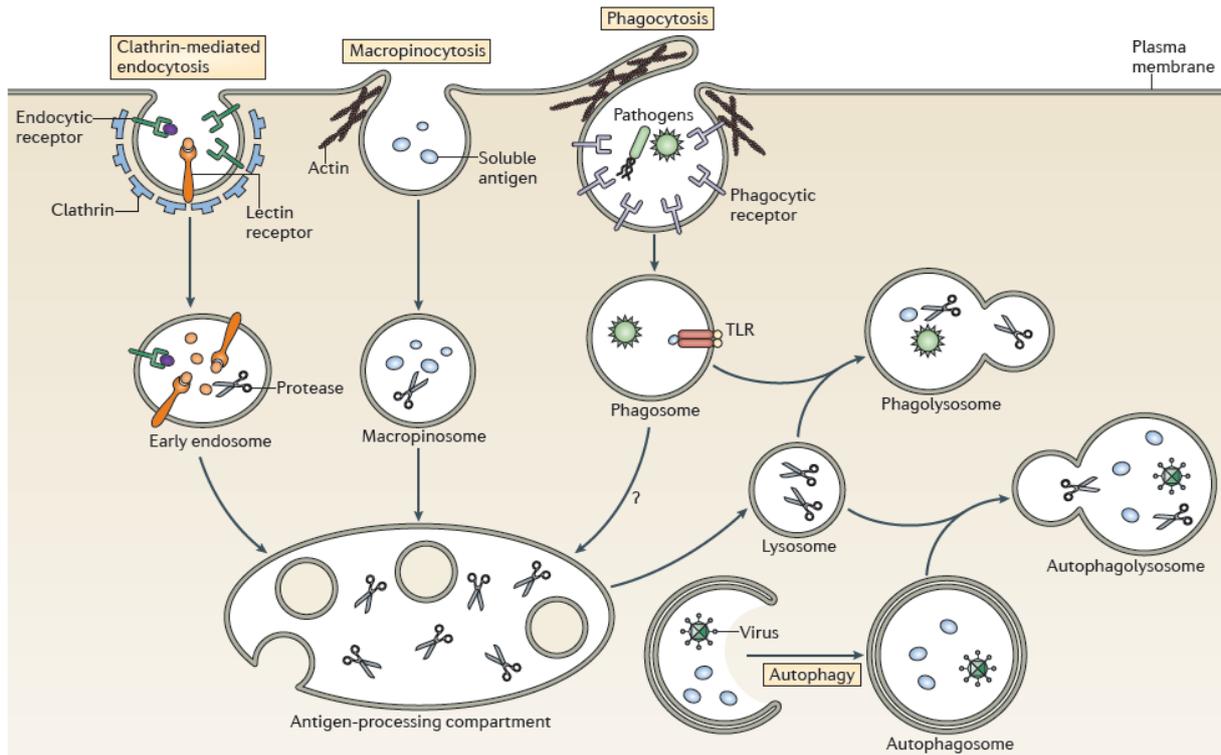


Figure 8: Voies d'internalisation des antigènes dans les cellules présentatrices d'antigène.
Roche et Furuta, 2015

La macropinocytose est un type d'endocytose qui facilite l'internalisation de matériel extracellulaire pouvant varier en taille de petites molécules jusqu'à des cellules entières. (Doherty and McMahon, 2009). Il s'agit d'un processus dépendant de l'actine qui va conduire à l'ingestion non spécifique de fluide extracellulaire contenant nutriments, antigènes et diverses molécules. Ce processus d'internalisation, très efficace chez la DC immature, joue un rôle central dans l'acquisition des antigènes. Il se caractérise par la formation de « ruffles », des protrusions membranaires qui vont ensuite se circulariser et se refermer, formant ainsi des vésicules lisses intracellulaires, les macropinosomes, d'un diamètre de 0,2 à 5µm. Les antigènes internalisés par cette voie sont apprêtés et principalement présentés par les molécules de CMHII (Liu and Roche, 2015; Sallusto et al., 1995). La macropinocytose est un processus qui nécessite l'implication de plusieurs molécules intracellulaires, dont notamment, plusieurs GTPases qui interviennent dans la régulation des différentes étapes.

- On retrouve les Arf GTPases qui vont moduler le métabolisme phospholipidique et le cytosquelette d'actine, et qui sont principalement impliquées dans la phase de « ruffling » (Egami et al., 2014).
- Les Rho GTPases Rac1 et Cdc42 sont essentielles à l'activation de PAK1, kinase qui va réguler l'organisation du cytosquelette d'actine via l'activation de WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)/WAVE-Arp2/3 ainsi que la phosphorylation de CtBP1/BARS. Ces différents

éléments vont réguler la séparation du macropinosome de la membrane plasmique (Egami et al., 2014).

- Plusieurs Rab GTPases sont associées aux macropinosomes à différents stades de leur maturation. La protéine Rab34, colocalisée avec l'actine au niveau des protrusions membranaires, est essentielle à la formation des macropinosomes à partir des « ruffles ». Les protéines Rab5 sont associées aux macropinosomes précoces, tandis que les protéines Rab7 sont caractéristiques des endosomes tardifs (Kerr and Teasdale, 2009).
- Enfin, les Ras GTPases sont impliquées dans le « ruffling » membranaire dans différents types cellulaires. Ras agit de manière dépendante des PI3K et de la phospholipase-C (Zwartkruis and Burgering, 2013).

La phagocytose est considérée comme le mécanisme le plus important pour la capture des antigènes par les DC. Ce processus est important pour l'internalisation des particules volumineuses. Comme la macropinocytose, la phagocytose est dépendante de l'actine. Bien que ce phénomène soit généralement considéré comme dépendant d'un récepteur, il est connu que les DC peuvent phagocyter des billes de latex, indépendamment de récepteurs. La phagocytose permet la capture d'antigènes de grande taille, généralement insolubles et particuliers (Flannagan et al., 2012).

La DC est également capable de capturer un antigène par l'intermédiaire d'un récepteur. L'endocytose dépendante de la clathrine va permettre l'internalisation d'antigènes solubles dans de petites vésicules (0,1µm).

De nombreux récepteurs sont impliqués dans le processus d'internalisation des antigènes.

- Les récepteurs à lectine de type C (CLR) constituent une famille hétérogène de récepteurs liant les carbohydrates de manière calcium-dépendante. La capacité de liaison de ces récepteurs est médiée par des domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD). Deux groupes de CLR ont été identifiés : les CLR liés à la membrane (dont les CLR de type I, portant de nombreux CRD, et les CLR de type II, qui n'en possèdent qu'un seul) et les CLR solubles.
- Les récepteurs de mort cellulaire
- Les récepteurs scavenger, super-groupe de récepteurs membranaires qui lient une grande variété de ligands incluant aussi bien des protéines endogènes que des pathogènes. Ils sont classés en 10 types différents, notés A à J. Ils ont la capacité commune de reconnaître des ligands polyanioniques tels que les lipoprotéines, les cellules apoptotiques, les esters de

cholestérol, les phospholipides, les protéoglycanes, la ferritine et les carbohydrates (Zani et al., 2015).

- Les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (FcR) facilitent la phagocytose des complexes immuns formés par des microorganismes opsonisés par les anticorps, et l'adressage des antigènes aux voies d'apprêtement pour la présentation de peptides par le CMH.

Certains récepteurs sont capables d'induire directement l'internalisation des antigènes qu'ils ont fixés. C'est le cas pour les FcR ou encore CLEC7A qui *via* la signalisation qu'ils déclenchent, induisent la polymérisation de l'actine, permettant ainsi la phagocytose de l'antigène. D'autres récepteurs, tels que le récepteur scavenger CD36, mais également les récepteurs Toll-like peuvent induire l'internalisation des antigènes par l'intermédiaire des intégrines, notamment Mac-1. Celles-ci comportent 2 sous unités qui s'activent lors du changement de conformation du récepteur liant l'antigène, et induisent la polymérisation de l'actine (Flannagan et al., 2012; Freeman and Grinstein, 2014).

Selon sa nature, un Ag sera présenté différemment aux LyT (figure 9). De manière générale, les antigènes intracellulaires, qu'ils soient cytoplasmiques ou nucléaires seront présentés aux LyT CD8+ *via* le CMH de classe I, tandis que les Ag exogènes seront présentés par les CMH de classe II aux LyT CD4+. Le CMH de classe I est exprimé par toutes les cellules nucléées, tandis que l'expression du CMH de classe II est restreinte aux CPA (macrophages, LyB et DC), qui l'expriment de manière constitutive.

Les Ag cytoplasmiques ou nucléaires sont dégradés en peptide par le protéasome, avant d'être transportés jusqu'au réticulum endoplasmique (RE). C'est dans cette organelle qu'ont lieu la synthèse et l'assemblage de la chaîne α du CMH I et de la bêta-2-microglobuline ($\beta 2m$), qui forment un complexe stable avec le peptide. Le complexe peptide/CMH I est ensuite transporté *via* l'appareil de Golgi jusqu'à la surface cellulaire pour être présenté au LyT CD8+ (Neefjes et al., 2011).

Les Ag exogènes, après leur internalisation, sont fragmentés par des protéases dans l'endosome. Les chaînes α et β du CMH II ainsi que la chaîne invariante Li sont synthétisées et assemblées dans le RE, avant d'être transportées jusque dans l'endosome par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi. C'est dans l'endosome que le peptide antigénique va remplacer le peptide invariant dans le sillon du CMH II, avant que le complexe soit transporté à la surface de la cellule pour interagir avec les LyT CD4+ (Neefjes et al., 2011).

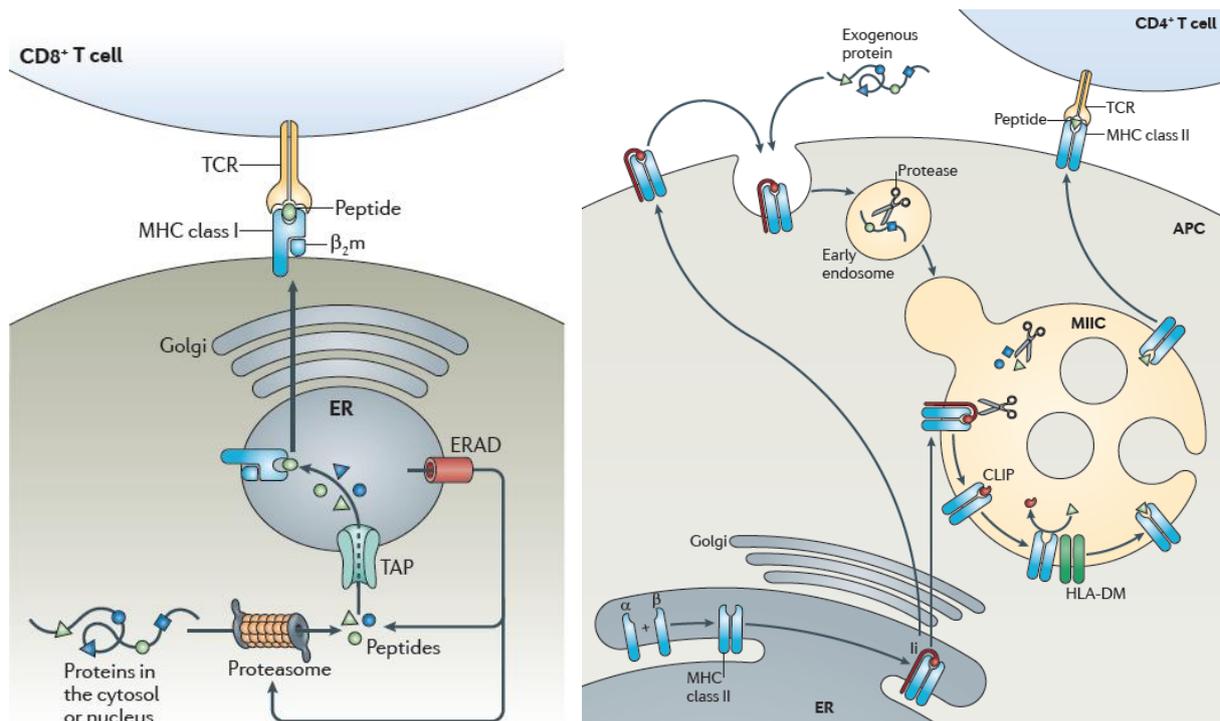


Figure 9: Voies de présentation des Ag par les DC.
Neefjes et al., 2011

En plus de ces deux voies classiques de présentation des Ag, des voies de présentation croisée, ou « cross-présentation » ont été décrites. Ce type de présentation permet le chargement d'Ag exogènes par les CMH I, ou bien la présentation d'Ag cytoplasmiques par le CMH II. Cette présentation croisée est particulièrement importante dans le cas de la réponse antivirale, où elle permet aux CPA d'induire une réponse CD8+ contre les virus qui n'infectent pas directement les CPA. Cette présentation croisée permet également le développement d'une réponse antitumorale lorsque les Ag ne sont pas exprimés par les CPA.

2.2. La maturation et la migration des cellules dendritiques

La maturation des DC est une étape fondamentale pour l'induction de la réponse immunitaire. Suite à un stimulus, les DC immatures subissent des modifications morphologiques et fonctionnelles qui leur confèrent la capacité d'activer les LyT naïfs spécifiques des Ag qu'elles présentent. La maturation des DC peut être induite par des médiateurs pro-inflammatoires endogènes ou par des ligands qui se fixent sur des récepteurs tels que les TLR et les NLR (Nod

Like Receptor), ou encore par une interaction avec un LyT exprimant le CD40 ligand (Banchereau et al., 2000).

Le processus de maturation induit une modification de la morphologie des cellules par un changement du cytosquelette. Les DC perdent leur forme initiale caractérisée par de larges feuillettes, pour acquérir une structure en étoile constituée de longs prolongements cytoplasmiques appelés dendrites. Elles diminuent aussi l'expression des FcγR et du récepteur au mannose (CD206) ainsi que leur capacité d'endocytose, avec une augmentation de l'expression de CD208 (DC-LAMP), une protéine lysosomale qui participe au chargement de l'Ag sur les molécules CMH (Flacher et al., 2006; De Saint-Vis et al., 1998).

Les DC ont une localisation différente selon leur état de maturation. Les DC immatures sont présentes dans les tissus périphériques et au cours du processus de maturation, elles acquièrent la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Griffith et al., 2014). Cette mobilité dépend de l'expression de récepteurs aux chimiokines, qui diffère selon l'état de la DC, et de l'expression des chimiokines par d'autres cellules des tissus et organes. En effet, la DC immature exprime principalement des récepteurs de chimiokines inflammatoires tels que CCR1, CCR2, CCR5 et CCR6 (Griffith et al., 2014). Elle sera ainsi attirée par des chimiokines telles que CCL3 (MIP-1α) et CCL5 (RANTES), sécrétées par les macrophages présents sur un site inflammatoire. Après capture d'un Ag, la maturation des DC se traduit notamment par une modification de la nature des récepteurs de chimiokines. Il y aura alors une diminution des récepteurs CCR1, CCR5, et une expression *de novo* de CCR7 (Griffith et al., 2014). Les chimiokines CCL19 et CCL21 liant ce dernier déterminent la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires. Il a en effet été observé que chez des souris KO pour ces deux chimiokines, les DC sont incapables de migrer dans les ganglions drainants (Fancke and O'Keefe, 2013). Les DC sont également une source de chimiokines, les DC immatures sécrétant constitutivement CCL18 et CCL20, tandis que les DC matures peuvent sécréter de nouvelles chimiokines telles que CCL2, CCL3 ou CXCL10 (Kaisho, 2012). Les modifications phénotypiques et fonctionnelles que subissent les DC au cours de leur maturation sont résumées dans la figure 10.

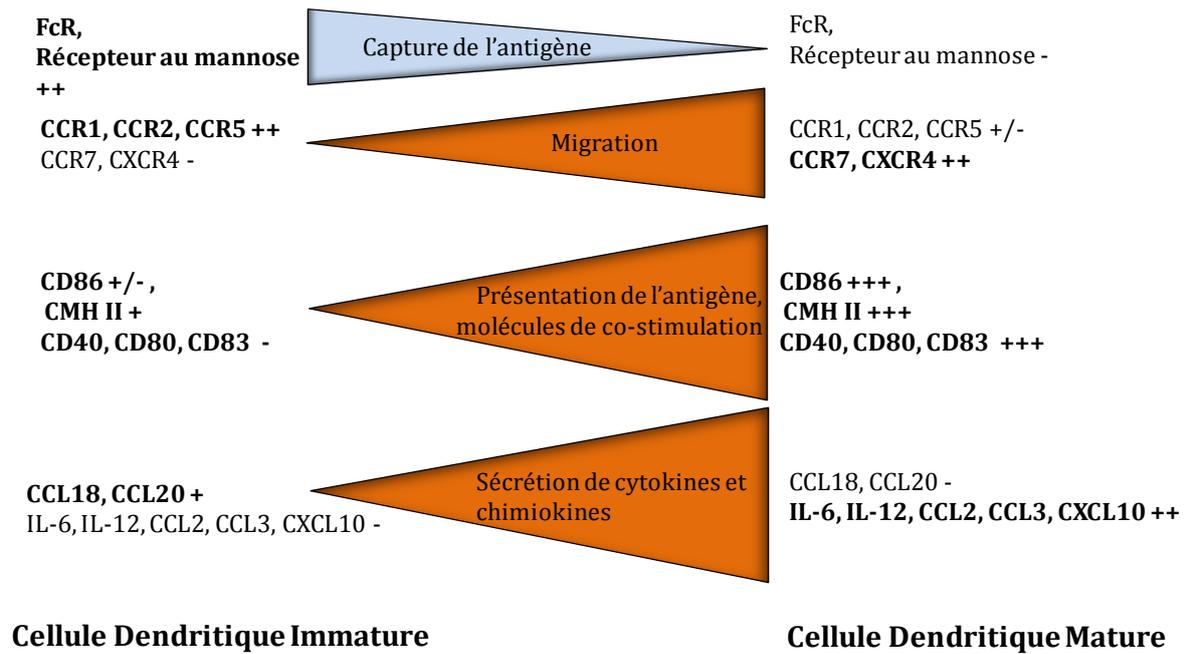


Figure 10: Expression de cytokines, chimiokines et marqueurs de surface par les cellules dendritiques immatures ou matures.

2.3. Activation et orientation des lymphocytes T

Après leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, les DC matures ont pour fonction majeure l'activation des LyT spécifiques. Elles expriment des molécules d'adhérence cellulaire (comme CD54), des molécules de co-stimulation de la famille B7 (CD80, CD86, PD-L2, ICOS-L) et de la famille du TNF (CD137/4-1BBL, CD134/OX40L, CD70). La maturation des DC entraîne également la production de diverses chimiokines et cytokines qui vont modifier la migration et l'activation des LyT (Fancke and O'Keefe, 2013).

L'interaction DC/LyT est tout d'abord médiée *via* le complexe CMH/peptide et le récepteur des LyT (TCR). Dans les premières heures suivant l'entrée des DC dans les OL les interactions DC/LyT ne seront que transitoires (inférieures à 10 minutes), tandis qu'elle sera prolongée (supérieure à 30 minutes) (Celli et al., 2005). Cette interaction, soutenue ou intermittente, va permettre d'engager l'entrée en mitose et la différenciation des LyT vers un phénotype effecteur et mémoire. L'activation des LyT passe par la formation d'une synapse avec la DC, qui correspond à une réorganisation de la distribution des protéines de surface, ainsi que des protéines de signalisation, de transport intracellulaire et du cytosquelette. Elle se forme dans la zone de contact entre les membranes des deux cellules, où se concentrent les molécules d'adhésion, les molécules de CMH et les TCR, les molécules de co-stimulation et dans l'espace intracellulaire, les cytokines sécrétées par les deux partenaires (Fooksman et al., 2010).

La chronologie d'interaction entre la DC et le LyT est la suivante (figure 11): l'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide constitue le **premier signal d'activation**. Celui-ci définit la spécificité de la réponse immunologique, la combinaison TCR/CMH-peptide étant unique. Ce signal n'est cependant pas suffisant pour activer complètement le LyT. En effet, un engagement du TCR seul induit une apoptose ou une anergie du LyT. L'interaction de quelques complexes CMH-antigène/TCR initie alors des modifications du cytosquelette, induisant une redistribution d'autres TCR et des molécules de co-stimulation à la surface des LyT (Mempel et al., 2004). La formation de la synapse est ensuite consolidée par l'interaction forte entre molécules d'adhésion, telles que LFA-1 et ICAM 2/3, exprimées à la surface du LyT, et ICAM-1 (CD54) et DC-SIGN (CD209), exprimées sur la DC mature. Le nombre de complexes TCR/CMH-peptide engagés va moduler la fixation initiale, pour sa rapidité et sa stabilité (Taflin et al., 2012).

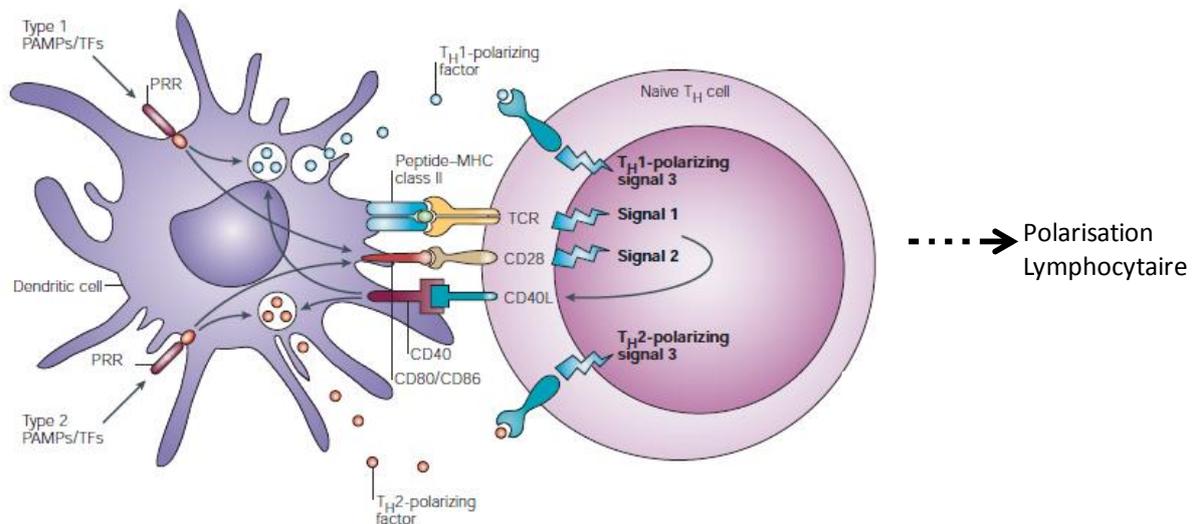


Figure 11: La synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T.
D'après Kapsenberg, 2003

Les molécules de co-stimulation vont ensuite être recrutées au niveau de la synapse pour renforcer le dialogue entre le LyT et la DC, ce qui constitue le **second signal d'activation** (Mempel, 2004). Un nombre limité de récepteurs de co-stimulation sont exprimés par les LyT naïfs et agissent de façon synergique avec le signal TCR lors du priming des LyT. La molécule CD28, exprimée de manière constitutive sur les LyT est requise pour le priming du LyT naïf. Elle interagit avec les molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimées par la DC mature. L'engagement de CD28 augmente l'expression d'IL-2 et de Bcl-XL par le LyT, le protégeant ainsi du signal apoptotique induit par l'engagement du TCR. Parmi les autres molécules de co-stimulation, on retrouve CD40 exprimé par la DC qui, en se liant à CD40L

(CD154), induit une production de cytokines, en particulier d'IL-12, et également l'expression de Ox40, une autre molécule de co-stimulation sur le LyT (deLuca and Gommerman, 2012). Cette dernière, dont le ligand Ox40-L (CD252) est exprimé à la surface des DC, renforce l'expression de CD80 et CD86 par la DC (Chen et al., 1999). D'autres molécules ont également été impliquées dans la co-stimulation des LyT, tels que le ligand Inducible T cell CO-Stimulator (ICOS-L), pouvant interagir avec CD28 ou ICOS à la surface du LyT (Chen and Flies, 2013). Enfin, la molécule CD70 interagit avec CD27, exprimée constitutivement par les LyT naïfs. CD27 semble important pour la production d'IFN γ par les LyT (Bakdash et al., 2013). L'ensemble des molécules de co-stimulation exprimées par les LyT, ainsi que leurs ligands sur les DC sont représentés dans la figure 12.

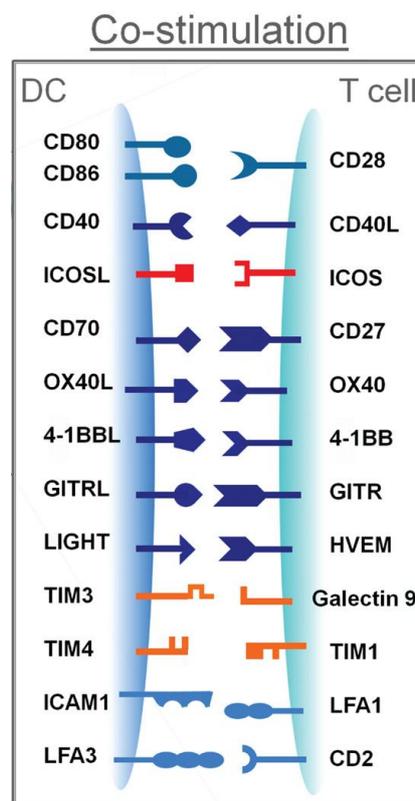


Figure 12: Les principales molécules de co-stimulation sur les cellules dendritiques et lymphocytes.

Bakdash et al., 2013

En plus des molécules de co-stimulation, DC et LyT présentent à leur surface des partenaires moléculaires permettant de délivrer un signal inhibiteur intracellulaire dans les LyT, contrôlant ainsi une activation excessive. Certains ligands peuvent s'avérer stimulateurs ou inhibiteurs en fonction du récepteur qu'ils lient. Par exemple, lorsque CD80 et CD86 lient CD28, un signal co-stimulateur est induit dans le LyT. Cependant, ces molécules présentent une affinité plus importante pour la molécule CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4), qui permet au contraire de délivrer un signal inhibiteur dans le LyT. Cette molécule est particulièrement

importante pour lutter à la fois contre l'auto-immunité spontanée, mais également en agissant comme frein dans l'activation des réponses T. En effet, des souris déficientes pour le gène codant pour *ctla4* développent un syndrome lymphoprolifératif, avec une infiltration de LyT polyclonaux dans les organes qui est létale. L'interaction entre CTLA-4 et CD80 ou CD86 va donc permettre de contrôler la réponse immune, en induisant l'anergie des LyT activés (Chappert and Schwartz, 2010; Greenwald et al., 2001). Le mécanisme avancé est une modification de l'activité catabolique de la DC par augmentation de l'expression de l'Indoleamine 2,3-DiOxygenase (IDO) qui dégrade le tryptophane ; cet appauvrissement en tryptophane réduirait la capacité stimulatrice des DC. Ceci conduirait à l'inhibition de la réponse T en inhibant la prolifération des LT et/ou en induisant leur apoptose par les catabolites du tryptophane (Chen, 2004; Raker et al., 2015). D'autre part les lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4+CD25+ expriment fortement CTLA-4, ce qui leur permet de réduire la capacité stimulatrice des DC. Les Treg peuvent également inhiber directement les LyT effecteurs par une interaction CTLA-4 (exprimé par le Treg)/CD80-CD86 (exprimé par le LyT effecteur)(Bakdash et al., 2013).

D'autres couples de molécules-dont le rôle ne sera pas détaillé ici- ont été décrits comme inducteurs d'un signal inhibiteur dans les LyT, et sont représentés dans la figure 13.

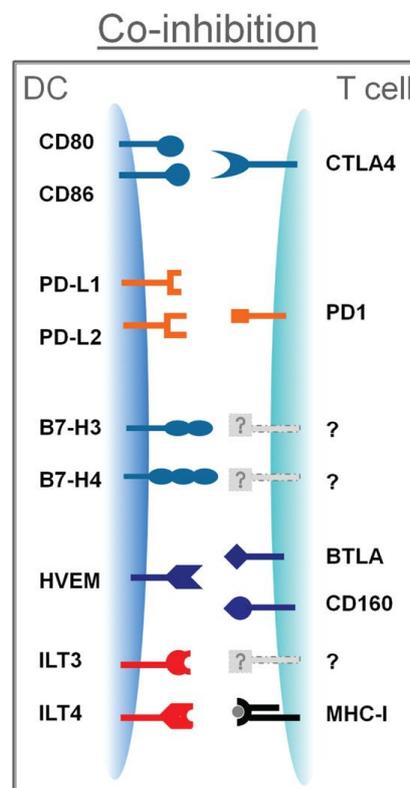


Figure 13: Molécules co-inhibitrices sur les cellules dendritiques et lymphocytes T
Bakdash *et al.*, 2013

Enfin, un **troisième signal d'activation** sera délivré aux LyT via les cytokines produites par les DC matures. Celles-ci vont alors orienter la différenciation des LyT vers une réponse T helper détaillée dans le paragraphe suivant.

Les différents stimuli issus de l'environnement des DC les orientent vers un phénotype particulier caractérisé par la sécrétion de cytokines, et cette plasticité va déterminer à son tour une polarisation de la réponse LyT CD4+ induite (Magombedze et al., 2013), (Figure 14).

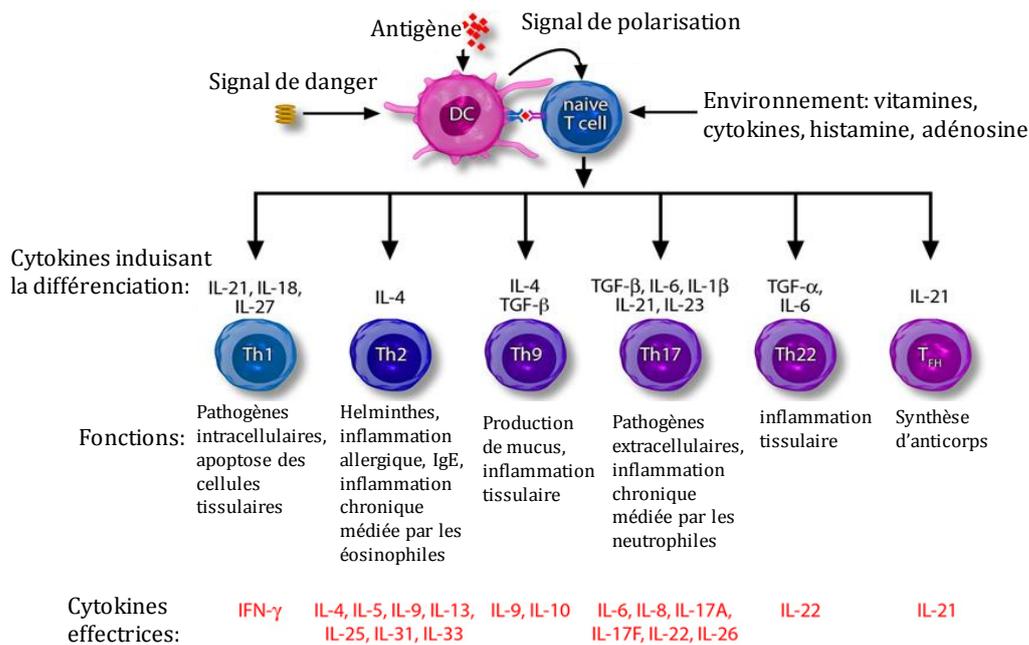


Figure 14: Polarisation des LyT CD4+ selon les cytokines sécrétées par les DC.
D'après Akdis *et al.*, 2012

Ainsi, en réponse à des pathogènes intracellulaires bactériens, viraux ou parasitaires, la DC va principalement sécréter de l'IL-12, de l'IL-8 et des interférons de type I (IFNα et IFNβ), qui induiront une réponse de type Th1, avec des LyT principalement sécréteurs d'IFNγ. Par ailleurs, il a été montré que la chimiokine CXCL10 (ligand de CXCR3) sécrétée par les DC permet également la polarisation Th1 en induisant une transcription abondante du facteur T-bet et la sécrétion d'IFNγ (Romagnani et al., 2005).

La reconnaissance d'allergènes ou de parasites extracellulaires par les DC va conduire à la sécrétion d'IL-4 et de CCL2 qui oriente les LyT vers un phénotype Th2. De plus, l'interaction CD40/CD40L va induire une seconde interaction entre DC et LyT via OX40L et OX40, qui va

également favoriser cette polarisation. Les LyT vont alors exprimer le facteur de transcription GATA-3 et ainsi libérer de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Ces cytokines vont favoriser la production d'IgE et d'IgG1 par les LyB, ainsi que l'activation des éosinophiles et des mastocytes pour éliminer les pathogènes extracellulaires (Magombedze et al., 2013). Par ailleurs, il a été montré chez la souris que la production d'IL-33 par les DC, suite à un pontage des FcγR, conduisait à la mise en place d'une réponse Th2 (Tjota et al., 2014).

La force du signal TCR est un élément clé dans la différenciation Th1/Th2 *in vitro*. Celle-ci se définit d'une part sur la base de la quantité de peptides présentés, et d'autre part sur l'affinité du complexe peptide/CMH pour le TCR (van Panhuys, 2016). Généralement, un signal faible va conduire à une polarisation Th2, tandis qu'un signal fort aboutira à une polarisation Th1 (Yamane and Paul, 2013). Par ailleurs, il est maintenant acquis que le temps d'interaction entre la DC et le LyT affecte la polarisation du LyT. En effet, une interaction prolongée entre les deux cellules va induire la formation de Th1, alors qu'une interaction plus courte induira des Th2 (van Panhuys et al., 2014).

Au cours des années, d'autres sous-populations de LyT CD4⁺ ont été décrites : les Th17, les Th22, Th9, T follicular helper (Tfh) et T régulateurs (Treg). Les Th17 sont induits en présence d'IL-23, de TGFβ ou d'IL-6 (Lee, 2012), ils expriment le facteur de transcription RORγt et sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22. Les Th22 quant à eux, ne produisent que de l'IL-22. Ces deux sous-populations sont impliquées dans la protection contre les bactéries extracellulaires. Les Th17 sont également impliqués dans les pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (Kushwah and Hu, 2011), mais également dans le rejet aigu lors de transplantations, aussi bien chez la souris que chez l'homme (Taflin et al., 2012). Les Th9 qui se différencient en présence d'IL-4 et de TGFβ (Veldhoen et al., 2008), producteurs d'IL-9, favorisent une réponse inflammatoire, notamment dans l'asthme allergique (Kerzerho et al., 2013). Enfin, les Tfh vont être recrutés dans les centres germinatifs où la production d'IL-21 aide à la prolifération et la différenciation des LyB en plasmocytes (Crotty, 2011).

En plus de leur capacité à induire une réponse immune, les DC participent au maintien de la tolérance immunitaire périphérique, par l'activation de Treg (Bilate and Lafaille, 2012). Deux groupes de Treg ont été décrits : les Tregs dits « naturels » et les Tregs « induits ». Les Tregs naturels acquièrent leur fonction directement dans le thymus, au cours de leur différenciation. Initialement, ils étaient identifiés sur la base de l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3), et de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Cependant, il est maintenant connu que les T activés peuvent également exprimer Foxp3. Les Tregs induits sont produits en périphérie ou *in vitro* à partir de LyT naïfs et sont divisés en sous-populations :

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ induits, les Treg Tr1 et les Treg Th3. De nombreux facteurs ont été impliqués dans la génération de Tregs Foxp3⁺ induits :IDO, qui catalyse et épuise le tryptophane de l'environnement extracellulaire, l'acide rétinoïque, métabolite de la vitamine A, la vitamine D, le TGFβ ou encore l'IL-10. Ces dernières cytokines sont notamment secrétées par les DC tolérogènes, induites par certains facteurs immunosuppresseurs, et qui expriment des molécules inhibitrices/tolérogènes comme PDL-1, et les ILT3 et ILT4 (Immunoglobulin-like transcripts). *A contrario*, ces DC sécrèteront peu de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 ou encore le TNFα. Les facteurs responsables de l'induction de DC tolérogènes peuvent être endogènes, comme l'IL-10, le TGF-β ou CCL18, ou pharmacologiques, comme la vitamine D3, les corticostéroïdes, la rapamycine, la cyclosporine, le tacrolimus ou encore l'acide rétinoïque (Raker et al., 2015).

Enfin, différentes études montrent que la présentation de faible niveau d'antigène, associée à une absence de molécule de co-stimulation et de stimuli cytokinique induit la différenciation de Tregs aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Maldonado and Andrian, 2010).

2.4. Les voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques

Le rôle de CPA implique que la DC soit capable de détecter la présence d'éléments néfastes dans l'organisme, ou signaux de danger. La notion de signal de danger a été établie dans les années 1990 par Polly Matzinger. Elle introduit un nouveau concept : le système immunitaire n'a pas pour but premier de discriminer le soi du non-soi, mais de détecter un danger et d'en protéger l'organisme (Matzinger, 1994). Pour cela, les cellules immunitaires sont dotées de Pattern Recognition Receptors (PRR), très largement représentées au sein des DC. Ces récepteurs peuvent aussi bien être extracellulaires qu'intracellulaires, et sont divisés en différentes familles : les TLR (Toll Like Receptor), des NLR (NOD-like receptor), des RLR (RIG-I like receptor) et des CLR (C-type lectine receptor). Les PRR permettent la reconnaissance, par les DC, des signaux de danger associés aux pathogènes (PAMP) et des signaux de danger associés aux molécules endogènes (DAMP).

L'interaction d'un PAMP ou d'un DAMP avec un récepteur va conduire à la maturation de la DC. Celle-ci est orchestrée par différentes voies de signalisation, plus ou moins communes en fonction des récepteurs engagés (Takeuchi and Akira, 2010).

2.4.1 Les voies induites par l'engagement des Toll like receptors (figure 15)

A ce jour, dix TLR ont été identifiés chez l'Homme, et douze chez la souris. La plupart de ces TLR sont extracellulaires. Néanmoins, les TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 se retrouvent au niveau de la membrane endosomale (Schaefer, 2014). La diversité de ces récepteurs permet au système immunitaire de détecter un panel large de PRR (Tableau 7) (De Nardo, 2015).

TLR	Agonistes	Ligands endogènes
TLR1	Lipoprotéines (bactéries, mycobactéries) Peptidoglycanes (bactéries Gram positif)	Inconnu
TLR2	Lipoprotéines, glycolipides, zymozan	Versican
TLR3	ARN double brin, Poly I:C, Poly A:U	ARN messenger
TLR4	LPS (bactéries Gram négatif) Dérivés du lipide A	Lipoprotéines oxydées de faible densité, β -amyloïdes
TLR5	Flagelline (bactéries flagellées)	Inconnu
TLR6	Lipoptides	Lipoprotéines oxydées de faible densité, β -amyloïdes
TLR7	ARN simple brin, imidazoquinoline, resiquimod, imiquimod	Complexes Immuns, ARN du soi
TLR8	ARN viral	Complexes Immuns, ARN du soi
TLR9	Motif CpG (bactéries), ADN	Chromatine
TLR10	Inconnu	Inconnu

Tableau 7: Les différents ligands des TLR humains.
De Nardo, 2015

Les TLR sont exprimés de manière différentielle par les DC. Les pDC par exemple expriment principalement les TLR7 et TLR9, tandis que les cDC expriment la plupart des TLR (TLR1 à TLR6, TLR8 et TLR10).

L'engagement des différents TLR va conduire à l'activation de facteurs de transcription communs tels que NF κ B, AP-1 ou les IRF (Interferon Regulatory Factors). Ceci s'effectue selon deux voies de transduction : une voie dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) et une voie indépendante de MyD88 (Sasai and Yamamoto, 2013).

MyD88 est l'une des cinq molécules adaptatrices des TLR, à l'exception du TLR3. Elle est indispensable à la synthèse d'IL-6 et d'IL12p40. La présence d'un domaine TIR (Toll-interleukin 1 receptor) lui permet d'interagir avec le TLR et un domaine de mort, ce qui mène au recrutement de kinases IRAK (interleukin-1 receptor associated domain), dont 4 molécules sont actuellement décrites (IRAK-1, IRAK-2, IRAK4 et IRAK-M), IRAK-1 et IRAK-4 étant les seules à

disposer d'une activité intrinsèque. Le recrutement d'IRAK-4 par MyD88 induit celui d'IRAK-1 entraînant par la suite sa liaison avec la molécule TRAF-6 (*TNFR-associated factor-6*). Le complexe TRAF-6/IRAK-1 se désengage ensuite du TLR pour interagir avec le complexe TAK1 (*TGFβ-associated kinase-1*) / TAB1 (*TAK-1 binding protein-1*) / TAB2 situé au niveau de la membrane plasmique. IRAK-1 est ensuite dégradé et le complexe restant subit une translocation dans le cytosol où il se lie avec UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme-13*) et UEV1A (*ubiquitin-conjugatin enzyme E2 variant 1*). Ceci mène à l'ubiquitination de TRAF-6 induisant l'activation de TAK1. Cette dernière est une protéine pivot dans la transduction ultérieure du signal. En effet, TAK1 phosphoryle la protéine IKK (*inhibitor of nuclear factor-κBkinase*) qui, à son tour, phosphoryle les protéines IκBs, libérant ainsi le facteur de transcription NFκB (figure 14) (O'Neill et al., 2013). Mais TAK1 permet aussi l'activation des MAPK dont p38MAPK, JNK, et ERK. En effet, le complexe TAK-1/TAB1/TAB2 phosphoryle les kinases MKK4/7 et MKK3/6 qui activent JNK ou p38MAPK, respectivement.

Les TLR activent aussi la MAPKKK Cot/Tpl2 entraînant ainsi l'activation de MEK1/2 qui, à son tour, phosphoryle ERK (Chuang et al., 2011). Les TLR induisent enfin également la voie de la PI3K par la formation d'un complexe entre MyD88 et PI3K. Ce complexe va ensuite induire la phosphorylation du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en phosphatidyl inositol triphosphate (PIP3) menant à l'activation de PDK-1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1) puis à celle d'Akt (Protéine Kinase B) (Laird et al., 2009).

L'engagement du TLR3 et du TLR4 induit le recrutement de la molécule adaptatrice TRIF (*TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN*), appelée aussi TICAM-1, qui active une voie de signalisation indépendante de MyD88. TLR3 recrute TRIF directement alors que TLR4 le fait par l'intermédiaire de la molécule adaptatrice TRAM (*TRIF Adapter Protein*). TRIF induit l'activation de TRAF-6 ou de RIP-1 (*receptor interacting protein-1*) entraînant l'activation des IKK afin d'activer NF-κB. Par ailleurs, TRIF interagit également avec IKK ε et TBK-1 (*TANK-binding kinase 1*) phosphorylant ainsi le facteur de transcription IFR3 nécessaire à la production des IFN (O'Neill et al., 2013).

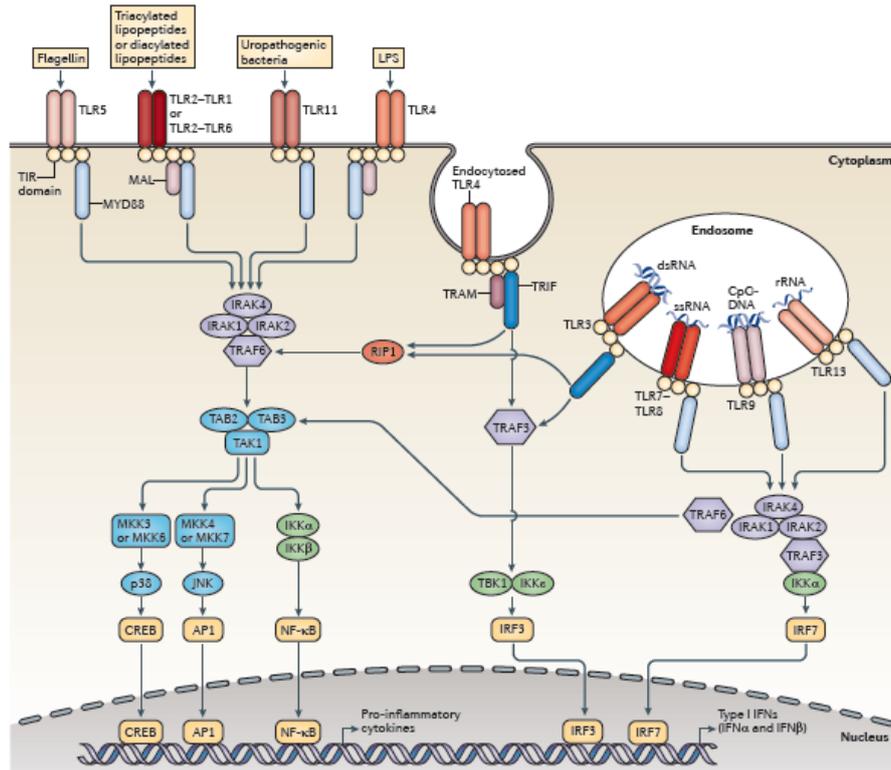


Figure 15: Voies de signalisation activées dans les cellules dendritiques par les TLR.

O'Neill *et al.*, Nat Rev Immunol, 2013

2.4.2 Les voies induites par les récepteurs Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like (NLR)

A l'instar des TLR, les NLR sont capables de détecter les composants microbiens, et notamment les peptidoglycanes dérivés des bactéries. Les NLR sont exprimés sur les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes, les macrophages et les DC ainsi que sur des cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Ils sont composés d'une structure tripartite. La partie N-terminale est constituée d'un domaine variable d'interaction protéine-protéine, domaine CARD (caspase recruitment domain), PYD (pyrin domain), acid transactivating ou BIR (baculovirus inhibitor repeat), qui est crucial pour la signalisation en aval (Chen *et al.*, 2009). Le second domaine est un domaine NOD (Nucleotide-binding Oligomerization), permettant l'auto-oligomérisation au cours de l'activation. Le domaine C-terminal est un domaine LRR (Leucine-Rich Repeat), qui détecte les PAMPs (Chen *et al.*, 2009). Les NLR comptent vingt-deux membres divisés en 4 sous-familles selon la composition de leur domaine N-terminal :

- **NLRA**, avec un domaine de transactivation acide : CIITA. Il est impliqué dans la transcription du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II)

- **NLRB**, avec un domaine N-terminal BIR, composé d'un seul membre : NAIP

- **NLRC**, avec un domaine N-terminal CARD, est composé de 6 membres : NOD1, NOD2, NLRC3 (ou NOD3), NLRC4 (ou NOD4), NLRC5 (ou NOD5), NLRX. Les récepteurs NOD1 et NOD2 sont connus pour induire l'activation des voies NF- κ B et MAPK, permettant ainsi l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, ou encore de molécules d'adhésion (Chen et al., 2009).

- **NLRP**, avec un domaine N-terminal PYR, est composé de 14 membres : NLRP1 à 14

Dans la famille des NLRP, le NLRP3 est celui qui a le plus été étudié. En induisant la formation de l'inflammasome, il aboutit à la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-18 et d'IL-33. L'activation de l'inflammasome requiert le recrutement de la protéine ASC (adaptor protein apoptosis speck protein with caspase recruitment) pour activer la caspase 1 qui pourra alors cliver les formes inactives d'IL-1 β et d'IL-18 en formes actives. NLRP3 est activé en réponse aux DAMPs, tels que l'ATP extracellulaire, par l'intermédiaire du récepteur purinergique P2X7 (Purinergic receptor P2, ligand-gated ion channel 7), l'efflux d'ions K⁺, ou des cristaux d'urate induisant une libération du contenu lysosomal (Schroder and Tschopp, 2010).

2.4.3 Les voies induites par les récepteurs de la famille des lectines de type C

Les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR) forment une famille hétérogène de protéines solubles et transmembranaires caractérisées par leur domaine lectine de type C. Ceux-ci se lient à un grand nombre de microorganismes dont les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons. Cette interaction permet l'internalisation des agents pathogènes, et induit une signalisation intracellulaire (Hardison and Brown, 2012). Les DC expriment un large répertoire de CLR, certains étant spécifiques d'un sous-type de DC, comme la langerine dans les LC ou BDCA-2 sur les pDC, le DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin, CD209) quant à lui est exprimé sur les DC et les macrophages (Hardison and Brown, 2012).

La signalisation des CLR est complexe, et en partie dépendante du dialogue croisé avec la signalisation induite par d'autres PRR comme les TLR. Les CLR se répartissent en deux groupes. Le récepteur au mannose (CD206) et le DEC205 d'une part, et d'autre part un groupe formé par la dectin 1, la dectin 2, la Langerine ou encore DC-SIGN (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

Le récepteur mannose (CD206) joue un rôle majeur dans la phagocytose de certains pathogènes tels que *Mycobacterium kansasii*, *M. Tuberculosis*, *Francisella tularensis* et *C. albicans*. La phagocytose médiée par le CD206 est dépendante des RhoGTPases Cdc42 et RhoB (par l'intermédiaire de ROCK) (Zhang et al., 2004). Il apparaît que le CD206 nécessite la collaboration d'autres récepteurs pour induire une cascade de signalisation, du fait de l'absence de motif associé dans son domaine cytoplasmique. Il a notamment été observé que la co-expression du CD206 avec le TLR2 dans les cellules HEK293 induisait la production d'IL-8 en réponse à *P. carinii*, tandis que le CD206 seul ne modulait pas l'expression de la cytokine. A contrario, il a également été montré que ce récepteur pouvait inhiber la production d'IL-12 et augmenter la production d'IL-10 dans les DC stimulées par du LPS (Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

DC-SIGN reconnaît les pathogènes *via* leurs groupements mannose et fucose. DC-SIGN peut notamment activer la sérine/thréonine kinase RAF1 (par phosphorylation sur la Ser338), par l'intermédiaire des PAKs (p21-activated kinases), elles-mêmes activées par la famille des RhoGTPases. En étant également phosphorylé sur ses résidus Tyr140 et Tyr141 par les Src kinases, RAF1 va ensuite phosphoryler la sous-unité p65 de NF- κ B. Il est à noter que cette phosphorylation de p65 n'est rendue possible que suite à l'activation de la voie NF- κ B par les TLR (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

La dectine 2 peut interagir avec des adaptateurs tels que DAP12 ou le Fc γ R *via* des motifs ITAM, ainsi que des kinases telles que Syk. La Dectine 2 est importante pour la défense antifongique, en reconnaissant les mannanes α de *C. albicans* et les glycoprotéines de *Malassezia*. La signalisation médiée par la Dectine 2 va aboutir notamment à l'activation de la Phospholipase C γ 2, des voies MAPK et la sous-unité c-Rel de NF- κ B. Ce dernier va orienter la réponse T vers un phénotype Th17, par l'intermédiaire des cytokines IL-23 et IL-1 β (Kerscher et al., 2013).

2.4.4 Les voies induites par les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G

Les récepteurs pour la région Fc des immunoglobulines (FcR) sont subdivisés selon leur affinité pour les différents types d'immunoglobulines. Comme dit précédemment, 4 classes d'immunoglobulines ont été mises en évidence (IgA, IgE, IgG et IgM). Chaque classe d'Ig va être reconnue par une isoforme de récepteur Fc (Fc α , Fc ϵ , Fc γ respectivement). Ceci permet d'activer une/des fonction/s particulières/s selon l'isotype de l'anticorps reconnu, orchestrant ainsi la réponse adéquate à fournir selon le contexte immunitaire.

Les IgG sont les immunoglobulines les plus abondantes du sérum. 4 isotypes ont été mises en évidence chez l'homme, numérotées sur la base de leur abondance relative ([IgG] >

[IgG2] > [IgG3] > [IgG4]). Disposant de fonctions effectrices différentes, elles sont également reconnues différemment par les FcγR.

Les FcγRs humains comprennent le FcγRI (CD64), le FcγRIIa (CD32a), le FcγRIIb (CD32b), le FcγRIIc (CD32c), le FcγRIa (CD16a) et le FcγRIIIb (CD16b). A l'exception du CD16b, toutes ces isoformes sont des glycoprotéines membranaires de type 1 (Tableau 8). Leurs différences structurales aboutissent à une variation de leur affinité pour les différentes sous-classes d'IgG. Ces récepteurs présentent des domaines de ressemblance aux Ig (*immunoglobulin-like domains*) sur leur portion extracellulaire. Elle se poursuit par une région transmembranaire et une portion cytoplasmique en C-terminal. Les FcγRIA et FcγRIIIA disposent d'une structure multimérique qui comprend une chaîne α permettant la reconnaissance du ligand et un homodimère de chaîne γ de transduction du signal intracellulaire.

Nom	CD	Allèles	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Fonction principale
FcγRI	CD64	/	$6 \cdot 10^7$	Pas de liaison	$6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	Activation
FcγRIIA	CD32A	His 131	$5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	Activation
		Arg 131	$3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	
FcγRIIB	CD32B	Ile 232	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	Inhibition
		Thr 232	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	
FcγRIIC	CD32C	Gln 13 Stop 13	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$	Activation
FcγRIIIA	CD16A	Val 158	$2 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^4$	$10 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	Activation
		Phe 158	$1 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	
FcγRIIIB	CD16B	Na1 Na2	$2 \cdot 10^5$	Pas de liaison	$1 \cdot 10^6$	Pas de liaison	Recyclage et transport des IgG
FcγRFcRn	/	/	$8 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	

Tableau 8: Récepteurs Fc pour les IgG chez l'homme.

Modifié d'après Guilliams et al. 2014. Le polymorphisme génétique est indiqué par sa position dans la séquence et par l'acide aminé substitué. Les valeurs d'affinité des différents isotypes pour leurs récepteurs sont indiquées, et exprimées en M^{-1}

Les FcγR sont exprimés de manière différentielle par les monocytes, les macrophages et les différentes classes de DC, aussi bien en terme de type de récepteur qu'en intensité d'expression (figure 16). Néanmoins, on constate que l'ensemble des FcγR sont exprimés par les Dc dérivées de monocytes en condition inflammatoire (moDC). En revanche, les moDC différenciées *in vitro* expriment un faible niveau de FcγR1, et n'expriment pas le FcγR2C, deux récepteurs activateurs. Ceci peut amener un biais dans les expériences visant à déterminer d'une part le rôle de chaque FcγR dans l'interaction de la cellule avec un anticorps, et d'autre part l'effet activateur/inhibiteur d'un anticorps, ou complexe impliquant des anticorps.

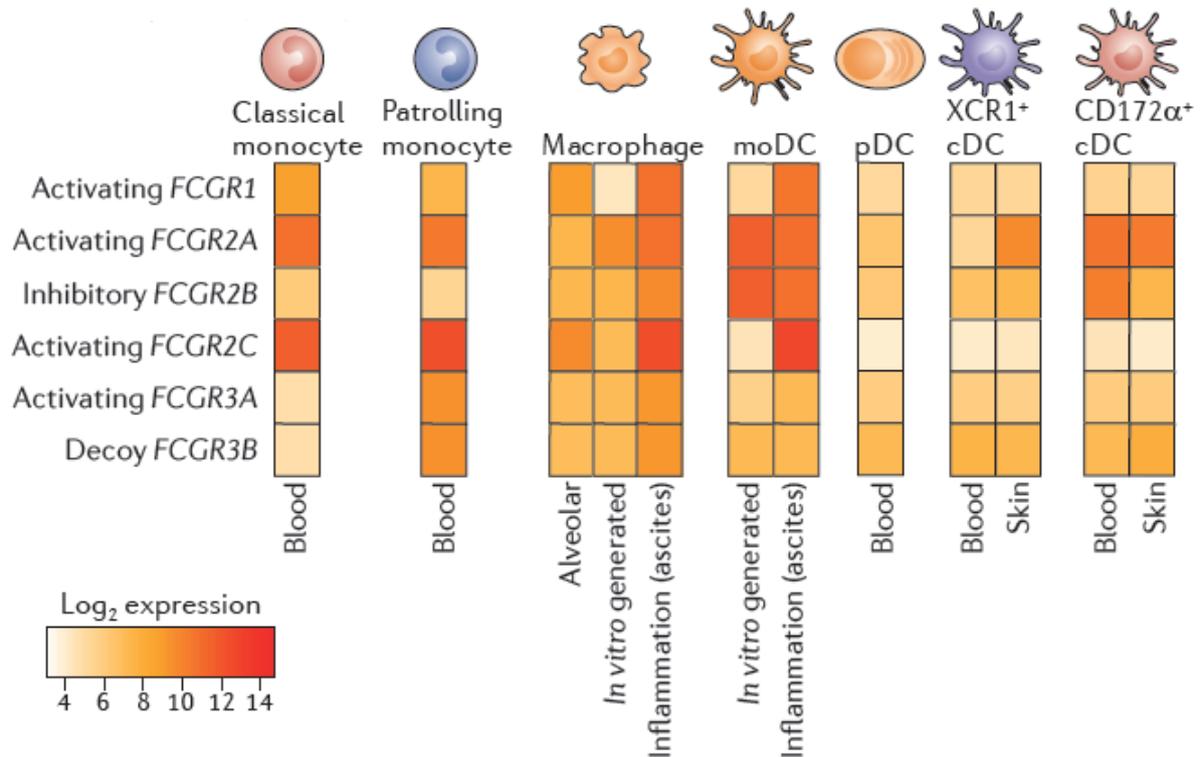


Figure 16: Expression des FcγR par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques chez l'Homme.

Guilliams et al. 2013

L'activation des FcγR nécessite une dimérisation ou une oligomérisation pour induire les voies de signalisation en aval des récepteurs. Ceci permet d'éviter une activation constitutive du récepteur par les Ig monomériques circulantes. L'engagement des FcγR induit la transduction d'un signal par différentes voies de signalisation aboutissant à l'activation de différentes fonctions cellulaires. Le récepteur lui-même va tout d'abord être phosphorylé sur des résidus tyrosine au niveau de l'ITAM, et ce par des protéines tyrosine kinases de la famille Src (Fgr, Lyn, Hck). La protéine de la famille Src impliquée dépend à la fois du type cellulaire, mais également du FcR (Nimmerjahn and Ravetch, 2007). La phosphorylation des ITAM permet ensuite le recrutement de deux protéines, Syk (spleen tyrosine kinase) et de ZAP-70 (Zeta chain-associated protein kinase-70). Celles-ci vont ensuite induire notamment l'activation de la PLC-γ (Phospholipase C- γ), de la sous-unité p85 de la PI3-kinase (phosphatidyl-inositol 3-kinase), ainsi que le recrutement de l'adaptateur Grb2. Ces protéines vont permettre la transmission du signal, en activant à la fois la protéine kinase Akt, la PKC (protein kinase C), ou différentes MAPK, comme MAPKp38 ou Erk (Nimmerjahn and Ravetch, 2008) (figure 17).

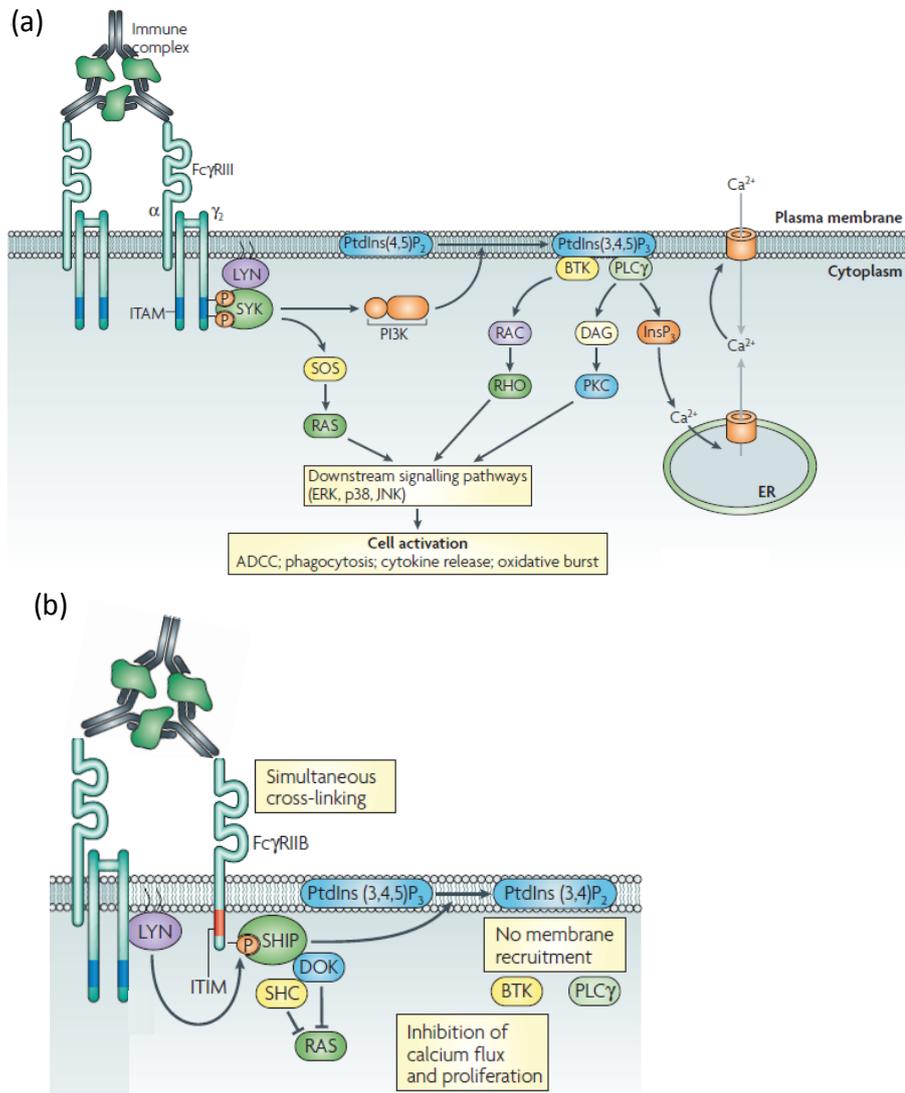


Figure 17: Voies de signalisation activées par les FcγR (a) activateurs et (b) inhibiteurs.
 Nimmerjahn et al., 2008. ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based-Activation Motif, SYK: Spleen Tyrosine Kinase, LYN: Lck/Yes novel tyrosine kinase, SOS: Son Of Sevenless, PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, BTK: Bruton's Tyrosine Kinase, PLCγ: PhosphoLipase C γ, DAG: DiAcyl-Glycerol, InsP3: Inositol-1,4,5-trisPhosphate, PKC: Protein Kinase C, SHIP : SRC-homology-2-domain-containing inositol-5- phosphatase, DOK : DOcking Protein, SHC : SH2-domain-containing transforming protein C.

Le ciblage des FcγRI et FcγRIII va conduire à la phagocytose des complexes immuns, qui seront alors dirigés vers le compartiment endosomal. La maturation de l'endosome, conduisant à son acidification va induire la dégradation des antigènes, qui seront alors chargés sur des molécules de CMHII, afin d'être présentés aux LyT CD4+. En se liant au FcRn, les complexes seront protégés de la dégradation. Les antigènes seront alors libérés dans le cytosol. Ils seront alors dégradés par le protéasome. Les peptides seront transférés dans le Réticulum

Endoplasmique par le transporteur TAP1-2 où elles pourront être chargées sur des molécules de CMH-I, afin d'être présentés aux LyT CD8⁺ (Regnault et al., 1999).

Le rôle majeur du FcγRIIB est de réguler les signaux activateurs, ce qui a lieu lorsque ce récepteur se dimérise avec un récepteur activateur. Ceci va conduire à la phosphorylation du domaine cytoplasmique ITIM du récepteur par la kinase LYN. Cette phosphorylation va permettre la fixation de phosphatases, les SHIP (Sh2-domain-containing inositol phosphatases), en particulier SHIP1. Celles-ci vont déphosphoryler le PIP3 formé en PIP2, inhibant ainsi le recrutement de la PLCγ et de BTK, et ainsi la signalisation sous-jacente (Smith and Clatworthy, 2010). Le FcγRIIB existe sous deux isoformes, le FcγRIIB1 (exprimé uniquement par les cellules B) et le FcγRIIB2, du à un épissage alternatif, le FcγRIIB2 présentant un domaine cytoplasmique plus court (Brooks et al., 1989). Ce dernier peut notamment, dans le macrophage et le monocyte inhiber la phagocytose de complexes immuns induite par les FcγRI et FcγRIIIa (Pricop et al., 2001; Tridandapani et al., 2002). Cependant, ce récepteur est également décrit comme capable d'induire la phagocytose de complexes immuns dans des cellules CHO transfectées (Miettinen et al., 1989).

Nous avons pu voir que le ciblage des PRR et des FcR conduisait à l'activation de nombreuses voies de signalisation. Parmi elles, les voies NF-κB, MAPK et PI3K jouent un rôle clé dans la maturation de la DC ainsi que dans l'internalisation des antigènes, nécessaire à leur présentation. Ces voies qui sont donc développées plus en détail ci-après.

2.4.5 La voie NF-κB (Figure 18)

La famille NF-κB est composée de plusieurs facteurs de transcription dimériques contenant un domaine RHD (Rel-homology domain). Cinq membres de la famille NF-κB ont été identifiés chez les mammifères : RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF-κB1, précurseur de p50), p100 (NF-κB2, précurseur de p52). La forme active de NF-κB la plus fréquente est composée de RelA et de p50. Sous forme homo ou hétérodimériques, les protéines NF-κB se lient au domaine κB se trouvant dans les promoteurs de gènes et régulent ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués aussi bien dans la prolifération cellulaire que dans l'inflammation et l'immunité (Oeckinghaus et al., 2011). NF-κB est régulé négativement par une famille de protéines, les IκB, composée de 7 membres. IκBα, IκBβ, IκBγ et IκBε qui empêchent la localisation nucléaire de NF-

κ B alors que Bcl-3, I κ B ζ et I κ BS, présents dans le noyau, interagissent avec NF κ B pour réguler son activité transcriptionnelle.

Initialement, NF- κ B est séquestré sous une forme inactive dans le cytoplasme par I κ B. La stimulation de la DC induit la transduction d'un signal aboutissant à l'activation de TAK1, ce qui va engendrer la phosphorylation d'I κ B par un complexe kinase IKK. Ce dernier est composé de deux molécules catalytiques : IKK α et IKK β et une molécule régulatrice NEMO (*NF κ B essential modulator*). Les protéines I κ B phosphorylées sont poly-ubiquitinylées et dégradées par le protéasome 26S, permettant à NF- κ B actif (p65 / p50) de migrer dans le noyau. Cette voie, dite classique ou canonique, est la principale voie d'activation de NF- κ B. Cette voie va conduire à une augmentation de la transcription de différentes cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 par exemple) et molécules d'adhésion ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) ou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), par exemple (Bonizzi and Karin, 2004). De nombreuses études montrent l'implication de la voie classique dans la production de diverses chimiokines, en réponse à différents ligands. Ainsi, il a été montré une implication de NF- κ B dans la production de CXCL10 dans des macrophages murins, et ce en réponse à un engagement du TLR4 (Kawai et al., 2001). Il a également été montré que le complexe p65/p50 était nécessaire à la production de CCL-2 en réponse au pontage des Fc γ R dans la lignée pro-myélo-monocytaire THP-1 (Alonso et al., 2000). La voie cRel/p50 quant à elle est cruciale pour l'expression de gènes impliqués dans l'interaction et l'activation des LyT, comme CD40, l'IL-12 et l'IL-18 (Wang et al., 2007).

Une voie alternative ou non canonique d'activation de NF- κ B peut être induite suite à l'engagement de CD40 ou certains membres de la famille du TNF α , conduisant à la formation de l'hétérodimère p52/RelB. La molécule p100, précurseur de p52, est retenue dans le cytoplasme par un domaine inhibiteur de la translocation nucléaire. Suite à une stimulation, l'ubiquitination de p100 entraîne sa dégradation partielle et la présence de p52 active. Cette dernière forme ensuite un hétérodimère avec RelB pour réguler l'expression de gènes cibles.

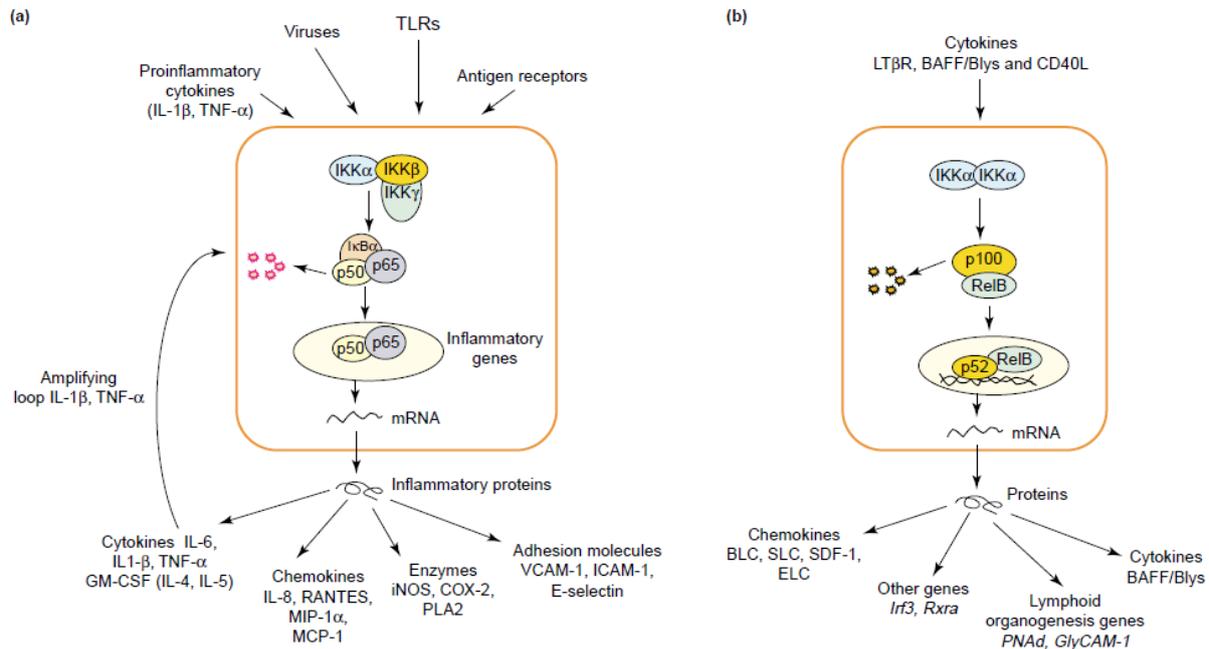


Figure 18: Voies de signalisation classique (a) et alternative (b) de NF-κB

De Bonizzi and Karin, 2004. BLC : B-Lymphocyte Chemoattractant, CD40L, CD40 ligand; COX-2, cyclooxygenase 2; ELC, Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand CC chemokine; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IKK, IκB kinase; IL-1b, interleukin-1b; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LT, lymphotoxin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1a, macrophage inflammatory protein-1a; NIK, NF-κB-inducing kinase; PLA2, phospholipase 2; SDF-1, stromal cell-derived factor-1a; SLC, secondary lymphoid tissue chemokine; TLRs, Toll-like receptors; TNF-a, tumor necrosis factor a; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

2.4.6 La voie des Mitogen Associated Protein Kinases

Les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) correspondent à une famille de protéines intervenant dans la transduction de signaux conduisant à la prolifération ou la différenciation cellulaire, ou encore à l'apoptose de nombreux types cellulaires. Elle joue également un rôle important dans la réponse immune, aussi bien au niveau de l'initiation de la réponse innée que dans la mise en place de la réponse adaptative, ainsi que dans la mort des cellules pour abolir cette réponse.

Selon le motif d'activation qui les compose (Thréonine-X-tyrosine), ces protéines peuvent être divisées en 3 groupes. On distingue ainsi ERK (motif Thréonine-Glutamate-Tyrosine), JNK (motif Thréonine-Proline-Tyrosine) et p38MAPK (motif Thréonine-Glycine-Tyrosine). Ces protéines sont impliquées dans une cascade de signalisation (Figure 19). Ainsi, elles sont initialement phosphorylées par des kinases, les MAPKK (ou MEK), elles-mêmes

phosphorylées par les MAPKKK (ou MEKK). Les MAPK vont ensuite phosphoryler différents substrats tels que des protéines kinases, des facteurs de transcription ou encore des phospholipases (Zhang and Dong, 2005).

a. p38 MAPK

La protéine p38 MAPK est activée aussi bien par la signalisation TLR que par la signalisation des FcγR et joue un rôle majeur dans l'induction de la maturation de la DC. Elle peut agir soit en induisant directement la transcription de différents gènes, soit en participant à la stabilisation de leur ARN messager. Ainsi, p38 MAPK participe à l'expression des molécules du CMH-II, de molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86), ainsi que de CD83, marqueur de maturation de la DC. Elle intervient également dans la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-12 et TNFα), ainsi que de différentes chimiokines, comme CXCL10 (Shen et al., 2006) ou CCL3 (Osawa et al., 2006). Par ailleurs, la p38 MAPK est impliquée dans la phosphorylation et donc l'activation de différents facteurs de transcription. ATF-1 (Activating Transcription Factor 1), ATF-2, MEF-2 (Monocyte Enhance Factor 2C) mais également NF-κB peuvent être activés par cette kinase (Sabio and Davis, 2014; Whitmarsh, 2010).

b. ERK

La protéine ERK semble réguler négativement la maturation des DC induite par un ligand TLR. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de ERK ne module pas voire induit une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation, d'activation et de présentation des antigènes après stimulation de la DC (Nakahara et al., 2006). D'autre part, ERK va avoir des effets opposés sur la production de cytokines. En effet, ERK va augmenter la sécrétion d'IL-1β, d'IL-10 et de TNFα, mais réguler négativement la production d'IL-2, d'IFNβ et l'activation d'iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase, enzyme impliquée dans la synthèse d'oxyde nitrique) (Arthur and Ley, 2013).

c. JNK

De manière similaire à la voie p38 MAPK, la voie JNK induit l'expression des molécules de maturation (CD83) et de co-stimulation (CD80, CD86 et CD54) suite à une stimulation par les TLR ou les FcγR (Arsenault et al., 2013; Okayama et al., 2003). En revanche, elle ne semble pas participer à l'expression de CD40 ou du CMH-II. Au niveau cytokinique, JNK favorise la sécrétion de TNF-α ainsi que l'IL12p70 dans les DC stimulées par le LPS, et intervient dans la production

de CXCL10 (Shen et al., 2006). A l'inverse, la voie JNK ne semble pas réguler la sécrétion d'IL-6 ni d'IL-12p40 (Nakahara et al., 2006).

2.4.7 La voie PI3K

La voie PI3K peut être activée en réponse à des PRR tels que les TLR, ou en réponse du ciblage des FcR.

Les PI3K appartiennent à la sous famille des lipides kinases et sont séparées en 3 classes selon leur spécificité de substrats et leurs mécanismes de régulation. La classe I est sous divisée en 2 groupes : la classe IA et la classe IB. Les PI3K de classe IA sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous unité p85 permettant leur interaction avec les récepteurs tyrosine kinases. Les PI3K de classe IB surtout exprimées par les cellules hématopoïétiques possèdent une sous unité catalytique p110 γ et une sous unité régulatrice p101 facilitant les interactions avec les protéines G associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Les PI3K de classe II et III sont encore mal caractérisées et ont pour substrat le phosphatidylinositol (Laar et al., 2012).

L'activation de la PI3K est induite par la phosphorylation de résidus Tyrosine dans le domaine SH2 (Src Homology) de la sous-unité p85. La voie PI3K semble réguler négativement l'activation des DC induite par les ligands de TLR. Ceci est dû au fait que la PI3K active Akt, qui va d'une part inhiber GSK3, protéine impliquée dans l'activation de NF- κ B. D'autre part, Akt inhibe de manière directe ou indirecte les MAPK p38, JNK et ERK (Figure 19) (Guha, 2002).

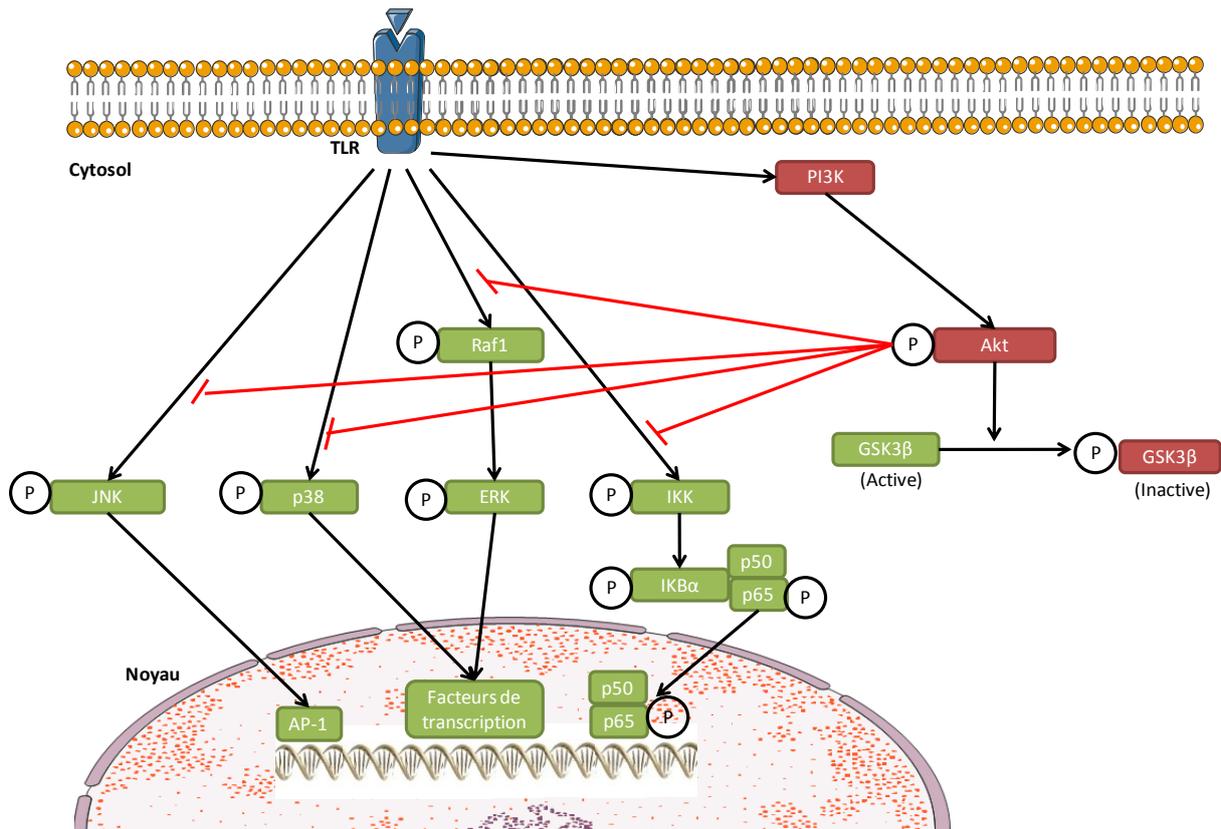


Figure 19: Effet de la PI3K sur les voies de signalisation activées en réponse à une stimulation TLR.
D'après Guha et al. 2002

2.4.8 La signalisation induite au cours de la phagocytose

L'internalisation est un évènement clé dans la mise en place d'une réponse immunitaire contre un antigène. Nous avons précédemment décrit les principaux mécanismes conduisant à la capture antigénique par les DC. Nous avons également abordé le rôle des PRR dans la mise en place de la réponse immunitaire. Ces récepteurs vont induire des voies de signalisation conduisant non seulement à l'activation de la DC (aussi bien en terme de production de cytokines que de l'expression de marqueurs de surface), mais déclenchant également le processus de capture antigénique et d'internalisation.

Ainsi, la PI3K est un élément clé dans la phagocytose, son inhibition conduisant à une abolition de l'internalisation de grosses particules ($>3\mu\text{m}$) (Flannagan et al., 2012). La PI3K va, en convertissant le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) et PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate), induire l'activation de Rac1. Rac1 va pouvoir, à l'aide des GTPases Arf, activer le complexe WAVE (WASP family veroprolin homologue), qui à son tour va activer le complexe Arp2/3, conduisant à la polymérisation de l'actine (Freeman and Grinstein, 2014;

Koronakis et al., 2011). Le complexe Arp2/3 peut également être activé par le facteur WASP, effecteur de la GTPase Cdc42 (Flannagan et al., 2012). L'ensemble de ces acteurs jouent un rôle fondamental dans la formation des « ruffles » membranaires (figure 20).

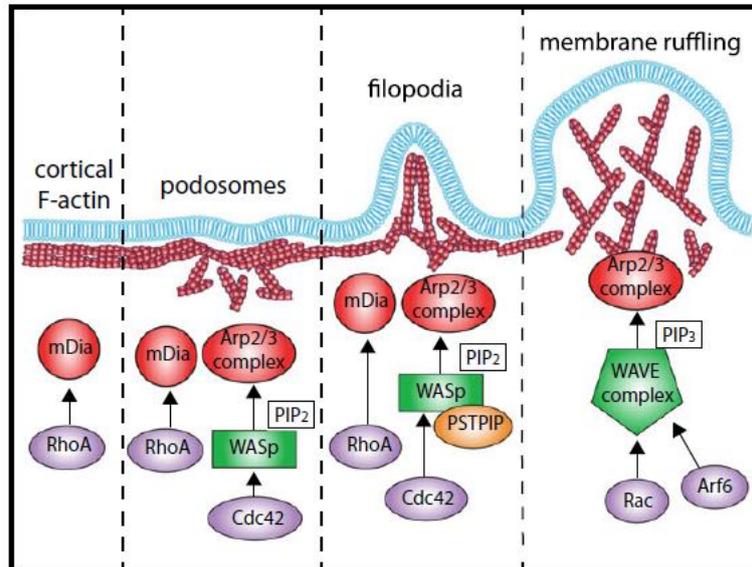


Figure 20: Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des "ruffles" membranaires.
Freeman and Grinstein, 2014.

La petite GTPase RhoA a été décrite comme essentielle dans la phagocytose induite par les intégrines (Flannagan et al., 2012). Elle est impliquée dans la polymérisation de l'actine par deux mécanismes. Le premier consiste en une activation de ROCK qui va stimuler la myosine II en phosphorylant ses chaînes légères. Le second va passer par le recrutement de la formine mDia1, les formines étant impliquées dans la polymérisation des extrémités des filaments d'actine (Flannagan et al., 2012; Freeman and Grinstein, 2014).

La p38 MAPK a également été décrite comme indispensable pour la phagocytose médiée par les TLR. En effet, il a été montré que son inhibition conduisait à un défaut de phagocytose de *E. Coli* dans des macrophages murins (Blander and Medzhitov, 2003). La voie JNK (Fang et al., 2014; Zou and Shankar, 2015) et la voie ERK (Zou and Shankar, 2015) interviennent également dans la phagocytose, médiée par le TLR2. Les voies p38 MAPK et JNK sont impliquées dans la polymérisation de l'actine. Cet effet est médié par les GTPases Rac1 (par l'intermédiaire de ROCK) et Cdc42 (Chaturvedi et al., 2011; Malchinkhuu et al., 2005; Ninkovic and Roy, 2012).

3. La mise en place de la réponse lymphocytaire B

La production d'anticorps est un des aboutissements du processus d'immunisation. Deux voies peuvent aboutir à la production d'anticorps par les LyB. La première est médiée par des antigènes dits Thymo-Indépendants (ATI). Parmi ces ATI, on distingue deux classes : ATI-1 et ATI-2. Les ATI-1, dont fait partie le LPS, possèdent une activité intrinsèque qui leur permet d'induire la prolifération des LyB de manière directe. A concentration élevée, ils induisent la prolifération et la différenciation des LyB de manière polyclonale. Dans le cas du LPS par exemple, l'activation polyclonale sera induite par le TLR4, présent à la membrane des LyB. A faible concentration, les ATI-1 vont activer uniquement les LyB spécifiques, par un engagement à la fois des TLR mais également du BCR (Pone et al., 2012). Les ATI-2, comme la capsule polysaccharidique d'*Haemophilus influenzae* de type b, présentent à leur surface un grand nombre d'épitopes répétitifs, ceci permettant un pontage des récepteurs des cellules B spécifiques, induisant l'activation du LyB. Il semble que les cellules dendritiques ainsi que les macrophages jouent un rôle dans la réponse ATI-2, en fournissant des signaux co-stimulateurs (dont la cytokine BAFF, membre de la famille du TNF) permettant à la fois la survie et la différenciation des LyB en plasmoblastes sécréteurs d'IgM voire d'IgG (IgG1, IgG2a, IgG3) (Balazs et al., 2002; Mond, 1995).

Les Antigènes Thymo-Dépendants (ATD) correspondent en grande partie aux antigènes protéiques. Ceux-ci sont pris en charge par la voie classique de présentation des antigènes, recrutant les cellules dendritiques puis l'intervention de LyT CD4⁺ spécifiques de l'antigène. Le rapprochement LyT CD4⁺/LyB va s'effectuer dans le centre germinatif (GC) d'un OL. Dans les GC matures, on distingue deux zones. La zone sombre, localisée à proximité de la zone T, est composée de nombreux centroblastes, des cellules B en prolifération et ayant diminué leur expression d'Ig de surface. La zone claire présente, comparativement, une densité moins importante de cellules B, de par la présence des DC folliculaires. Les cellules B présentes dans cette zone sont appelées centrocytes, sont de petite taille et expriment des Ig de surface. Cette compartimentalisation zone claire/zone sombre est dépendante de l'abondance différente entre CXCL12 et CXCL13, ainsi que de l'expression différentielle de CXCR4 entre les centroblastes et les centrocytes. CXCL12 est en effet plus abondant dans la zone sombre, et les centroblastes expriment des niveaux plus élevés de CXCR4 que les centrocytes. A l'inverse, les centrocytes, qui sont CXCR5⁺ CXCR4^{low}, sont retenus dans la zone claire par les fortes concentrations de CXCL13 (Gatto and Brink, 2010). C'est dans les GC que les LyB vont subir les maturations d'affinité ainsi que le switch isotypique, nécessaires pour la mise en place d'une réponse anticorps efficace. Une cytokine particulièrement importante pour la maturation des LyB est l'IL-21, car elle va,

conjointement avec l'IL-4, permettre la survie, la prolifération mais également la maturation d'affinité des LyB. L'IL-21 peut cibler directement les LyB, ou bien agir en autocrine sur une population particulière de LyT, les follicular helper (Tfh) (Varrichi et al., 2016).

Les Tfh ont été décrits pour la première fois au début des années 2000, comme une population de LyT CD4+ présente dans les amygdales et qui exprime le récepteur CXCR5 (Crotty, 2011). Son unique ligand est CXCL13, chimiokine produite dans les GC des organes lymphoïdes secondaires, par les cellules endothéliales, les fibroblastes synoviaux et les DC folliculaires (Weyand and Goronzy, 2003). Ce récepteur permet ainsi le recrutement des Tfh dans la zone B, favorisant leur interaction avec les LyB, entraînant ainsi l'expansion et la différenciation de ces derniers en plasmocytes producteurs d'anticorps. Les Tfh expriment différents marqueurs de surface, requis pour le développement et le maintien des GC, tels que ICOS, CD40L et PD-1 (Varrichi et al., 2016). Le facteur de transcription Bcl6 a été démontré comme étant le régulateur majeur de la différenciation des Tfh. En effet, ceux-ci expriment fortement Bcl6, tandis que les autres sous-types de LyT CD4+ (Th1, Th2, Th17...) expriment eux de hauts niveaux de Blimp-1. Celui-ci est un antagoniste de Bcl6, et inversement, Bcl6 est un antagoniste de Blimp-1. Ainsi, les LyT CD4+ qui expriment Blimp-1 ne pourront pas se différencier en cellules Tfh. Enfin Bcl6 peut agir comme antagoniste des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation Th1, Th2 et Th17. Néanmoins, cet antagonisme n'est pas total et permet ainsi une activité de ces facteurs de transcription dans les Tfh, moins importante que dans les non-Tfh. Ceci permet ainsi aux Tfh de sécréter de faibles quantités de cytokines Th1, Th2 et Th17. Le Tfh va délivrer des signaux de survie aux cellules B *via* différentes voies telles que les interactions CD40L/CD40 et PD-1/PDL-2, ou par la sécrétion de cytokines, IL-4, IL-21 et BAFF (Crotty, 2011). Ces différents signaux, qui sont impliqués dans la synthèse de facteurs de survie ou de prolifération, vont agir comme compétiteurs de l'interaction Fas/Fas-L qui promeut l'apoptose de la cellule B. Cette sécrétion de cytokines va avoir un impact majeur sur la production d'anticorps. En effet, selon les cytokines présentes dans son microenvironnement, les plasmocytes produiront des anticorps d'isotypes différents.

L'IL-4, par l'intermédiaire de STAT6 va notamment induire la sécrétion d'IgG1 et d'IgE. Il s'agit de la seule cytokine Th2 qui ait un effet direct sur la production d'anticorps. L'IFN γ a longtemps été considéré comme inhibant la production d'immunoglobulines, du à sa capacité à diminuer la production d'IgM. Il a été montré que l'IFN γ diminuait globalement la sécrétion d'IgG, et notamment la production d'IgG1. En revanche, il augmente la sécrétion d'IgG2a. (Snapper et al., 1988; Vazquez et al., 2015). L'IL-17 ne semble pas avoir d'effet sur la production d'immunoglobulines. Il a cependant été montré dans un modèle d'asthme allergique que l'IL-17 induisait une augmentation de la production de CCL28 par les cellules épithéliales, chimiokine

qui augmentait le recrutement des LyB IgE⁺ d'une manière CCR10 dépendante (Scanlon et al., 2011).

Les isotypes possèdent des propriétés différentes, et ce même au sein des sous-classes d'IgG. Par exemple, l'affinité des IgG pour le fragment C1q varie en fonction des sous-classes et l'IgG4 est le seul sous type à ne pas fixer le complément. Les IgG fixent aussi de manière différentielle les FcγR (Guilliams et al., 2014). Enfin, au cours d'une réponse anticorps, on peut observer un biais de production vers un ou plusieurs isotypes. Ainsi, les IgG1 et IgG3 sont majoritaires dans les réponses dirigées contre un antigène protéique, tandis que les IgG2 et IgG4 sont associées à une réponse contre un antigène polysaccharidique. Les IgA sont majoritaires dans la réponse humorale des muqueuses. Leur principale fonction consiste en la protection de l'hôte contre les virus, toxines et bactéries, par neutralisation directe. Les IgE enfin, sont généralement associées aux hypersensibilités et allergies. En effet, elles fixent avec une très forte affinité les FcεR, présents à la surface des cellules de Langerhans, des basophiles, des éosinophiles et des mastocytes. Elles sont ainsi responsables de la dégranulation de ces cellules, ce qui conduit à la libération de médiateurs tels que l'histamine, ou l'IL-8 (Schroeder and Cavacini, 2010).

IV. L'immunogénicité des protéines thérapeutiques, causes et conséquences

L'immunogénicité d'une protéine thérapeutique s'évalue par la proportion de patients traités qui développe des ADA dirigé contre cette protéine. Dans cette partie seront détaillés les méthodes de détection de ces ADA, leurs conséquences cliniques, ainsi que les facteurs établis ou hypothétiques influant sur l'immunogénicité des protéines thérapeutiques.

1. Le développement d'« Anti-Drug Antibodies » (ADA), quelles conséquences ?

Comme indiqué précédemment, les ADA ont été mis en évidence chez les patients dès les premières utilisations de préparations à base de protéines (Schellekens, 2002). Le tableau 9 indique quelques protéines pour lesquelles la production d'ADA par les patients a été évaluée.

	Cible	Indication	Degré d'humanisation	Voie d'administration et dose	Patients développant des ADA
Muromonab	CD3 sur cellules T	Rejet de greffe	Murin		25%
Rituximab (IgG1)	CD20 sur cellules B	Lymphome non-hodgkinien	Chimérique	IV (500- 1000 mg)	11%
Infliximab (IgG1)	TNF α soluble ou membranaire	Polyarthrite Rhumatoïde et maladie de Crohn	Chimérique	IV (3 mg/kg)	10-15%
Natalizumab (IgG4)	Intégrine α 4	Maladie de Crohn et Sclérose en plaque	Humanisé	IV (300 mg)	9%
Adalimumab (IgG1)	TNF α	Maladie de Crohn, Polyarthrite Rhumatoïde...	Humain	SC (40 mg)	26%
Betaferon (INFβ)	Récepteur	Sclérose en plaque	Humain	SC (250 μ g)	16-25%
Hormone de croissance	Récepteur	Nanisme	Humain	SC/IV (0.1/0.02 mg/kg)	1-2%

Tableau 9 : L'immunogénicité des protéines thérapeutiques.
Modifié d'après Brennan, 2010

La formation d'ADA peut être associée à des effets indésirables mineurs, ou bien conduire à l'échec de la thérapie en réduisant l'efficacité de la protéine administrée, suite à la formation de complexes immuns ADA-protéine qui sont ensuite pris en charge et éliminés par le système réticulo-endothélial. De plus, l'apparition des effets toxiques liés à l'immunogénicité sont parfois liés à une réaction d'hypersensibilité.

Chez les patients qui s'immunisent contre les protéines thérapeutiques, les ADA circulants produits peuvent être de différents isotypes. Par exemple, les ADA dirigés contre l'Infliximab, sont majoritairement des IgG, avec une nette prévalence d'IgG1 et d'IgG4 (Kosmac et al., 2011), mais l'on retrouve également des IgA, des IgM et des IgE, de manière plus rare (van Schouwenburg et al., 2013).

Les conséquences cliniques de la production d'ADA par les patients peuvent varier, selon l'épitope qu'ils reconnaissent sur la protéine administrée. Les ADA peuvent former des complexes immuns avec la protéine et potentiellement induire une diminution de la biodisponibilité de celle-ci (van der Laken et al., 2007). Ainsi, chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et traités par l'Adalimumab ou l'Infliximab, il a été observé une diminution des taux sériques de la protéine pour ceux qui développaient des ADA (Bartelds et al., 2011; Radstake et al., 2009). Il fut ensuite observé que les ADA dirigés contre l'Adalimumab étaient majoritairement de type IgG4 (Van Schouwenburg et al., 2012).

Les ADA neutralisants lient la protéine sur un site déterminant pour son activité, comme par exemple son site d'interaction avec un récepteur, ou encore les régions CDR d'un anticorps. Ils peuvent également se fixer à proximité de ce site, et bloquer l'activité de la protéine par encombrement stérique. La présence d'ADA neutralisants a pu être observée pour différentes protéines thérapeutiques, comme l'Adalimumab (van Schouwenburg et al., 2013b), l'Infliximab (Kosmac et al., 2011), le Certolizumab pegol (Smolen et al., 2009) ou le Facteur VIII (Lacroix-Desmazes et al., 2002). De manière intéressante, il a été observé que les ADA dirigés contre l'Infliximab se révèlent être tous neutralisants, tandis qu'aucun de ceux ciblant l'Etanercept ne le sont (van Schouwenburg et al., 2013a). Pour d'autres protéines thérapeutiques, la fréquence des ADA neutralisants semble variable. Environ 98% des ADA spécifiques de l'Adalimumab sont neutralisants (van Schouwenburg et al., 2013b), contre entre 2 à 47% dans le cas de l'IFN β . Pour ce dernier, le taux d'ADA neutralisants est variable selon le type d'IFN β utilisé. L'Avonex et le Rebif, les IFN β 1a, induisent la formation d'ADA neutralisants chez 2-6% et 12-24% respectivement. Concernant l'IFN β 1b Betaferon, entre 25 et 47% des patients développent des ADA neutralisants (Farrell and Giovannoni, 2007).

La fixation des ADA sur un épitope présent sur la protéine endogène peut avoir des conséquences cliniques graves. C'est notamment le cas rapporté à propos de l'érythropoïétine recombinante, où certains patients traités ont présenté une anémie suite à l'injection d'Eporex® (Casadevall, 2005). Les ADA reconnaissent l'érythropoïétine endogène, inhibaient son interaction avec son récepteur, bloquant ainsi l'érythropoïèse. Il a été montré que les ADA développés dans ces conditions, majoritairement des IgG1 et IgG4, présentaient une réaction croisée non seulement avec la protéine endogène, mais également avec toutes les EPO recombinantes commercialisées. Seul un arrêt de la thérapie accompagné d'un traitement à base d'immunosuppresseurs a permis de restaurer le taux d'hématies circulantes, conjuguée à une disparition des anticorps anti-EPO (Verhelst et al., 2004). Les raisons qui ont été évoquées pour expliquer l'apparition des ADA dans ce cas précis sont liées à la formulation de la protéine, nous y reviendrons plus loin.

Parmi les effets indésirables observés suite à l'injection de protéines thérapeutiques on retrouve des réactions d'hypersensibilité qui regroupent notamment les réactions allergiques et pseudo-allergiques. Ces dernières correspondent à des réactions présentant des symptômes de la réaction allergique, mais dépendante du complément, et indépendante des IgE. Elles apparaissent au cours de la première injection (Szebeni, 2005). L'anaphylaxie est une réaction allergique aigüe, dont la définition historique implique la présence d'IgE spécifiques, qui n'apparaissent qu'après l'administration répétées des spécialités. Une étude s'est intéressée au développement de réactions d'anaphylaxie chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traités à l'Infliximab. Sur les 10 patients développant ces réactions, 3 présentaient des IgM spécifiques, et 3 des IgE dirigés contre l'Infliximab après la seconde ou la troisième injection du produit (Vultaggio et al., 2010). Par ailleurs, la présence d'IgE spécifiques du Rituximab, associée à une sécrétion importante d'IL13 par les PBMC *in vitro* ont été mis en évidence chez une patiente développant une anaphylaxie suite à une injection récurrente du produit (Vultaggio et al., 2012).

2. Les méthodes de détection des Anti-Drug Antibodies

Plusieurs méthodes sont utilisées pour détecter la présence d'ADA dans le sérum des patients (van Schouwenburg et al., 2013a) (figure 21).

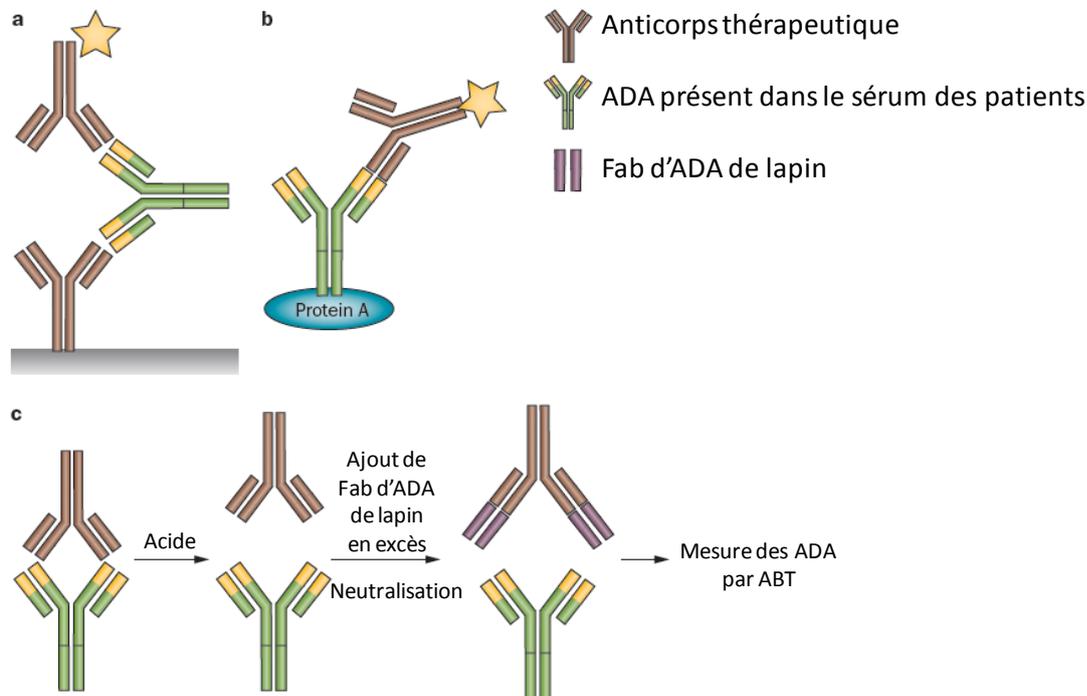


Figure 21: Méthodes de détection des ADA.

D'après van Schouwenburg, 2013. a: ELISA sandwich, b : Antigen Binding Test (ABT), c : pH-shift anti-idiotype antigen-binding test (PIA)

La plus commune est un ELISA sandwich. Dans celle-ci, la protéine thérapeutique est fixée au fond d'un puits et les ADA présents dans le sérum vont s'y fixer. L'ajout de la même protéine thérapeutique marquée permettra par la suite de détecter la présence des ADA. Les RadioImmunoAssays (RIA), comme l'Antigen Binding Test (ABT), sont également couramment utilisés. Dans le cas de l'ABT, les IgG présentes dans le sérum sont isolées par affinité avec la protéine A, avant d'être incubées en présence de la protéine thérapeutique radiomarquée. Le problème majeur de ces types de tests est qu'ils ne permettent de mesurer que les ADA libres dans le sérum, et non les ADA complexés à la protéine thérapeutique. La présence de quantités importantes de protéine thérapeutique va donc induire un biais, car elle limite la quantification des ADA (phénomène appelé « drug interference »). Ceci peut donc conduire à l'apparition de faux-négatifs ou à la sous-estimation des taux d'ADA. Par ailleurs, l'ELISA classique ne permet pas la détection des IgG4, du à leur capacité d'échange des Fab (van der Neut Kofschoten et al., 2007).

De nouvelles techniques ont été développées, permettant cette fois la détection des ADA aussi bien libres dans le sérum que complexés à leur cible. Notamment, dans le pH-shift anti-idiotypic antigen-binding test (PIA), les complexes ADA/protéine thérapeutique sont dissociés au préalable dans une solution à pH acide, et les ADA sont ensuite détectés par ABT. Le niveau de sensibilité des différentes méthodes sont présentées dans la figure 22.

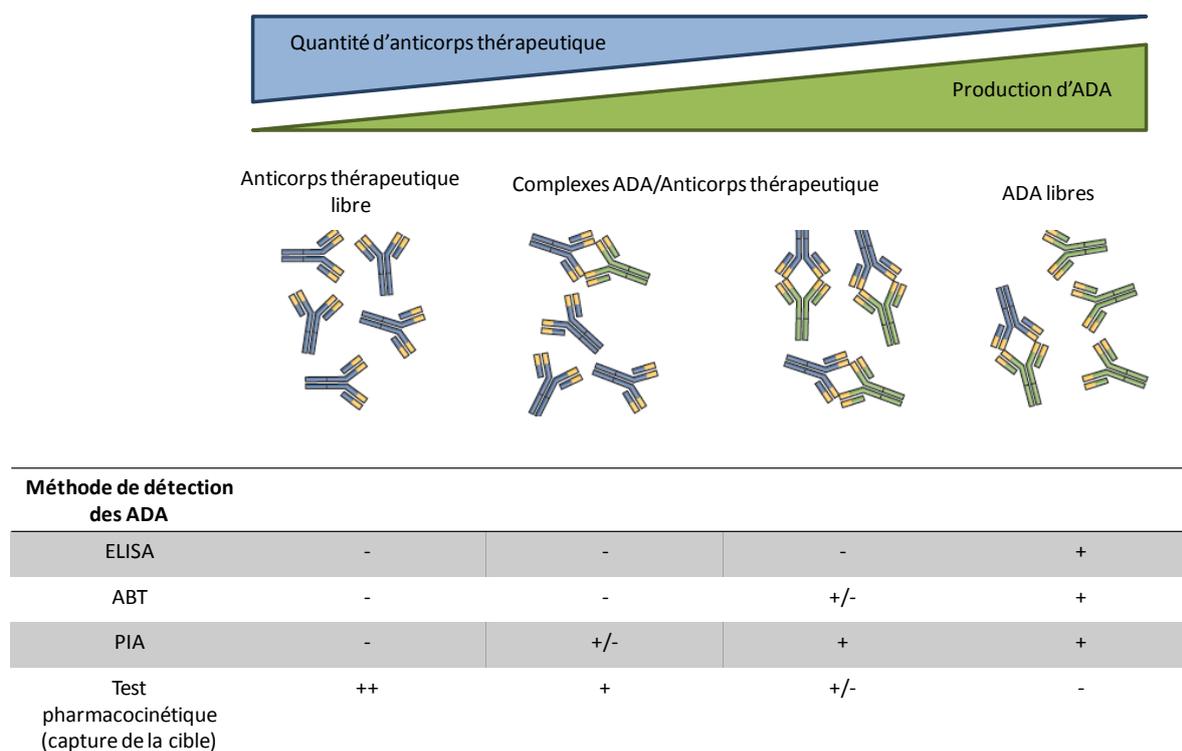


Figure 22: Capacité de détection des ADA par les différentes méthodes en présence de protéine thérapeutique.

D'après van Schouwenburg et al, 2013. ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ; ABT : Antigen-Binding Test ; PIA: pH-shift anti-Idiotypic Antigen-binding test. D'après van Schouwenburg, 2013. Le niveau de sensibilité de chaque technique est indiqué : ++ : forte sensibilité, + : bonne sensibilité, +/- : sensibilité moyenne, - : ADA non détectables. Dans le cas du test pharmacocinétique, le niveau de détection des anticorps thérapeutiques est indiqué.

La détection d'ADA neutralisants peut s'effectuer par le biais de tests cellulaires. Dans le cas du TNF- α par exemple, le test repose sur la capacité du TNF- α à tuer des cellules d'une lignée sensible, telle que les cellules murines WEHI ou les cellules L929 traitées à l'actinomycine D. Les inconvénients de ce type de test sont la difficulté de standardisation, la durée (souvent plusieurs jours), et les possibles interférences amenées par des composants du sérum du patient. L'utilisation de gènes rapporteurs a récemment été mise en place pour la détection des ADA neutralisant les anti-TNF- α dans un contexte clinique. Ce test détecte directement l'activité du

TNF- α , (Figure 23) (Bendtzen, 2015). Celui-ci, après fixation sur son récepteur, va induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B, qui va lui-même induire la transcription d'un gène rapporteur codant pour la luciférase. L'activité de cette dernière sera ensuite mesurée. Ainsi, lorsque le TNF- α est pré-incubé avec le sérum d'un patient contenant un anticorps anti-TNF- α , ce dernier va neutraliser l'activité du TNF- α , conduisant à une absence de signal luciférase. En revanche, si le sérum contient des ADA neutralisants, l'anticorps thérapeutique ne pourra plus interférer avec le TNF- α , aboutissant ainsi à un signal de luminescence (Lallemand et al., 2011).

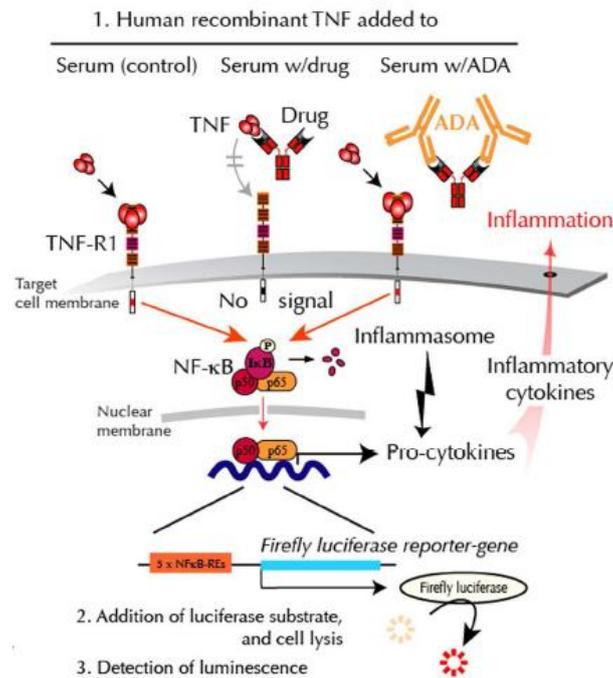


Figure 23: Détection des anticorps neutralisants par un test fonctionnel avec gène rapporteur.
De Bendtzen, 2015

3. Facteurs influençant l'immunogénicité des protéines thérapeutiques

De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans l'immunogénicité de protéines thérapeutiques. Ils peuvent être classés dans trois catégories, comme représenté dans le tableau 10.

Patient	Traitement	Produit
Statut de la maladie à traiter	Dose	Structure de la protéine
Statut immunitaire du patient	Voie d'administration	Qualité du produit
Statut génétique	Fréquence des administrations	Cible
Traitement concomitant	Durée du traitement	

Tableau 10 : Facteurs influençant l'immunogénicité des protéines thérapeutiques.

D'après Nechansky and Kircheis, 2010.

3.1. Le patient

Plusieurs paramètres, inhérents au patient, ont des répercussions sur la réponse qu'il peut développer contre une protéine qui lui est administrée. De manière générale, les patients développant des ADA après un premier traitement par anticorps anti-TNF ont un risque accru de développer une réponse contre un second traitement anti-TNF (Bartelds et al., 2010; Chirmule et al., 2012).

3.1.1 Statut immunologique

Le statut immunitaire des patients semble avoir un impact important sur le développement d'ADA. La réponse immunitaire induite par les protéines thérapeutiques semble en effet être moins importante chez les patients immunodéprimés par rapport aux patients présentant un système immunitaire performant. Cette démonstration a été faite chez des patients atteints de cancer, traités avec du GM-CSF. Il a été observé que 95% des patients immunocompétents développaient des ADA neutralisants contre 10% chez les patients ayant un système immunitaire défaillant (Ragnhammar et al., 1994).

L'administration concomitante d'immunosuppresseurs pourrait diminuer la réponse contre la protéine thérapeutique. L'utilisation d'agents limitant l'activation des LyT ou activant des LyT régulateurs, comme le méthotrexate, a un effet bénéfique sur l'immunogénicité

lorsqu'ils sont co-administrés avec une protéine thérapeutique. Ceci a notamment été observé chez des patients atteints de maladie de Crohn, traités par des injections d'Infliximab : le groupe de patients traité avec injections concomitantes de méthotrexate montrait des taux d'ADA bien inférieurs à ceux mesurés pour le groupe traité à l'Infliximab seul (Baert et al., 2003; Ben-Horin et al., 2013). Cet effet a également été démontré chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et traités par l'Adalimumab, où la réduction de l'immunogénicité par le méthotrexate est dose-dépendante. Ainsi, après 154 semaines de traitement, 50% des patients traités à l'Adalimumab sans méthotrexate présentaient des ADA, contre 15% des patients traités de manière concomitante avec une dose forte (>22,5 mg/semaine) de méthotrexate (Krieckaert et al., 2012).

3.1.2 La pathologie

Le type de pathologie traitée est également un élément jouant sur l'immunogénicité. En effet, seuls 1.1% des patients traités dans le cas de Lymphomes non Hodgkiniens de bas grade développent des ADA dirigés contre le Rituximab, contre 11% des patients traités pour la polyarthrite rhumatoïde (Food and Drug Administration, 2012).

3.1.3 Le fond génétique

Les facteurs génétiques semblent également être en mesure de moduler la réponse immunitaire contre une protéine thérapeutique. En particulier, plusieurs haplotypes du CMH ont été décrits comme pouvant être un facteur de prédisposition au développement d'ADA (Sethu et al., 2012). Les allèles HLA-DRB*0401 et HLA-DRB*0408 ont notamment été associés au développement d'ADA neutralisants chez les patients atteints de sclérose en plaque traités avec de l'IFN- β (Hoffmann et al., 2008). Cette corrélation a également été établie dans le cas du traitement à l'érythropoïétine. Une étude rétrospective a montré que des patients ayant développé une PRCA (Pure Red Cell Aplasia, associée au traitement à l'EPO recombinante humaine) présentaient le plus fréquemment l'haplotype HLA-DRB1*01-DQB1*0309 (Praditpornsilpa et al., 2009). Une autre étude rétrospective a montré que l'allèle HLA-DRB1*03 était plus répandu chez les patients développant des ADA contre l'Infliximab et traités pour des maladies inflammatoires de l'intestin (Billiet et al., 2015). Les molécules HLA ne sont pas les seules dont le polymorphisme génétique affecte l'immunogénicité d'une protéine. Une étude s'est intéressée aux microsatellites dans le promoteur de HMOX1 (Heme Oxygenase-1). En effet,

l'induction de l'hème oxygénase 1 réduit l'immunogénicité du facteur VIII administré aux patients atteints d'hémophilie A. L'étude montre une corrélation entre le polymorphisme présent dans le promoteur de HMOX1 et le développement d'ADA contre le facteur VIII. Le groupe de patients présentant de nombreuses répétitions GT (supérieur à 30 fois) sur au moins un des deux allèles développe plus d'ADA (33,3% des patients) que les patients qui en présentent moins de 30 (17,1%) (Repressé et al., 2013). Toujours dans le cas du FVIII, la présence d'un polymorphisme dans un microsatellite dans le promoteur du gène codant pour l'IL-10, ainsi qu'un SNP dans le promoteur du TNF α ont été associés à une fréquence de développement d'ADA plus importante (Astermark, 2012).

3.2 Le traitement

3.2.1 La durée du traitement et les doses injectées

Les thérapies de courte durée sont généralement considérées comme moins immunogènes que les traitements longs, néanmoins, il semble que les traitements intermittents favorisent d'avantage le développement d'ADA par rapport aux traitements de fond (Jahn and Schneider, 2009).

L'influence de la dose de protéine thérapeutique injectée dans le développement d'ADA n'est pas très claire. Globalement, il était considéré que l'utilisation de doses élevées permettait de diminuer cette immunogénicité. Cette observation a été faite chez des enfants traités pour une arthrite idiopathique. Environ 35% des patients traités avec une dose d'Infliximab de 3 mg/kg ont développé des ADA, contre environ 10% des patients traités à la dose de 6 mg/kg. Chez l'adulte, il a été observé que 53%, 21% et 7% des patients développaient des ADA contre l'Infliximab injecté aux doses de 1, 3 et 10 mg/kg respectivement (Maini et al., 1998), ce qui semblait montrer une corrélation inverse entre la dose de produit injecté et le développement d'ADA. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précaution. En effet, l'utilisation d'un ELISA classique pour déterminer la présence d'ADA ne permet pas de détecter les ADA complexés avec la protéine thérapeutique. Potentiellement, l'injection de doses élevées de protéines peut aboutir à une diminution du taux d'ADA libres dans le sérum, au profit de complexes ADA/protéine, diminuant ainsi le taux d'ADA détecté par l'ELISA.

3.2.2 Les voies d'administration

Les protéines thérapeutiques sont essentiellement injectées par trois voies : intraveineuse, sous-cutanée et intramusculaire, ces deux dernières voies étant privilégiées

autant que possible pour favoriser le confort du patient et l'observance du traitement. De nombreux groupes se sont intéressés à l'impact que pourrait avoir la voie d'administration de la protéine sur son potentiel immunogène. Notamment, il a été montré dès 1987 que la voie intramusculaire pour l'injection d'IFN- β était plus immunogène que la voie intraveineuse (Konrad et al., 1987). Ceci a été confirmé plus récemment dans un modèle murin d'hémophilie, où l'injection de FVIII par voie sous-cutanée aboutit à une immunogénicité accrue par rapport à la voie intraveineuse (Peng et al., 2009). Le potentiel d'immunogénicité accru des protéines administrées par voie intramusculaire ou sous-cutanée peut s'expliquer notamment par la présence des cellules immunitaires périphériques, en particulier les CPA telles que les DC. L'hypothèse la plus couramment formulée est qu'au cours de l'injection par voie sous-cutanée, les DC résidentes du derme vont capter la protéine, et en présence de signaux de danger, vont mûrir, et migrer jusqu'aux ganglions drainants pour induire la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Par ailleurs, les protéines de haut poids moléculaire peuvent être absorbées par le système lymphatique (Tang et al., 2004), et ainsi être transportées jusqu'au ganglion drainant, où elles pourront être prises en charge par les DC résidentes. Ceci va conduire à une première vague de présentation des antigènes aux LyT, et aura lieu dans les quelques heures qui suivent l'injection de la protéine. Par ailleurs, l'injection sous-cutanée va conduire à la migration des DC cutanées ayant capté la protéine au niveau du point d'injection. La présence de signaux de danger va aboutir à la maturation de ces DC qui iront ainsi au ganglion drainant afin de présenter les antigènes aux LyT. Ce phénomène se déroule dans les premiers jours (entre un et trois) qui suivent l'injection (Fathallah et al., 2013). Cependant, cette observation ne semble pas être applicable à toutes les protéines thérapeutiques. En effet, une étude a montré que l'utilisation de la voie sous-cutanée à la place de la voie intraveineuse ne modulait pas l'immunogénicité de l'Abatacept : trois patients sur les 707 (0,4%) traités par voie SC ont développé des ADA, contre 5 sur 691 (0,7%) par voie IV (Genovese et al., 2011).

3.3 Le produit

3.3.1 Degré de non-soi

Une divergence de structure primaire entre la protéine thérapeutique et son équivalent humain explique l'immunogénicité des protéines d'origine animale. Un exemple historique est donné par les insulines d'origine bovine et porcine, qui diffèrent de l'insuline humaine respectivement par 3 et 1 acides aminés. Or, l'administration d'insuline bovine résulte en une production d'ADA supérieure à celle induite en réponse à l'insuline porcine ou humaine. Par ailleurs, l'Insuline Aspartate (IAsp), analogue de l'insuline à action rapide, diffère de l'insuline

humaine par un seul acide aminé. Cependant, il a été observé une augmentation de la production d'ADA (23%) comparativement aux patients traités avec l'insuline humaine (16%) (Raskin et al., 2000).

L'immunogénicité des anticorps thérapeutiques a d'abord été décrite lors de l'utilisation d'anticorps murins, l'exemple du Muromonab (ou OKT3, un anti CD3) étant le plus documenté. Les patients traités développent dans les deux semaines qui suivent le début du traitement, des anticorps dirigés contre cette protéine d'origine murine (HAMA : human anti-mouse antibodies) (Goldstein et al., 1986). La chimérisation puis l'humanisation des anticorps a permis de réduire nettement cette immunogénicité (Hwang and Foote, 2005). Cependant même l'utilisation d'anticorps complètement humains induit une immunogénicité (HAHA : human anti-human antibodies), comme rapporté pour l'Adalimumab, qui induit un taux de réponse immune de 12 à 44% selon les études pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Krieckaert et al., 2010). Le Golimumab, un autre anti-TNF- α entièrement humain présente quant à lui une immunogénicité comprise entre 0 et 7% (Vincent et al., 2013). Les épitopes les plus immunogènes sont ceux portés par les déterminants idiotypiques, sur les parties variables du fragment Fab (Harding et al., 2010).

Concernant les autres protéines recombinantes à usage thérapeutique, l'utilisation de cellules hôtes mammifères offrant la possibilité de produire des protéines proches de l'équivalent humain, semblait résoudre le problème de l'immunogénicité car ces biomédicaments pouvaient être théoriquement être considérés comme faisant partie du soi par le système immunitaire, et être ainsi tolérés. Cependant, bien que ces protéines présentent une grande similitude avec l'équivalent humain, elles restent tout de même immunogènes. L'insuline recombinante humaine, par exemple, induit la formation d'ADA chez près de 50% des patients traités pour du diabète. Les IFN- β recombinants, utilisés majoritairement pour le traitement de la sclérose en plaque, font également l'objet d'un développement d'anticorps (Sauerborn et al., 2010). Entre 20 et 30% des patients traités avec du facteur VIII (FVIII) pour l'hémophilie développent des anticorps neutralisants, et ce malgré l'homologie entre la protéine thérapeutique et l'équivalent endogène. Ceci vient du fait que ces patients présentent une déficience en facteur VIII endogène, induite par une mutation dans le gène codant la protéine. Ces patients présentent donc un défaut de tolérance vis-à-vis de la protéine. Le système immunitaire va ainsi considérer le FVIII comme étranger, avec notamment la mise en place d'une réponse lymphocytaire CD4⁺ (Scott et al., 2013).

3.3.2 La présence d'épitopes T

L'humanisation des séquences, bien que permettant de diminuer les réponses immunitaires contre les protéines thérapeutiques, n'a pas permis d'abolir totalement le développement de ces réponses. Comme dit précédemment, le développement d'anticorps de haute affinité nécessite la mise en place d'une réaction immunitaire classique, faisant intervenir les CPA et les LyT. Dans le cas de pathologies de type déficience, comme l'hémophilie A où il y a absence de FVIII, le système immunitaire n'a pas été éduqué pour ne pas reconnaître la protéine thérapeutique. En effet, l'absence de la protéine endogène conduit à un défaut de tolérance centrale. On retrouve ainsi des LyT spécifiques du FVIII chez les patients hémophiles (Scott et al., 2013).

La présence d'un répertoire de LyT naïfs CD4⁺ spécifiques a été mise en évidence chez des donneurs sains pour différentes protéines comme le Rituximab, l'Infliximab ou l'EPO (Delluc et al., 2010, 2011). Par une technique d'ELISPOT IFN γ , les auteurs ont observé que des LyT CD4⁺ pouvaient être activés par des DC stimulées en présence de ces différentes protéines thérapeutiques. Ils ont noté la présence de 0,1 à 1 LyT spécifique par million de LyT. Un point particulièrement important à noter est que les anticorps thérapeutiques présentent, à l'exception du Trastuzumab et de l'Etanercept, un répertoire dirigé contre eux, avec une fréquence de LyT relativement similaire, quelque soit le degré d'humanisation de l'anticorps. Par ailleurs, une analyse rétrospective a montré une corrélation entre l'immunogénicité observée chez les patients et l'immunogénicité prédite en analysant la présence d'épitopes T dans les protéines thérapeutiques utilisées (De Groot and Martin, 2009). Ceci confirme donc le rôle majeur que jouent les LyT dans la production d'ADA. La présence de ces épitopes ne justifie pas à elle seule le développement d'ADA. Il faut en effet que les LyT soient dans des conditions favorables à leur activation. D'autres facteurs vont agir comme adjuvant et apporter un second signal à la DC lui permettant de maturer pour activer de manière optimale les LyT.

En plus de la séquence peptidique qui constitue l'épitope, la capacité de liaison de celui-ci à une molécule de CMH est particulièrement importante pour une expression stable du complexe à la surface membranaire. Un des enjeux de la dé-immunisation des protéines thérapeutiques peut être de réduire l'interaction entre les peptides constituant les épitopes T et les molécules de CMH. Une étude a ainsi identifié par un algorithme différents épitopes T présents dans le domaine C2 du FVIII (Moise et al., 2012). Les auteurs ont observé que des substitutions dans ces peptides diminuaient leur capacité de liaison aux molécules HLA-DR, et les rendaient ainsi non-immunogènes dans des souris transgéniques. L'élimination des épitopes T semble donc être la solution la plus efficace pour réduire l'immunogénicité d'une protéine. Ces

épitopes T peuvent correspondre à des séquences non-humaines, néanmoins il est connu que les anticorps monoclonaux entièrement humains peuvent également présenter des épitopes T. Ceux-ci se trouvent généralement dans les régions CDR des anticorps (Harding et al., 2010), et leur élimination peut donc conduire à une perte d'efficacité de la protéine. Les épitopes T considérés jusqu'à présent sont reconnus par les LyT effecteurs. Il existe néanmoins des épitopes qui vont être reconnus par les LyT régulateurs, appelés Tregitopes. Ces épitopes ont notamment été mis en évidence dans les régions Fc des IgG humaines (De Groot et al., 2008).

3.3.3 Les glycosylations et la PEGylation

De nombreuses protéines thérapeutiques sont glycosylées. Il s'agit d'une des modifications post-traductionnelles les plus communes, et il est important de noter qu'elle est à la fois spécifique du type cellulaire et d'espèce. Ainsi, selon le type de cellules hôtes utilisées pour produire la protéine thérapeutique, cette dernière peut présenter des glycosylations différentes en termes de séquence, longueur de chaîne, et de la position du site de branchement de l'arbre de glycosylation. Ces différences aboutissent à une micro-hétérogénéité, différente de celle observée sur la protéine humaine. Ainsi, les glycoformes « murines » présentes dans la partie Fab du Cetuximab ont été reconnues responsables de réactions anaphylactiques. Environ 3% des patients développent des réactions d'hypersensibilité contre cet anticorps. Il a néanmoins été observé que dans certains états des Etats-Unis le taux de réactions d'hypersensibilité atteignait les 22%, et ce pour des patients pour lesquels des IgE anti-Gal- α -1,3-Gal, présentes avant le début du traitement ont été mises en évidence (Chung et al., 2008). L'anticorps, produit en cellules murines SP2/0 présente dans son Fab le Gal- α -1,3-Gal. Bien que la présence d'IgG anti-Gal- α -1,3-Gal chez l'Homme soit considérée comme naturelle et non délétère, la présence d'IgE semble beaucoup plus rare et conduit à une réponse importante contre la protéine thérapeutique.

Les glycosylations assurent de nombreuses fonctions biologiques, comme la modulation de l'activité de la protéine, où en déterminant son temps de demi-vie dans la circulation. D'un point de vue physico-chimique, elles permettent d'assurer le bon repliement de la protéine et la stabilisent, notamment en masquant des régions hydrophobes. Concernant l'immunogénicité d'une protéine, l'absence de glycosylation peut engendrer l'apparition d'ADA, de par la révélation d'épitopes qui étaient normalement enfouis. C'est ce qui a été observé avec le GM-CSF. Il a été observé, suite à l'injection de GM-CSF produit dans la levure, le développement d'ADA chez certains patients. Ces ADA avaient la capacité de fixer le GM-CSF produit chez *E. Coli*, mais pas le GM-CSF produit en cellule CHO. La différence majeure entre les différents systèmes

d'expression vient du fait que la levure ne produit que des N-glycosylations, tandis qu'*E. Coli* n'est pas capable de réaliser cette modification post-traductionnelle. Ainsi, les auteurs ont conclu que les ADA étaient dirigés contre des épitopes initialement masqués par des O-glycosylations (Gribben et al., 1990). Un autre exemple est donné par l'IFN β -1b (produit chez *E. Coli*, et donc non glycosylé) qui présente une immunogénicité plus importante que l'IFN β -1a Rebif[®] (produit en cellules CHO, glycosylé). En effet, entre 28% et 47% des patients développent des ADA neutralisants contre l'IFN β -1b (Betaferon[®]), injecté par voie SC principalement, alors que cette proportion chute entre 5% et 28% pour l'IFN β -1a Rebif[®], injecté par voie SC et entre 2 et 6% pour l'Avonex[®], IFN β -1a injecté par voie IM (Bertolotto et al., 2004).

L'ajout d'un groupement de PolyEthylène Glycol (PEG) est une technique couramment utilisée pour augmenter la demi-vie plasmatique d'une protéine thérapeutique, réduisant potentiellement la fréquence des injections (Veronese and Mero, 2008). Le Certolizumab Pegol (Cimzia[®]) est un fragment Fab humanisé, dirigé contre le TNF α , lié à un groupement PEG. Pour la plupart des protéines, l'ajout de groupements PEG ne modifie pas leur structure (Bhadra et al., 2002), et à l'instar de la glycosylation, le PEG peut masquer certains épitopes et ainsi contribuer à la réduction de l'immunogénicité d'une protéine. Cependant, il a récemment été montré l'existence d'anticorps anti-PEG chez des individus sains, avec une prévalence de l'ordre de 22-25% (Liu et al., 2011). Ces anticorps anti-PEG peuvent d'ailleurs entraîner une perte d'efficacité de la protéine thérapeutique, comme observé dans le cas de l'Asparaginase pegylée, utilisée pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aigüe (Armstrong et al., 2007).

3.3.4 Les propriétés immuno-modulatrices de la protéine

Les propriétés immuno-modulatrices d'une protéine semble influencer de manière critique la réponse immunitaire dirigée contre elle-même, mais également la réponse dirigée contre des protéines co-administrées, ou encore de protéines endogènes. Par exemple, le GM-CSF (Granulocyte and Macrophage Stimulating Factor), qui a des propriétés adjuvantes et peut activer les DC, les lymphocytes et les monocytes, est plus immunogène que le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) (Baker et al., 2010; Wadhwa et al., 1999).

3.3.5 La formulation

Les composés entrant dans la formulation d'une protéine thérapeutique sont principalement sélectionnés pour leur capacité à stabiliser la protéine, c'est à dire maintenir sa

conformation native, et ce en prévenant la dénaturation induite par les interactions hydrophobes (adsorption sur le contenant), les dégradations chimiques comme l'oxydation, la déamidation, ou encore la fragmentation. Ils permettent également de solubiliser la protéine à la concentration thérapeutique souhaitée, en prévenant la formation d'agrégats (oligomérisation), plus particulièrement pour les solutions concentrées d'anticorps. Par conséquent, la formulation vise à minimiser les risques d'immunogénicité en prévenant la dégradation des protéines. Enfin, elle doit également s'adapter au mode d'administration du produit (par exemple par adaptation de la viscosité, de la seringabilité). Cependant, quelques exemples ont été rapportés, où certains excipients ont été mis en cause dans l'induction d'immunogénicité des protéines.

L'albumine humaine (HSA pour Human Serum Albumin) est un élément récurrent des formulations de biomédicaments, de par sa capacité à inhiber les interactions hydrophobes. Elle fut notamment utilisée dans une formulation de l'IFN α -2a. Indiquée comme étant stockable à température ambiante, cette spécialité s'est révélée particulièrement immunogène. Il s'est avéré que la HSA, à température ambiante, s'oxydait partiellement. Ces molécules oxydées formaient ensuite des agrégats aussi bien avec des molécules de HSA non modifiées qu'avec des molécules d'IFN α -2a. Ce sont ces agrégats qui ont été mis en cause dans l'immunogénicité de cette préparation (Ryff, 1997; Schellekens, 2002).

Un des exemples les plus cités dans l'impact de la formulation sur l'immunogénicité des protéines est l'utilisation du polysorbate 80 dans les préparations d'époïétine α . En effet, la formulation de ce produit a été changée dans les préparations d'Eporex®, en substituant en 1998 le PS80 à la HSA. Comme déjà évoqué plus haut, de nombreux cas d'aplasie des globules rouges sont apparus peu de temps après ce changement de formulation, dus au développement chez les patients d'anticorps anti-érythropoïétine endogène (Bennett et al., 2004; Casadevall et al., 1996). Le rôle exact du PS80 dans le développement de cette immunogénicité n'est pas encore totalement élucidé. La formation de micelles, la présence de produits de dégradation du bouchon ayant interagit avec le PS80, ou la formation d'agrégats induits par la concentration élevée en PS80 sont les principales hypothèses (Schellekens and Jiskoot, 2006).

3.3.6 Les contaminants et impuretés

La présence d'impuretés dans les préparations est rigoureusement contrôlée au cours du « Downstream-process ». Des substances telles que des composants de la cellule hôte, les impuretés liées au procédé de fabrication (telles que la résine des colonnes de chromatographie) et bien entendu les substances apparentées au produit (agrégats, protéine tronquée, mal

repliée...) peuvent avoir un effet adjuvant ou être directement immunogène. Un exemple concret concerne le premier biosimilaire de la Somatropine recombinante humaine. Son utilisation a conduit au développement d'anticorps anti-GH chez près de 60% des patients. Cette réponse a été corrélée à la présence de hauts niveaux d'impuretés provenant de la cellule-hôte, *E. Coli* (Thakrar K, Bodalia P, 2010). Néanmoins, ces impuretés font l'objet de limitations, afin de réduire leur impact sur la qualité des produits. Par exemple, le NovoSeven® RT, un FVIIa recombinant, ne peut contenir au maximum que 1,2 ng d'IgG murines, 30 ng d'IgG bovines, issues des procédés de production et de purification, et 19 ng de protéines issues des cellules productrices (BHK) et du milieu de culture, par mg de produit fini (Novo Nordisk, 2008).

3.4 La présence d'agrégats

La présence d'agrégats est un phénomène inhérent aux protéines en solution. Leur impact favorisant l'immunogénicité de la protéine native est un phénomène connu depuis plus de 50 ans (Gamble, 1966).

3.4.1 Corrélations chez les patients

La présence d'agrégats dans les préparations injectées aux patients est relativement peu documentée. La première étude remonte aux années 1960, où la présence d'agrégats dans des préparations de γ -globulines a été corrélée au développement de réactions d'hypersensibilité, ainsi qu'à l'apparition d'anticorps dirigés contre des épitopes présentés par les agrégats exclusivement (Ellis and Henney, 1969; Rosenberg, 2006).

Une autre étude a montré que jusqu'en 1976, près de 50% des enfants traités à l'hormone de croissance développaient des ADA. La présence d'agrégats dans les préparations de GH reçues a été corrélée au développement de cette réponse immunitaire. Ainsi, trois groupes de patients ont pu être établis, en fonction de leur capacité à développer des ADA : ADA permanents, transitoires, et enfin absence d'ADA. Le premier groupe a reçu des préparations de GH contenant de 50 à 70% de protéine agrégée, le second une préparation avec moins de 5% d'agrégats, tandis que le dernier groupe a reçu différentes préparations, dont certaines présentant des agrégats. La conclusion apportée est que d'une part le développement d'ADA dépend de paramètres inhérents aux patients, mais surtout que la présence d'agrégats, en

particulier en quantité élevée, est un facteur prépondérant dans cette réponse immune (Moore and Leppert, 1980a).

Un troisième exemple est donné par l'insuline, qui tend à former des dimères et des hexamères en solution. Les dimères ont pu être retrouvés dans les préparations que les patients s'injectent, en faible quantité cependant, 2.1% dans le cas de l'insuline porc/bœuf, et 1.1% de l'insuline biosynthétique humaine (Robbins and Mead, 1987). Ces agrégats étaient notamment capables d'induire une production d'ADA, 30% des patients développant des ADA contre l'insuline monomérique développent également des ADA dirigés contre les agrégats (Robbins et al., 1987). Un point important à noter est que ces ADA semblaient être en mesure d'adsorber la protéine native.

Le Betaferon[®] est l'IFN β qui, avec le Rebif[®], présente la plus grande quantité d'agrégats (entre 9 et 15% de produit présent sous forme d'oligomères) (Barnard et al., 2013). Or, il a été observé qu'entre 28 et 47% des patients traités au Betaseron[®] développent des anticorps neutralisants, pour 12 à 28% dans le cas du Rebif[®] et entre 2 et 6% pour les patients traités avec l'Avonex[®], dans le traitement de la sclérose en plaque (Bertolotto et al., 2004). Cependant, il faut noter que l'Avonex[®] est injecté exclusivement par voie IM, tandis que les autres produits sont injectés par voie SC. Cette différence de voie d'administration peut amener un biais dans le résultat observé.

Enfin, une étude récente fait état de conditions chimiques favorisant la formation d'agrégats d'anticorps en présence de plasma humain (Arvinte et al., 2013). Les auteurs démontrent en effet que le Trastuzumab ou le Bevacizumab ont une propension à former des agrégats *in vitro*, lorsqu'ils sont mélangés à du plasma en présence de dextrose. Bien que ces anticorps sont habituellement dilués en solution saline (0.9% NaCl), certaines situations de thérapies combinées, notamment une co-administration avec des chimiothérapies diluées en dextrose, pourraient aboutir à l'agrégation des anticorps, en fonction de la quantité de dextrose dans la circulation sanguine.

3.4.2 Mises en évidence dans les modèles animaux

Les modèles animaux sont couramment utilisés pour l'étude de la toxicité des produits d'usage thérapeutique. Cependant, la pertinence de leur utilisation pour prédire l'immunogénicité est sujette à débat. Le problème majeur de ce type de modèle est la possibilité

de transposer les résultats chez l'homme, car peu d'études chez l'animal ont trouvé écho chez les patients. L'utilisation de souris conventionnelles pose un problème dans la mesure où la plupart des protéines thérapeutiques humaines vont être des protéines étrangères pour ces organismes, conduisant à la mise en place d'une réponse immunitaire.

Afin d'éviter la mise en place d'une réponse immunitaire contre une protéine humaine, des souris transgéniques ont été développées. Celles-ci expriment la protéine d'intérêt (hormone de croissance humaine, ou IFN- β humain, par exemple), ce qui permet ainsi de rendre l'animal tolérant vis-à-vis de la protéine. Ce type de modèle s'est notamment révélé efficace dans le cas de l'IFN- β , puisqu'il y a été montré que le Betaseron[®] induisait une plus grande immunogénicité que le Rebif[®] ou l'Avonex[®] chez les souris transgéniques, résultats qui sont similaires à ceux retrouvés chez les patients (van Beers et al., 2010a). Il s'est néanmoins avéré incapable de montrer les différences d'immunogénicité entre le Rebif[®] et l'Avonex[®] qui sont observées chez les patients (Bertolotto et al., 2004).

Ce modèle a également été utilisé dans le but de mettre en évidence l'immunogénicité induite par les agrégats. La première étude à avoir utilisé ce type de modèle pour étudier l'immunogénicité induite par les agrégats a été réalisée par Braun et collaborateurs sur l'IFN α (Braun et al., 1997). Ils ont ainsi observé que dans les souris transgéniques pour cet IFN, les agrégats induisaient une réponse anticorps, tandis que les monomères en étaient incapables. De manière intéressante, il a par la suite été montré que plus les agrégats présentaient des épitopes natifs, meilleure était la réponse (Hermeling et al., 2006). La présence de faible taux d'épitopes natifs (environ 1%) permet tout de même, chez certains animaux, la mise en place d'une réponse anticorps contre l'IFN α natif. Le modèle a également permis de montrer que l'utilisation de surfactant, servant à réduire le taux d'agrégats dans les préparations induisait une diminution des taux d'ADA (Rifkin et al., 2011). Enfin, une étude a montré que les agrégats d'IFN β , bien qu'induisant à court terme une production d'anticorps, ne semblaient pas générer de réponse mémoire (van Beers et al., 2010b). Par ailleurs, il a été montré que les agrégats d'hormone de croissance humaine n'induisaient pas de réponse anticorps dans les souris transgéniques, alors que les souris conventionnelles répondent à ceux-ci (Fradkin et al., 2009).

Il a également été utilisé pour étudier l'impact de la formulation de la GH sur son immunogénicité, ou encore l'effet de l'addition d'un groupement PEG à l'IFN- β sur la production d'ADA (Brinks et al., 2011).

3.4.3 Etudes *in vitro*

Bien que plusieurs études aient montré aussi bien chez l'homme que chez l'animal l'implication des agrégats dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques, les mécanismes cellulaires responsables n'ont été étudiés que très récemment. En effet, la première étude *in vitro* remonte à 2012. Elle porte sur l'effet de différents types d'agrégats d'IgG humaines sur l'activation de PBMC humains. Joubert et collaborateurs ont ainsi montré qu'en réponse aux agrégats d'anticorps humains, les PBMC en culture produisaient diverses cytokines inflammatoires. De manière intéressante, les auteurs ont pu constater que chaque anticorps monomérique pouvait posséder sa propre signature cytokinique. Ils ont par ailleurs constaté que les agrégats possédaient une signature différente du monomère, et qu'elle était redondante entre les différents agrégats. La signature comprend : IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL-2, CCL-3, CCL-4, MMP-2 et le TNF α . Cette étude s'est également intéressée aux récepteurs qui pourraient être impliqués dans l'interaction entre les agrégats et les PBMC. Il a ainsi été mis en évidence une implication des Fc γ R, mais également des TLR 2 et 4 (Joubert et al., 2012).

Deux études se sont plus particulièrement intéressées à l'effet des agrégats d'anticorps sur la maturation des DC. Les auteurs ont pour cela utilisé un modèle de cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC). Rombach-Riegraf et collaborateurs ont montré que des agrégats d'anticorps produits par un stress thermique pouvaient augmenter l'expression des marqueurs CD80, CD83 et CD86 à la surface des DC. Ils se sont d'autre part, intéressés aux peptides présentés par les DC suite à leur incubation avec les anticorps natifs et les agrégats. Par une technique de MAPP assay, ils ont ainsi montré que les DC incubées en présence des agrégats présentaient plus de peptide, chargés sur les molécules de CMHII, aussi bien en terme de nombre de peptides qu'en terme de diversité. En effet, les DC incubées en présence des monomères ne présentent qu'un nombre limité de peptides, globalement tous issus de la même région de la chaîne lourde de l'anticorps, tandis que dans le cas des agrégats, les peptides présentés sont issus de différentes régions de la chaîne lourde ainsi que de la chaîne légère (Rombach-Riegraf et al., 2014).

Les agrégats utilisés aussi bien dans ces études *in vitro* que dans la plupart des études *in vivo* sont produits par application de stress exagérés, et les particules ainsi produites sont de taille importante (>1 μ m), et en quantité importante. Une étude s'est par ailleurs intéressée à l'effet immunomodulateur de deux anticorps faiblement agrégés, le Rituximab et le Trastuzumab (Ahmadi et al., 2015). Comme précédemment, cette étude a été réalisée sur des DC dérivées de monocytes. Alors que Rombach Riegraf et collaborateurs observaient une maturation des DC en réponse aux agrégats, cette étude montre globalement une absence de réponse des DC par les

agrégats de Rituximab et de Trastuzumab. Dans cette étude, les agrégats ont été produits par différents stress, agitation, chaleur, congélation/décongélation, avec pour objectif de ne pas avoir plus de 3% d'agrégats. Seuls les agrégats de Trastuzumab produits par la chaleur et l'agitation induisent une augmentation de l'expression de CD86. Les autres agrégats, ainsi que ceux de Rituximab, n'induisent pas d'expression des marqueurs d'activation CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR par rapport aux protéines natives. Cette observation est corrélée à une absence de modulation de la production de cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-12) par les différents agrégats. La seule modulation observée concerne la production d'IL-10, et ce uniquement par les agrégats de Trastuzumab générés par la chaleur et par l'agitation. Enfin, les auteurs ont mesuré l'impact des agrégats sur la prolifération de LyT CD4⁺, ainsi que leur production de cytokines. Ils ont noté que les différents agrégats de Rituximab ne modulaient pas la réponse des LyT, tandis que les agrégats de Trastuzumab augmentaient la prolifération ainsi que la production d'IL-2 et d'IL-10 par les LyT (Ahmadi et al., 2015).

En conclusion, ces différentes études montrent d'une part que les agrégats de protéines thérapeutiques peuvent induire des réponses cellulaires et d'autre part, que les DC sont sensibles à certaines formes d'agrégats et pourraient donc intervenir dans la mise en place d'une réponse immune.

Objectifs du travail

Le développement des protéines recombinantes à usage thérapeutique a ouvert de nouvelles perspectives dans le traitement de nombreuses pathologies. Néanmoins, la présence d'ADA chez le patient peut affecter son efficacité. Parmi les facteurs contributifs, les agrégats semblent jouer un rôle prépondérant dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques ; cependant, les mécanismes responsables de cette réponse sont encore peu documentés. La présence d'ADA de haute affinité et de divers isotypes chez les patients suggère la mise en place d'une réponse immunitaire classique, avec intervention de cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques pour initier la réponse. L'objectif de ce travail est de vérifier cette hypothèse, en **déterminant si les agrégats peuvent participer au déclenchement d'une réponse immunitaire, impliquant les cellules dendritiques**

La première partie de ce travail a consisté à **produire et caractériser**, par différentes méthodes complémentaires, **des agrégats à partir de protéines utilisées en clinique**. Deux types de protéines ont été sélectionnées : l'hormone de croissance humaine (hGH) et le Rituximab®, un anticorps de type IgG1. Une préparation d'IgG1 polyclonales purifiées a également été employée. Les agrégats ont été générés en mimant un stress que peuvent couramment subir les protéines au cours de leur production ou avant injection au patient. L'objectif était de produire suffisamment d'agrégats de taille similaire entre les différentes protéines afin de pouvoir comparer leurs effets sur la maturation des DC.

Dans une deuxième partie, nous avons évalué **l'effet des agrégats de protéines sur les capacités fonctionnelles de DC dérivées de monocytes sanguins humains (moDC)**. Cet effet a été observé en mesurant l'expression de différents marqueurs à la surface des DC, marqueurs d'activation, ou molécules de co-stimulation. Par ailleurs, nous avons réalisé, par une technique multiplex, le dosage de différentes cytokines et chimiokines produites par les DC en réponse aux agrégats. La capacité de ces DC à mettre en place une réponse lymphocytaire T a été étudiée en réalisant des expériences de co-culture allogénique DC/LyT CD4⁺. La prolifération des LyT, ainsi que leur production de cytokines ont été mesurées.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans ce type de réponse : Au sein des DC, la voie des MAPK et la voie NF-κB contrôlent l'acquisition d'un phénotype mature en réponse à divers agents pathogènes ou molécules allergisantes. Afin de mieux documenter l'effet des agrégats sur les DC, nous nous sommes donc intéressés à l'activation de ces voies au cours de la maturation induite par les

Objectifs

agrégats. Nous avons étudié l'implication des voies MAPK et NF- κ B d'une part par Western blot, et en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques d'autre part.

Cette thèse a été réalisée et financée dans le cadre du consortium européen ABIRISK. Ce projet se décompose en plusieurs Work Packages (WP). Le WP3 vise à développer et évaluer des techniques permettant de prédire l'immunogénicité d'une protéine thérapeutique. Ce WP s'intéresse notamment aux agrégats présents dans les spécialités thérapeutiques, et à leur potentiel immunogène. Le travail a été réparti de la manière suivante : le WP3.10 a été en charge de produire et caractériser des agrégats à partir de différents anticorps monoclonaux actuellement utilisés en thérapeutique, l'Infliximab, le Rituximab, l'Adalimumab et le Natalizumab. Le WP3.6, dont nous faisons partie, a pour objectif d'étudier l'impact des agrégats sur la maturation des DC, avec pour but ultime de mettre en évidence des paramètres d'activation des DC qui permettraient de détecter la présence d'agrégats dans les préparations de protéines thérapeutiques. Différentes techniques d'analyse ont ainsi été employées : l'analyse de transcrits de cytokines et chimiokines par qPCR, le dosage de protéines dans les surnageants de culture, l'analyse du phénotype membranaire des DC par cytométrie en flux, et enfin l'analyse des voies de signalisation.

Résultats: Article

Therapeutic human growth hormone and IgG aggregates trigger dendritic cells activation and polarize CD4+T cells responses.

Y Gallais, N Szely, F-X Legrand, A Leroy, M Pallardy and I Turbica

En revision dans *Immunology and Cell Biology*

La compréhension des facteurs responsables de l'immunogénicité induite par les protéines thérapeutiques est un enjeu majeur sur lequel se sont focalisées de nombreuses études, mais les mécanismes cellulaires aboutissant à la production d'ADA chez les patients sont encore mal compris. La présence d'agrégats lors de l'administration des spécialités a notamment fait l'objet d'un intérêt particulier, car elle a été corrélée au développement d'ADA. Il a été observé que ces ADA sont de haute affinité, ce qui suggère la mise en place d'une réponse immunitaire dite classique, qui pourrait se dérouler de la manière suivante : les protéines thérapeutiques seraient captées par des CPA et en particulier les DC, et les agrégats pourraient constituer des signaux de danger qui favoriseraient la maturation et la migration des DC dans les organes lymphoïdes, pour initier une réponse immunitaire adaptative de type T helper. Ces LyT induiraient *in fine* la maturation de lymphocytes B en plasmocytes, capables de produire des ADA de haute affinité et d'isotypes divers.

L'objectif de ce premier travail est de montrer que les agrégats de protéines peuvent induire une activation des DC suffisante pour permettre l'induction d'une réponse T helper. Pour cela, nous avons d'abord établi un modèle d'agrégats à partir de protéines utilisées en thérapeutique, de complexités différentes. Nous avons choisi d'une part l'hormone de croissance humaine (hGH), protéine de 22 kDa de structure simple car elle présente uniquement des hélices alpha et elle est non glycosylée ; d'autre part nous avons choisi deux anticorps pour représenter des protéines complexes, une IgG1 humaine polyclonale purifiée de sérum de donneurs, et le Rituximab qui est une IgG1 recombinante chimérique, dirigée contre la molécule CD20. Nous avons établi un protocole d'agrégation des ces protéines, de manière à induire des agrégats comparables, par induction d'un stress d'agitation (stirr-stress). Ces agrégats ont ensuite été caractérisés par 3 méthodes orthogonales : diffraction dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS), par dichroïsme circulaire et par spectroscopie de fluorescence. Les résultats ont confirmé la perte de structure des protéines agrégées, et ont montré la formation de particules de taille comparable.

Nous avons étudié l'effet de ces agrégats sur la maturation de DC différenciées *in vitro* à partir de monocytes humains sanguins issus de donneurs sains. Ces monocytes ont été purifiés par tri magnétique puis différenciés en moDC immatures, en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 5 jours. Nous avons d'abord observé que les protéines natives ne modulaient pas le phénotype membranaire des moDC, ni la sécrétion de cytokines ou de chimiokines. En revanche les agrégats de hGH et d'IgG induisaient une augmentation de l'expression des molécules CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR, alors que les agrégats de Rituximab augmentaient uniquement l'expression de CD83 et CD86 et de manière moins importante. Nous avons également constaté que la capacité sécrétoire des moDC était accrue après stimulation par les agrégats. La hGH agrégée ainsi que les agrégats d'anticorps augmentaient la sécrétion d'IL-6, IL-8 et d'IL-12p40. En revanche, nous avons observé que seuls les agrégats de hGH augmentaient de manière significative la sécrétion des chimiokines, CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10. Ces premiers résultats suggèrent que les agrégats de protéines peuvent être assimilés à des signaux de danger pour activer les DC, mais que les mécanismes d'activation ou les récepteurs mis en jeu peuvent être différents.

Les conséquences fonctionnelles activatrices des agrégats sur les moDC ont ensuite été étudiées en regardant leur impact sur l'activation de LyT CD4⁺. Par des expériences de co-cultures allogéniques, nous avons ainsi montré que les moDC stimulées par les agrégats des différentes protéines induisaient une prolifération des LyT. Nous avons également mesuré la production de cytokines par ces LyT, reflet de leur polarisation. Le profil cytokinique obtenu est différent en fonction du type d'agrégat étudié. En effet, les DC stimulées par les agrégats de hGH induisent une polarisation de type Th1, tandis que les DC stimulées par les agrégats d'anticorps induisent une réponse mixte, avec production d'IFN γ , IL-5, IL-13 et IL-17.

En résumé, cette étude nous a permis de montrer que les agrégats de l'hormone de croissance ou d'anticorps peuvent induire la maturation des DC en augmentant l'expression des marqueurs phénotypiques ainsi que la production de cytokines et/ou de chimiokines. Les trois niveaux d'activation requis des DC (présentation des agrégats, molécules d'activation et de co-stimulation, et cytokines) sont suffisants pour induire une réponse lymphocytaire, dont la polarisation est dépendante de la nature des protéines agrégées. Ces résultats sont décrits pour la première fois concernant la GH, et confirment d'autres études *in vitro* réalisées avec les anticorps. La comparaison des réponses cellulaires obtenues avec ces 3 modèles de protéines agrégées suggère des mécanismes de reconnaissance et intra-cellulaires différents induits dans les cellules dendritiques.

1 **Effect of growth hormone and IgG aggregates on dendritic cells activation and T-cells**
2 **polarization**

3

4 Y Gallais¹, N Szely¹, F-X Legrand^{2,3}, A Leroy³, M Pallardy¹ and I Turbica¹, on behalf of the
5 ABIRISK Consortium

6

7 ¹ INSERM UMR-S 996, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UFR de Pharmacie, 92296
8 Chatenay-Malabry, France

9 ² CNRS UMR 8612, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UFR de Pharmacie, 92296
10 Chatenay-Malabry, France

11 ³ Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UFR de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92296
12 Chatenay-Malabry, France

13

14 Corresponding author: Isabelle Turbica. E-mail: isabelle.turbica@u-psud.fr.

15 Phone: 33 1 46 83 52 99

16

17 Running title:

18 Protein aggregates and innate immune responses

19

20 Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

21

22 This work has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking
23 (IMI JU) under grant agreement no. [115303], resources of which are composed of financial
24 contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/ 2007-2013)
25 and EFPIA companies' in kind contribution.

26 Yann Gallais was supported by ABIRISK, IMI JU, under grant agreement no. 115303

27 **ABSTRACT**

28 Patients treated with therapeutic biological products (BP) frequently develop anti-drug
29 antibodies (ADA) with potential neutralizing capacities leading to loss of clinical response, or
30 serious side effects. BP aggregates have been suggested to promote immunogenicity thus
31 enhancing ADA production. Dendritic cells (DC) are key effectors in T-cell and B-cell fates
32 and the subsequent generation of immunogenicity. The objective of this work was to
33 determine if BP aggregates can participate to DC maturation and T-cell activation.

34 We compared aggregates from three different proteins: human growth hormone (hGH),
35 Rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody and a serum-purified human IgG1. All three
36 proteins underwent a stir stress, generating comparable populations of aggregated particles.

37 Maturation of human monocyte-derived DC (moDC) upon exposure to native BPs or
38 aggregates was evaluated *in vitro*. Results showed that hGH aggregates induced an increased
39 expression of moDC co-stimulation markers, and augmented levels of IL-6, IL-8, IL-12p40,
40 CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL10. Both antibodies aggregates were also able to modify DC
41 phenotype but cytokine and chemokine productions were seen only with IL-6, IL-8, IL-12p40
42 and CXCL10. Aggregates-treated moDC enhanced allogenic T-cell proliferation and
43 cytokines production suggesting Th1 polarization with hGH, and mixed T-cell responses with
44 antibodies aggregates. These results showed that BP aggregates provoked DC maturation thus
45 driving adaptive T-cell responses and polarization.

46

47 INTRODUCTION

48 A major drawback in the use of therapeutic biological products (BP) is the development of
49 immune responses leading to anti-drug antibodies (ADA) production in patients (Baker et al.,
50 2010). ADA may have neutralizing effect against the biomolecule resulting in low serum drug
51 concentrations and loss of clinical response. ADA can also induce potential hypersensitivity
52 reactions and adverse effects such as infusion reactions (Vultaggio et al., 2010). Among
53 numerous factors involved in immunogenicity are product-related factors including structural
54 properties such as primary sequence divergences from the human counterpart, the presence of
55 exogenous or endogenous epitopes, glycosylation pattern, or physical alterations of the
56 proteins (Hermeling et al., 2004). Protein aggregation is a process of non-specific association
57 of two or more unfolded protein monomers, mainly as a consequence of hydrophobic
58 interactions. Aggregation mechanisms involve several pathways based on physical and
59 chemical interactions that are well documented (Cromwell et al., 2006; Mahler et al., 2009;
60 Wang et al., 2010a). This process results in large aggregates heterogeneity in term of structure
61 and morphology and consequently multiple analytical methods are necessary for aggregates
62 characterization. The major analytical methods used for aggregates characterization are
63 electrophoresis, light scattering, spectroscopy and microscopy (Wang, 2005).

64 The hypothesis of a correlation between the presence of aggregates in therapeutic preparations
65 and ADA development response in patients has been raised for several years. For instance
66 aggregates have been detected in patient's sera following administration of human gamma
67 globulins or human growth hormone (hGH) (Ellis and Henney, 1969; Moore and Leppert,
68 1980b). These findings were more recently confirmed with animal models, wherein
69 aggregates of different proteins injected in transgenic mice resulted in ADA development.
70 This was the case for Interferon alpha or beta (van Beers et al., 2010b; Human et al., 2014;
71 Maas et al., 2007), for Factor VIII (Purohit et al., 2006) and for monoclonal antibodies with

72 variable magnitude of immune responses, depending on the nature of aggregates (Filipe et al.,
73 2012; Freitag et al., 2015). Other mice models also clearly demonstrated the role of hGH
74 aggregates in the production of different IgG subtypes, suggesting that multiple mechanisms
75 could underlie the immune response (Christie et al., 2014; Fradkin et al., 2009).

76 Cellular mechanisms involved in BP aggregates immunogenicity are poorly documented,
77 although two hypotheses are currently being explored (Brennan et al., 2010; Sauerborn et al.,
78 2010). One is a T-cell-independent polyclonal B-cell activation, where BP aggregates could
79 bind to B-cell receptors, resulting in direct activation of B-cells and low affinity antibody
80 production. The second hypothesis is a CD4⁺ T-cell-dependent B-cell activation, supported
81 by the presence of high affinity ADA in patients (Bartelds et al., 2010; Benucci et al., 2013;
82 Deisenhammer et al., 2001; Reding, 2006; Reding et al., 2002; Vultaggio et al., 2010).
83 Recently, Joubert et al. (Joubert et al., 2012) addressed the impact of antibodies aggregates on
84 innate immune responses, defined a cytokine signature in peripheral blood mononuclear cell
85 (PBMC), and highlighted a role for Toll Like Receptors (TLR), Fc gamma receptors (Fc γ R)
86 and complement in these responses. Antibody aggregates were also able to induce an
87 increased CD4⁺ T-cell proliferation, compared to native counterparts (Ahmadi et al., 2015;
88 Joubert et al., 2012; Rombach-Riegraf et al., 2014).

89 In this later context, CD4⁺ T-cells require activation by professional antigen presenting cells,
90 such as Dendritic Cells (DC) playing a pivotal role in CD4⁺ T-cell proliferation and
91 polarization. Indeed, aggregates could be recognized as danger signals and bind to Pathogen
92 Recognition Receptor (PRR) or other receptors on immature DC, inducing subsequent
93 maturation and migration of the DC to the draining lymph nodes, where priming of specific
94 CD4⁺ T-cells could occur. Recent works using human monocyte-derived DC (moDC) and
95 PBMCs have shown that antibody aggregates induced moDC maturation *in vitro*, cytokines
96 production (Ahmadi et al., 2015; Rombach-Riegraf et al., 2014) and processed peptides

97 presented by HLA-DR molecules have been identified in this context (Rombach-Riegraf et
98 al., 2014).

99 The objectives of this study were to compare the effect of protein aggregates regarding their
100 capacity to induce moDC activation, and to determine how this activation could be effective
101 to trigger a subsequent T helper response. For this purpose, we compared three protein models
102 with different complexity and glycosylation status: hGH, a non-glycosylated 30 kDa protein,
103 gathering mainly α -helix structures, serum-purified human IgG1, representing a complex self-
104 protein, and formulated chimeric antibody Rituximab. We submitted these proteins to stir
105 stress to generate aggregates that could mimic those appearing during therapeutic proteins
106 manufacturing and shipping process (Rombach-Riegraf et al., 2014). Physico-chemical
107 properties of generated aggregates were characterized using complementary methods. We
108 showed that aggregates differently induced *in vitro* moDC maturation as indicated by
109 phenotypic analyses of key maturation and activation markers or cytokines and chemokines
110 production in moDC supernatants. Interestingly, aggregate-activated moDC could induce
111 CD4⁺ T-cell activation in co-culture experiments with cytokine profile depending on the type
112 of protein suggesting different mechanisms of DC activation with these proteins.

113

114 RESULTS**115 Generation and Characterization of protein aggregates**

116 Aggregates were generated by submitting native hGH, IgG1 and Rituximab to a stirring
117 stress. Protocols for GH aggregation (Fradkin et al., 2009), and antibodies aggregation
118 (Joubert et al., 2011) were already described and we followed the same procedures. hGH
119 aggregates were generated by a 72h stirring stress, whereas Rituximab and the IgG1
120 aggregates were generated by a 20h stirring stress. The resulting solutions showed typical
121 turbidity after treatment, indicating formation of larger particles (data not shown). Native and
122 aggregate-containing solutions were then analyzed by Dynamic Light Scattering. The results
123 are reported in Figure 1A as mean particle diameter using intensity-weighted analysis. Native
124 hGH, Rituximab and IgG1 gave a symmetric distribution centered around 5.8 ± 0.3 nm, $7.6 \pm$
125 0.8 nm and 11.1 ± 0.4 nm respectively. In contrast the stirring stress resulted in in the
126 formation of particles with a larger diameter of the following sizes: 892 ± 141 nm for hGH,
127 1917 ± 52 nm for Rituximab and 867 ± 45 nm for IgG1. Moreover the polydispersity indexes
128 were small, showing good homogeneity in aggregates invisible to the naked eye.

129 Steady state fluorescence spectroscopy (Figure 1B) was used to show and confirm the
130 aggregation states of the proteins submitted to the aggregation process by stirring. Emission
131 scans of native or aggregated products were recorded at an excitation wavelength of 295 nm
132 in order to excite Trp residues specifically. The emission was recorded from 280 and 440 nm,
133 the light scattering between 280 and 310 nm, and the fluorescence from 310 to 440 nm. For
134 all stirred products, a dramatic increase of light scattering at 295 nm was recorded compared
135 to native products, which confirmed the aggregation process. An apparent blue shift (shift of
136 fluorescence to lower wavelength) of Trp fluorescence was observed particularly for the
137 stirred hGH (that contains only one or two Trp residues, depending on the variant), and also

138 for the stirred antibodies. Nevertheless, this apparent blue shift can result from the
139 tremendous increase of light scattering at 295 nm excitation wavelength, and has to be
140 considered with caution as aggregation can bury some Trp residues in proteins, or can lead to
141 the exposition to solvent for some of them. Indeed, burying of Trp residues in interfacial
142 regions resulting from the aggregation process is expected.

143 Furthermore, by fluorescence anisotropy we observed changes in Trp mobility when proteins
144 were submitted to the stirring stress. Indeed, measured values were 0.125 for native hGH and
145 0.07 either for native IgG1 or Rituximab. This very low anisotropy reflected high amounts of
146 Trp residues in antibodies. Fluorescence anisotropy were increased in stir stressed proteins
147 (0.23 for hGH aggregates and 0.175 for both aggregated antibodies), indicating that the
148 overall Trp residues microenvironment were altered.

149 Finally, CD was used to analyze aggregates secondary structures (data not shown). As
150 expected, hGH native spectrum showed mainly α -helix structures appearing in the 210-230
151 nm range. Stirred hGH lead to a partial α -helix loss, showed by a reduction of the intensity of
152 the curve. On the other hand, native antibodies spectra showed mainly β -sheet structures as
153 expected for an IgG, and the stirring stress induced a dramatic change in the shape of the
154 curve that could be explained by the high turbidity of the samples.

155 Aggregates stability was checked by thawing representative stored preparations 1 and 2
156 months after freezing that were then analyzed using the 3 methods used above. No
157 modifications were found after a 2 months storage of the products at -80°C .

158

159

160

161 **Aggregates modulated moDC phenotype**

162 The capacity of native or aggregated proteins to induce moDC maturation was assessed using
163 final concentrations of 10, 50 and 200 $\mu\text{g/ml}$, according to previous studies (25, 26). The
164 toxicity of native or aggregated proteins was first checked using IP staining. We observed that
165 whatever was the concentration tested, neither native proteins nor aggregates showed toxicity,
166 as cell viability was always over 90% (data not shown). To determine the products
167 concentrations to be used in the next experiments, we monitored the expression of CD86 and
168 CD83 (Fig 2.A). Native hGH showed only a weak effect on CD83 or CD86 expression
169 compared to non stimulated cells, whatever was the concentration, or the time of incubation
170 used (24h or 48h). Similar results were obtained with hGH aggregates at 10 $\mu\text{g/ml}$. In
171 contrast, at 50 $\mu\text{g/ml}$ and 200 $\mu\text{g/ml}$ aggregated hGH induced an increase of CD83 and CD86
172 expressions, in particular 48h after stimulation. Native Rituximab didn't increase the
173 expression of markers on moDC compared to non-stimulated cells. For the 200 $\mu\text{g/ml}$
174 concentration, Rituximab aggregates induced a fold increase over 1.5 for both markers, at 24h
175 or 48h after stimulation. Native IgG1 aggregates at 10 $\mu\text{g/ml}$ induced a slight increase in
176 marker expressions, whereas aggregates at 50 $\mu\text{g/ml}$ induced a fold increase over 2, after 24
177 hours stimulation. The 200 $\mu\text{g/ml}$ concentration didn't potentiate the observed effects at 50
178 $\mu\text{g/ml}$. Based on these observations, the selected concentrations for the following experiments
179 were 50 $\mu\text{g/ml}$ for hGH and IgG1 and 200 $\mu\text{g/ml}$ for Rituximab.

180 We next assessed the effect of aggregates on the expression of different markers involved in
181 the DC-T-cell synapse (CD40, CD80, CD86 and HLA-DR). As already noticed in the
182 previous dose-response experiments, native products slightly modulated marker expression
183 levels compared to non-stimulated cells. In contrast aggregated hGH induced a significant
184 increase of CD80, CD83, CD86 and HLA-DR 48h after stimulation, with the following fold
185 increase: 1.7 ± 0.2 , 3.5 ± 0.3 , 4.2 ± 0.7 and 2.23 ± 0.3 respectively. CD40 expression was also

186 increased (1.2 ± 0.1). Similar results were obtained with aggregated IgG1, 24 h after
187 stimulation, with the following fold increase: CD40: 1.36 ± 0.04 , CD80: 1.8 ± 0.18 , CD83:
188 5.5 ± 1.6 , CD86: 3.5 ± 0.54 and HLA-DR: 2.6 ± 0.1 . Finally, Rituximab aggregates were able to
189 induce a significant increase in CD83 (1.9 ± 0.22) and CD86 (1.6 ± 0.22) 24h after stimulation,
190 while the other markers weren't significantly modulated.

191 These results showed that compared to the monomeric native counterpart, aggregates could
192 induce moDC maturation, based on membrane marker expression.

193

194 **Aggregates induced production of inflammatory cytokines and chemokines by moDC.**

195 To further document the effect of the protein aggregates on moDC, we quantified several
196 proinflammatory cytokines and chemokines in DC culture supernatants. No IL-1 β production
197 was detected in response to any native product or its aggregated form. Slight but non-
198 significant increases of cytokine and chemokine productions by moDC incubated with native
199 proteins were detected compared to unstimulated moDC (Figure 3). In contrast, incubation of
200 moDC with aggregated proteins significantly increased the production of several cytokines
201 and chemokines (Table 1 and Figure 3). Aggregated hGH and aggregated Rituximab induced
202 a significant increase of IL-6, compared to their native counterparts, whereas aggregated
203 serum-purified IgG1 also increased IL-6 secretion but not significantly. All aggregated
204 proteins dramatically increased IL-8 production, and similar increases were obtained for IL-
205 12p40 production (Figure 3). Regarding chemokine productions (Figure 3), aggregated hGH
206 dramatically increased CCL2, CCL3 and CCL4 productions (Table 1 and Figure 3), whereas
207 this observation wasn't present for antibodies aggregates compared to native counterparts.
208 Interestingly, aggregated hGH augmented CXCL10 compared to its native counterpart. For
209 antibodies, only IgG1 aggregates augmented CXCL10 levels compared to its native

210 counterpart whereas Rituximab aggregates didn't modify CXCL10 production by moDCs.
211 Taken together, these results confirmed the potential of hGH and antibodies aggregates to
212 modulate moDC cytokines and chemokines production.

213

214 **MoDC stimulated with aggregated products were able to potentiate T-cell proliferation**

215 To evaluate the functional consequences of moDC maturation and activation by aggregated
216 proteins, we tested the capacity of moDC treated with aggregates and their native counterparts
217 to induce CD4⁺ T-cells proliferation. MoDC incubated with native or aggregated products
218 were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells loaded with CFSE at a ratio of 1 moDC for 10
219 CD4⁺ T-cells. Proliferation was assessed on day 5 as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-
220 cells. At the end of the culture, less than 20% of T cells were CFSE^{low} when incubated with
221 untreated moDC. Native products poorly altered the capacity of moDC to induce T-cell
222 proliferation (Figure 4A), compared to unstimulated moDC. In contrast, the percentage of
223 CFSE^{low} CD4⁺ T-cells was increased in the presence of aggregate-treated moDCs compared
224 to moDC stimulated with their native counterparts (Figure 4B, a representative experiment is
225 shown in Figure 4A). It was noteworthy that T-cell proliferation levels due to aggregates were
226 comparable with those induced by moDC treated with LPS. Indeed, these data suggested that,
227 aggregates induced the capacity of moDC to modulate allogeneic CD4⁺ T-cells activation.

228

229 **hGH and antibodies aggregates polarized CD4⁺ T-cells responses**

230 To further explore T-cells responses induced by moDC stimulated with aggregates, we
231 analyzed the production of cytokines in DC-T-cells co-culture supernatants (Figure 5). MoDC
232 stimulated with native proteins didn't modify the CD4⁺ T-cell cytokine pattern compared

233 with unstimulated moDC. However, DC stimulated with hGH aggregates induced a strong
234 IFN- γ release, suggesting a Th1 polarization. Similarly, moDC stimulated with Rituximab
235 aggregates or IgG1 aggregates increased IFN- γ production, but they also induced a significant
236 augmentation of IL-17 (for Rituximab), IL-5 and IL-13 synthesis. These latter results
237 suggested that, in contrast to hGH aggregates, antibody aggregates were able to induce mixed
238 T helper lymphocyte responses.

239

240

241

242 **DISCUSSION**

243 Although the presence of aggregates in biotherapeutics has been correlated with ADA
 244 development in patients, experiments to evaluate cellular mechanisms supporting aggregates
 245 effects on therapeutic protein immunogenicity are lacking. In this work, we analyzed the
 246 impact of aggregates on DC, as these professional antigen-presenting cells are known to play
 247 a crucial role in adaptive immune responses. We chose three protein models to generate
 248 aggregates that we next characterized: recombinant hGH, for which ADA formation has been
 249 reported in 1–75% of treated patients (Massa et al., 1993; Pirazzoli P, Cacciari E, Mandini M,
 250 Cicognani A, Zucchini S, Sganga T, 1995; Rougeot et al., 1991), a serum-purified human
 251 IgG1 and a chimeric antibody, Rituximab, that showed clinical immunogenicity in
 252 rheumatoid arthritis patients (Mok, 2014; van Vollenhoven et al., 2010). We then showed that
 253 aggregates were able to induce moDC maturation, evidenced by key surface markers increase,
 254 and by cytokines and chemokines production. Moreover aggregates-primed moDC were able
 255 to induce CD4+ T-cell responses that were dependent on the type of the protein.

256 Aggregates can be generated at any step of therapeutic protein production but their
 257 presence is usually well controlled (den Engelsman et al., 2011), which is not the case during
 258 transportation, storage and administration procedures. We chose to generate aggregates using
 259 stir stress as this stress has been shown to give predominantly sub-visible monoclonal
 260 antibody particles (Joubert et al., 2011; Kiese et al., 2008; Telikeypalli et al., 2015) and to
 261 promote a robust cytokine release in PBMCs (Joubert et al., 2012; Telikeypalli et al., 2015).
 262 Resulting preparations were next analyzed with different techniques, following an orthogonal
 263 strategy. Dynamic Light Scattering (DLS) has been frequently used for protein particles size
 264 analysis, in particular for mAbs (Ahmadi et al., 2015; Kiese et al., 2008; Rombach-Riegraf et
 265 al., 2014). Results showed that stirring stress induced relatively similar size aggregates for
 266 hGH, Rituximab or the purified IgG1, indicating homogeneity among the obtained

267 preparations. This observation allowed us to address the effects related to the size of the
268 particles. This is an important aspect since it has been shown that different aggregate sizes
269 may have different effects on cellular responses (Joubert et al., 2012). Rituximab stirring
270 aggregation has been previously studied (Ahmadi et al., 2015), showing a Z average of 10 nm
271 and 1540 nm for native and stressed Rituximab respectively, in accordance with our
272 observations. However, in another study, stirring stress applied on a chimeric mouse/human
273 IgG1 resulted in two mixed particles populations, the native protein appearing together with
274 larger particles showing a diameter around 100 nm diameter (Mahler et al., 2005). These
275 discrepancies could be explained by the fact that the stirring speed (600 rpm) was lower than
276 the one we applied in our work (1000 rpm).

277 Aggregates analysis by fluorescence spectroscopy showed an overall loss of tryptophan
278 mobility for all products, indicating that at least the environment of some Trp residues was
279 disrupted suggesting changes in the aggregated protein structures. Increase of Trp steady state
280 anisotropy reflect two changes: the first is an average decrease of local mobility of some Trp
281 residues in the aggregated proteins and the second is the increase of anisotropy in relation
282 with the lower mobility in solution of the aggregated protein objects. These results were in
283 accordance with other antibodies aggregates analysis using the same method (Joubert et al.,
284 2011).

285 Circular Dichroism (CD) was recently described as a powerful tool to detect aggregates
286 formation of in mAbs preparations (Joshi et al., 2014). The interest of this method is the
287 evaluation of structural changes, comparing native and stressed proteins. We also observed
288 some changes in the circular dichroism signal of hGH (data not shown) with low α -helix loss
289 in hGH secondary structure following the stirring stress, consistent with previous observations
290 that showed a 2% increase in random coil structures in stressed hGH (Fradkin et al., 2009).
291 These results suggested that hGH aggregates may contain new protein epitopes obtained after

292 stirring. In contrast, CD analysis was comparable for Rituximab and IgG1, showing a
293 dramatic perturbation of the signal in relation with the tremendous increase in the light
294 scattering after stirring. Previous structural studies on mAbs aggregates showed that stirring
295 stress indeed induced intramolecular loss of β sheet structures in IgG1 aggregates, whereas
296 some intermolecular β sheet structures were detected (Telikepalli et al., 2015).

297 In the presence of danger signals DC undergo extensive phenotypic alterations leading
298 to mature immunogenic DC after migration to the lymph nodes. We observed that aggregates
299 increased the expression of surface molecules involved in the DC-T-cell immune synapse.
300 This observation has been previously described with Rituximab or other mAbs aggregates
301 generated using different stresses (Ahmadi et al., 2015; Rombach-Riegraf et al., 2014) with
302 similar results, i.e. CD83 or CD86 expression increase. Moreover, we showed that purified
303 IgG1 aggregates had a higher capacity than Rituximab aggregates to induce CD83 and CD86
304 augmentation on the cell membrane, but also for CD40, CD80 and HLA-DR that were not
305 modified by Rituximab aggregates. Both antibodies are IgG1 and these differences could be
306 the consequences of different affinities for Fc γ R or differences in structure (chimeric vs fully
307 human). In this work we are showing for the first time that hGH aggregates induced moDC
308 maturation, with a comparable profile of markers increase as for IgG1 aggregates, suggesting
309 that both aggregates could be perceived in the same way by moDC.

310 We then measured cytokine and chemokine release by stimulated moDC and found that
311 aggregates from the three proteins increased IL-6, IL-8 and IL-12p40 secretions. hGH
312 aggregates also significantly increased CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL10 productions,
313 indicating that hGH aggregates could trigger moDC maturation to an inflammatory
314 phenotype. Regarding chemokine productions, aggregates from purified IgG1 were able to
315 augment CXCL10 production but aggregates of both antibodies were unable to modify
316 significantly CCL3, CCL4 and CCL2 productions. Again this latter result suggested

317 differences in the mechanism of DC stimulation by Rituximab vs purified IgG1. Interleukin-6,
318 CCL2, CCL3 and CCL4 are part of the identified cytokine signature identified by Joubert *et*
319 *al.*, using PBMCs and aggregated antibodies (Joubert et al., 2012; Telikepalli et al., 2015). In
320 this latter work several cell subsets can contribute to cytokine and chemokine production that
321 can explain some discrepancies with our results. Moreover, the authors showed that TLR-4
322 could contribute to cytokines release from PBMC (Joubert et al., 2012). IL-12p40 secretions
323 found in moDC were in line with this observation, as IL-12 has been shown to be induced by
324 TLR-4 agonists, such as LPS or the chemical sensitizer Nickel Sulfate (Antonios et al., 2010).
325 Furthermore, TLR-4-dependent activation of moDC has also been suggested with plasma-
326 derived Factor VIII products, that could potentiate moDC maturation induced by LPS (Miller
327 et al., 2015) FcγR involvement has also been suggested (Joubert et al., 2012) that could
328 correlate with the presence of FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b) and FcγRIII (CD16) on
329 DC (Guilliams et al., 2014). Indeed, IgG1 aggregates are known to have increased affinity for
330 FcγRIIa and FcγRIIIb (Luo et al., 2009). In a previous work, Ahmadi *et al.*, didn't find any
331 differences between aggregated and native Rituximab when assessing IL-6, IL-1 beta, IL-12,
332 IL-10, IL-8 levels in moDCs treated for 24 hrs (Ahmadi et al., 2015). This discrepancy could
333 be explained by the protocol used for the stirring stress that was realized in softer conditions,
334 to give small amounts of aggregates but also by the cellular model since high cytokine levels
335 were found in the presence of the monomeric Rituximab (Ahmadi et al., 2015). Using these
336 three proteins, we observed a different chemokine profile secretion. These results suggested
337 that although protein aggregates could mainly be assimilated to damage associated molecular
338 patterns (DAMPs) or mimic pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), they may
339 differently interact with DC receptors (*i.e.* PRR or FcR) or the DC membrane to alter DC
340 phenotype.

341 MoDC can be fully activated by protein aggregates providing the three essential key
 342 signals for the activation of naïve T cells, *i.e.* presenting processed peptides from aggregates
 343 (Rombach-Riegraf et al., 2014), expressing co-stimulation molecules and producing specific
 344 cytokines (Joffre, 2009; Walsh and Mills, 2013). Given the observed cytokine and chemokine
 345 profiles obtained with aggregates-stimulated moDC, we were interested to test whether these
 346 phenotypic modifications could lead to an altered T-cell response. We analyzed CD4⁺ T-cells
 347 responses in an allogenic co-culture model. MoDCs treated by aggregated proteins were able
 348 to increase T-cell proliferation showing that DC phenotype alteration leads to an increase in
 349 T-cell activation. Moreover moDC stimulated with hGH aggregates triggered a Th1
 350 polarization, supported by an exclusive IFN- γ production by CD4⁺ T-cells. Surprisingly, we
 351 found that moDC stimulated by Rituximab and IgG1 aggregates induced a broader CD4⁺ T-
 352 cells response, as evidenced by IL-17, IL-5 and IL-13 secretions, in line with Th17 and Th2
 353 polarization respectively. T-cell responses induced by aggregates have also being assessed in
 354 other works. Thus, IL-2, IL-13, TNF- α and IFN- γ responses have been highlighted following
 355 PBMC activation by antibodies aggregates (Joubert et al., 2012; Rombach-Riegraf et al.,
 356 2014). Also, Traztuzumab but not Rituximab aggregates were found to induce mainly IL-2
 357 responses by T cells upon PBMC stimulation (Joubert et al., 2012). All these results converge
 358 to suggest that antibodies aggregates induce an innate immune response that drives a broad T-
 359 cell activation.

360 In this work we are showing results suggesting an efficient priming of moDC by hGH or
 361 antibodies aggregates that could in turn modulate T-cell responses. Indeed, results obtained
 362 with hGH were not described before. Using three different proteins but a common
 363 aggregation protocol, our results showed different DC phenotypes and independent T-cell
 364 phenotypes indicating that mechanisms of cellular recognition of the aggregates were not

365 unique. The intracellular mechanisms by which aggregates can induce DC maturation remain
366 to be explored.

367

368 **METHODS**

369

370 **Aggregates preparation**

371 Lyophilized human growth hormone (hGH) was purchased from the European Pharmacopeia
372 (Strasbourg, France) and diluted to 1 mg/ml final concentration in sterile PBS. Human IgG1
373 Kappa was purchased from Sigma Aldrich (reference: I5154, Sigma-Aldrich, Lyon, France).
374 Lyophilized Mabthera® (Rituximab, a chimeric anti-human CD20) was diluted to 1 mg/ml
375 final concentration in sterile PBS.

376 To induce aggregates formation, stirring stress was applied to samples. One milliliter of each
377 sample was pipetted into 5 ml glass tubes and stirred at 1000 rpm with 8x2 mm Teflon stirrer
378 bar, at room temperature, for 20h for the two IgG, or 72h, for hGH. Samples were pooled to
379 form one batch of stressed products and then split into 1 ml aliquots and stored at -80°C
380 until use. Endotoxin was quantified for each native or aggregated product by using a
381 colorimetric assay (ToxinSensor, Genscript, Paris, France), according to the manufacturer's
382 instructions.

383

384 **Analysis of stressed and native proteins**

385 *Dynamic Light Scattering*

386 The size distribution of native and aggregated proteins was determined by dynamic light
387 scattering with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments LTd, Orsay, France) after
388 appropriate dilution to 100 µg/ml with PBS in polystyrene macro cuvettes (Kartell Labware,
389 Milano, Italy). For each sample, the measurement was performed three times at a temperature

390 of 25°C with a detection angle of 90°. Particle size was obtained from the Stokes-Einstein
391 equation that gave average particle diameter and polydispersity index.

392

393 *Fluorescence Spectroscopy*

394 Steady state fluorescence of the Tryptophan (Trp) residues was measured at 20°C on a PTI
395 fluorescence spectrometer (PTI Monmouth Junction, NJ, USA). In order to excite specifically
396 the Trp residue, the excitation was set at 295 nm and the emission scanned from 305 to 500
397 nm. The excitation and emission slit widths were set to 2 and 4 nm respectively. For the
398 fluorescence measurement, concentrations were adjusted to 10 µg/ml in PBS for the hGH and
399 to 0.125 mg/ml, in Tris 20 mM for the IgG1, or in PBS for Rituximab. For fluorescence
400 polarisation measurements, an excitation and emission polarizer were used to measure the
401 steady state fluorescence anisotropy of Trp residues at 20°C, excitation and emission set at
402 295 nm and 350nm respectively.

403

404 *Circular Dichroism*

405 Circular dichroic spectra were recorded with a Model CD6 spectropolarimeter (Jobin Yvon-
406 SPEX-horiba, France). Measured ellipticity was recorded in the far-ultraviolet region (188-
407 260nm) for hGH and (198-260 nm) for the antibodies, the measurements were made in a 100
408 µm path length CaF₂ cell. The concentrations of the samples were 100 µg/ml for hGH and 1
409 mg/ml for the antibodies. Base-line runs were made prior to each sample run and the base-line
410 was subtracted to obtain the final spectrum.

411

412 **Generation of human monocyte-derived dendritic cells (moDCs)**

413 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from buffy coats,
414 obtained from Etablissement Français du Sang by centrifugation on a Ficoll (Eurobio, Les

415 Ulis, France) density gradient. As previously described (5), monocytes were isolated from the
416 mononuclear fraction by magnetic positive selection with MiniMacs separation columns and
417 anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Paris, France). Monocytes
418 were cultured at 1×10^6 cells/ml in the presence of GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml)
419 (Miltenyi Biotec) in RPMI-1640 GlutaMAX™ medium (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin,
420 France), supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), antibiotics and
421 1% pyruvate (Gibco) at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Within 5 days,
422 monocytes differentiated into moDCs with an immature phenotype.

423

424 **MoDC treatment with aggregates or native proteins**

425 On day 5, immature moDC were harvested and washed in RPMI-1640 GlutaMAX™ (Gibco)
426 supplemented with 10% FCS, antibiotics and 1% pyruvate. Aggregates or native proteins
427 were then added at concentrations of 10, 50 or 200 µg/ml depending on the experiment.
428 Lipopolysaccharide (LPS, from Escherichia coli 055:B5 strain 25 ng/ml, Sigma-Aldrich) was
429 used as a positive maturation control. The stimulation time at 37°C ranged from 30 min to 48
430 h depending on the experiment.

431

432 **Flow cytometric analysis of mo DC maturation in response to protein aggregates**

433 After 24 h of treatment with native or aggregated proteins, moDC viability and phenotype
434 were analyzed by flow cytometry. Cell viability was assessed by Propidium Iodide
435 (Invitrogen) staining, used at a final concentration of 625 ng/ml. The surface labeling
436 procedure was as follows: 2×10^5 cells/ml cells were washed in cold phosphate-buffered
437 saline (PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and stained with
438 monoclonal antibodies (mAbs) in the dark on ice for 20 min. After washing with cold PBS,
439 cells were fixed in 1% paraformaldehyde diluted in PBS. The following mAbs were used:

440 allophycocyanin (APC)-labeled mouse anti-human CD86 (555660, BD Biosciences, Le Pont
441 de Claix, France) and anti-human HLA-DR (559866, L243, BD Biosciences); Fluorescein
442 isothiocyanate (FITC)-labeled mouse anti-human CD80 (5557226, L307.4, BD Biosciences)
443 and anti-human CD40 mAb (555588, 5C3, BD Biosciences); Phycoerythrin (PE)-labeled
444 mouse anti-human CD83 (556855, HB15e, BD Biosciences). Appropriate isotype controls
445 (mouse IgG1 κ or IgG2 α κ , BD Biosciences) were used at the same concentration to determine
446 non specific staining. A minimum of 10,000 cells were analyzed on a FACSCalibur® cell
447 analyzer using CellQuest® software (Becton Dickinson). Living cells were identified on the
448 basis of their physical characteristics (forward scatter (FSC) and side scatter (SSC)). Results
449 were expressed as the relative fluorescence intensity (RFI), using the corrected mean
450 fluorescence intensity (cMFI), as follow: $cMFI = MFI - MFI \text{ of isotype control}$; $RFI = cMFI \text{ of}$
451 $\text{treated cells} / cMFI \text{ of untreated cells}$.

452

453 **Co-culture of moDC and T-cells**

454 CD4⁺ T cells were isolated from PBMC by negative selection with mini-MACS separation
455 columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec). These T-cells
456 were confirmed to have purity greater than 95%, based on CD4 expression evaluated by flow
457 cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences). CD4⁺ T lymphocytes, were labeled with 0.5
458 mM CFSE (Invitrogen), following the manufacturer's instruction. MoDCs were stimulated by
459 aggregates or native proteins for 24h and then washed and co-cultured with allogeneic CD4⁺
460 T-cells at a 1:10 DC/T-cell ratio for 5 days, in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10%
461 human serum (Sigma Aldrich) in round-bottom 96-well plates. Analysis of T-cell
462 proliferation was assessed by flow cytometry, on a FACSCalibur® cell analyzer using
463 CellQuest® software (Becton Dickinson).

464

465 Cytokine quantification in cell culture supernatants

466 After 24h stimulation moDCs culture supernatants were assayed for IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-
467 12p40, CCL-2 (MCP-1), CCL-3 (MIP-1 α), CCL-4 (MIP-1 β) and CXCL-10 (IP-10), using
468 Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MA, USA) multiplex assay, following
469 manufacturer's instructions.

470 To assess T-cell polarization, moDCs/CD4⁺ T lymphocyte co-culture supernatants were
471 assayed for cytokine contents: IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-10 and IL-17A were quantified using
472 MSD multiplex assay, following manufacturer's instructions.

473

474 Statistical analysis

475 Data were expressed as means \pm SEM. Differences between groups were evaluated with the
476 Mann-Whitney U test (Prism software, GraphPad, La Jolla, CA, USA). *P* values below 0.05
477 were considered to denote statistical significance.

478

479 The research leading to these results was conducted as part of the ABIRISK consortium
480 (Anti-Biopharmaceuticals Immunization: Prediction and analysis of clinical relevance to
481 minimize the risk). For further information please refer to www.abirisk.eu

482

483 CONFLICT OF INTEREST:

484 The authors declare no conflict of interest.

485

486 ACKNOWLEDGEMENTS

487 This work has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking
488 (IMI JU) under grant agreement no. [115303], resources of which are composed of financial

489 contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/ 2007-2013)
490 and EFPIA companies' in kind contribution.

491 Yann Gallais was supported by ABIRISK, IMI JU, under grant agreement no. 115303

492

493

494

495 **References**

- 496 1 Baker MP, Reynolds HM, Lumicisi B, Bryson CJ. Immunogenicity of protein therapeutics: The
497 key causes, consequences and challenges. *Self Nonself* 2010; 1: 314–322.
- 498 2 Vultaggio a, Matucci a, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O et al. Anti-infliximab IgE and
499 non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy* 2010; 65:
500 657–61.
- 501 3 Hermeling S, Crommelin DJ a., Schellekens H, Jiskoot W. Structure-Immunogenicity
502 Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharm Res* 2004; 21: 897–903.
- 503 4 Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation--pathways and influencing factors. *Int J*
504 *Pharm* 2010; 390: 89–99.
- 505 5 Cromwell MEM, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J* 2006; 8:
506 E572–9.
- 507 6 Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction
508 factors and analysis. *J Pharm Sci* 2009; 98: 2909–34.
- 509 7 Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* 2005; 289:
510 1–30.
- 511 8 Ellis EF, Henney CS. Adverse reactions following administration of human gamma globulin. *J*
512 *Allergy* 1969; 43: 45–54.
- 513 9 Moore W V, Leppert P. Role of aggregated human growth hormone (hGH) in development of
514 antibodies to hGH. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 691–7.
- 515 10 Maas C, Hermeling S, Bouma B, Jiskoot W, Gebbink MFBG. A role for protein misfolding in
516 immunogenicity of biopharmaceuticals. *J Biol Chem* 2007; 282: 2229–36.
- 517 11 Human P, Ilsley H, Roberson C, Grovender E, Van Antwerp B, Fogt E et al. Assessment of the
518 Immunogenicity of Mechanically Induced Interferon Aggregates in a Transgenic Mouse Model. *J*
519 *Pharm Sci* 2014; : 722–730.
- 520 12 van Beers MMC, Sauerborn M, Gilli F, Brinks V, Schellekens H, Jiskoot W. Aggregated
521 recombinant human interferon Beta induces antibodies but no memory in immune-tolerant
522 transgenic mice. *Pharm Res* 2010; 27: 1812–24.
- 523 13 Purohit VS, Middaugh CR, Balasubramanian S V. Influence of aggregation on immunogenicity
524 of recombinant human Factor VIII in hemophilia A mice. *J Pharm Sci* 2006; 95: 358–71.
- 525 14 Freitag AJ, Shomali M, Michalakos S, Biel M, Siedler M, Kaymakcalan Z et al. Investigation of
526 the immunogenicity of different types of aggregates of a murine monoclonal antibody in mice. *Pharm*
527 *Res* 2015; 32: 430–44.
- 528 15 Filipe V, Jiskoot W, Basmeleh AH, Halim A, Schellekens H, Brinks V. Immunogenicity of
529 different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs*
530 2012; 4: 740–52.
- 531 16 Fradkin AH, Carpenter JF, Randolph TW. Immunogenicity of aggregates of recombinant
532 human growth hormone in mouse models. *J Pharm Sci* 2009; 98: 3247–64.
- 533 17 Christie M, Torres RM, Kedl RM, Randolph TW, Carpenter JF. Recombinant Murine Growth
534 Hormone Particles are More Immunogenic with Intravenous than Subcutaneous Administration. *J*
535 *Pharm Sci* 2014; 103: 128–139.
- 536 18 Brennan FR, Morton LD, Spindeldreher S, Kiessling A, Allenspach R, Hey A et al. Safety and
537 immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs* 2010; 2: 233–255.

- 538 19 Sauerborn M, Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H. Immunological mechanism underlying the
539 immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 53–9.
- 540 20 Bartelds GM, Wijbrandts C a, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L et al. Anti-
541 infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab
542 switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:
543 817–21.
- 544 21 Benucci M, Saviola G, Meacci F, Manfredi M, Infantino M, Campi P et al. No Correlations
545 Between the Development of Specific IgA and IgM Antibodies Against Anti-TNF Blocking Agents,
546 Disease Activity and Adverse Side Reactions in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Open Rheumatol J*
547 2013; 7: 75–80.
- 548 22 Deisenhammer. Immunoglobulin subclasses in patients with neutralizing and nonneutralizing
549 antibodies against IFN-beta1b. *J Interf Cytokine Res* 2001; 21: 167–71.
- 550 23 Reding MT. Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia* 2006; 12 Suppl 6:
551 30–35; discussion 35–36.
- 552 24 Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM. Distribution of Th1- and Th2-induced
553 anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost*
554 2002; 88: 568–75.
- 555 25 Joubert MK, Hokom M, Eakin C, Zhou L, Deshpande M, Baker MP et al. Highly aggregated
556 antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses. *J Biol*
557 *Chem* 2012; 287: 25266–79.
- 558 26 Ahmadi M, Bryson CJ, Cloake E a, Welch K, Filipe V, Romeijn S et al. Small Amounts of Sub-
559 Visible Aggregates Enhance the Immunogenic Potential of Monoclonal Antibody Therapeutics. *Pharm*
560 *Res* 2015; 32: 1383–94.
- 561 27 Rombach-Riegraf V, Karle AC, Wolf B, Sordé L, Koepke S, Gottlieb S et al. Aggregation of
562 human recombinant monoclonal antibodies influences the capacity of dendritic cells to stimulate
563 adaptive T-cell responses in vitro. *PLoS One* 2014; 9: e86322.
- 564 28 Joubert MK, Luo Q, Nashed-Samuel Y, Wypych J, Narhi LO. Classification and characterization
565 of therapeutic antibody aggregates. *J Biol Chem* 2011; 286: 25118–33.
- 566 29 Massa G, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Bouillon R. Five-year follow-up of growth
567 hormone antibodies in growth hormone deficient children treated with recombinant human growth
568 hormone. *Clin Endocrinol* 1993; 38: 137–142.
- 569 30 Rougeot C, Marchand P, Dray F, Girard F, Job JC, Pierson M et al. Comparative study of
570 biosynthetic human growth hormone immunogenicity in growth hormone deficient children. *Horm*
571 *Res* 1991; 35: 76–81.
- 572 31 Pirazzoli P, Cacciari E, Mandini M, Cicognani A, Zucchini S, Sganga T CM. Follow-up of
573 antibodies to growth hormone in 210 growth hormone-deficient children treated with different
574 commercial preparations. *Acta Paediatr* 1995; 84: 1233–1236.
- 575 32 van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, Keystone EC, Fleischmann R, Furst DE et al.
576 Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol*
577 2010; 37: 558–67.
- 578 33 Mok C. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Des Devel Ther*
579 2014; : 87–100.
- 580 34 den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S et al. Strategies for the
581 assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res* 2011;
582 28: 920–33.
- 583 35 Telikepalli S, Shinogle HE, Thapa PS, Kim JH, Deshpande M, Jawa V et al. Physical

- 584 Characterization and In Vitro Biological Impact of Highly Aggregated Antibodies Separated into Size-
585 Enriched Populations by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *J Pharm Sci* 2015; : 1–17.
- 586 36 Kiese S, Pappenberg A, Friess W, Mahler H-C. Shaken, not stirred: mechanical stress
587 testing of an IgG1 antibody. *J Pharm Sci* 2008; 97: 4347–66.
- 588 37 Mahler H-C, Müller R, Friess W, Delille A, Matheus S. Induction and analysis of aggregates in a
589 liquid IgG1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59: 407–17.
- 590 38 Joshi V, Shivach T, Yadav N, Rathore AS. Circular Dichroism Spectroscopy as a Tool for
591 Monitoring Aggregation in Monoclonal Antibody Therapeutics. *Anal Chem* 2014.
592 doi:10.1021/ac503140j.
- 593 39 Antonios D, Rousseau P, Larangé A, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Mechanisms of IL-12
594 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO₄. *J Immunol* 2010; 185:
595 89–98.
- 596 40 Miller L, Weissmüller S, Ringler E, Crauwels P, Zandbergen G Van, Seitz R et al. Danger signal-
597 dependent activation of human dendritic cells by plasma-derived factor VIII products. 2015; : 268–
598 276.
- 599 41 Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ receptors in
600 dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 94–108.
- 601 42 Luo Y, Lu Z, Raso SW, Entrican C, Tangarone B. Dimers and multimers of monoclonal IgG1
602 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcγ receptors. 2009; : 491–504.
- 603 43 Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell
604 polarisation. *Trends Immunol* 2013; 34: 521–30.
- 605 44 Joffre O. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive
606 immunity - Joffre - 2008 - *Immunological Reviews* - Wiley Online Library. 2009; : 234–247.
607

608 **Figure legends**

609 **Figure 1: Analysis of native and aggregated proteins.**

610 To induce aggregates formation stir stress was applied to native proteins, for 20 hours for IgG
611 and Rituximab, or 72 hours for hGH. A. Evaluation of size distribution of hGH, IgG-1 and
612 Rituximab in their native or aggregated form by Dynamic Light Scattering. Particles mean
613 diameters are indicated next to each peak. Each measurement was repeated 30 times. B.
614 Fluorescence spectra of native (solid lines) and aggregated (dashed lines) proteins.
615 Tryptophan excitation was set at 295nm. The light scattering was recorded between 280 and
616 310 nm and the fluorescence between 310 to 440 nm.

617

618 **Figure 2: Aggregated proteins modify DC phenotype**

619 A. Dose-effect of native or aggregated proteins on CD83 and CD86 expression after 24h and
620 48h stimulation. Immature moDC were incubated with native or aggregated hGH, Rituximab
621 or IgG1 for 24h or 48h. Cells were then collected, washed and analyzed by flow cytometry for
622 membrane expression markers. Results are expressed as fold increase compared to non
623 stimulated cells and represented as mean \pm SEM of 3 independent experiments. B. Phenotype
624 markers expression after aggregates treatment. Immature moDC were incubated with native
625 or aggregated hGH for 48h, or Rituximab or IgG1 for 24h. Cells were then collected, washed
626 and analyzed by flow cytometry for membrane expression markers. Results are expressed as
627 fold increase of marker expression by cells stimulated with aggregates compared to cells
628 incubated with native proteins, and represented as 4 independent experiments. *: $p < 0.05$,
629 Mann-Whitney test.

630

631 **Figure 3: Aggregates induce moDC pro-inflammatory cytokines and chemokines**
632 **secretion.**

633 Immature moDC were treated 24h with native (N) proteins or their aggregated (A)
634 counterpart. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, CCL-2, CCL-3, CCL-4, CXCL-10 concentrations in
635 culture supernatants were analyzed by MSD multiplex assay. Box plots indicate data
636 distribution: horizontal lines show the minimum value, 25th percentile, Median, 75th
637 percentile, and the maximum value (n=6 independent experiments, *:p<0.05; **:p<0.01
638 Mann-Whitney test). NS: non-stimulated cells

639

640 **Figure 4: Treatment of moDC with aggregates increases T-cell proliferation.**

641 A: T-cell proliferation. T-cells were isolated from PBMC using anti-CD4 micro beads. After
642 purification, cells were labelled with CFSE and incubated with moDC stimulated with
643 aggregates or native proteins, at a ratio of 1:10 (T-cell: DC). Co-cultures were then incubated
644 for 5 days, and proliferation was analyzed by flow cytometry. Results are presented as % of
645 CFSE negative cells. B: Fold increase of T-cell proliferation in response to stimulated moDC
646 with native or aggregated proteins, compared to T-cell proliferation in presence of non-
647 stimulated moDC. Results represent the mean of 6 independent experiments (*: p<0.05, **:
648 p<0.01, Mann-Withney test).

649

650 **Figure 5: T-cell polarization in response to moDC stimulated with aggregates.**

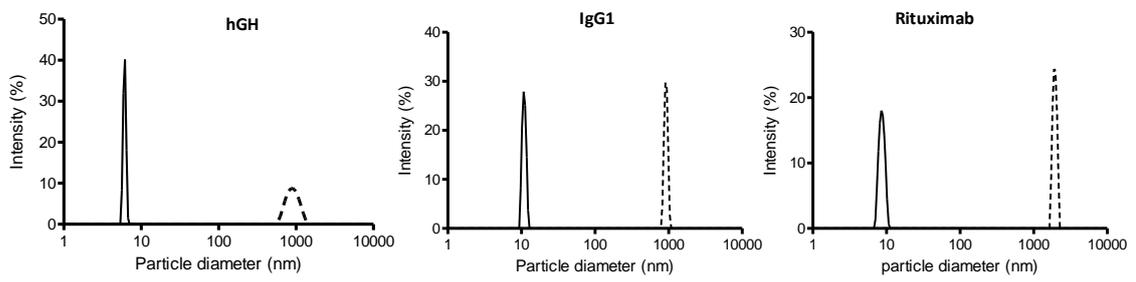
651 MoDC left unstimulated (NS) or treated with native (N) or aggregated (A) proteins for 24h
652 were washed and incubated with allogeneic purified CD4⁺ T lymphocytes. On day 5,
653 cytokines levels were quantified in co-culture supernatants, using MSD multiplex assay.

654 Results are expressed as the mean± SEM of 6 independent experiments (*:p<0.05, **:p<0.01,
655 Mann-Whitney test).

656 **Table 1:** Cytokine and chemokine levels induced in moDC by aggregates. Results are
657 expressed as fold increase of cytokine and chemokine production by cells stimulated with
658 aggregates compared to cells incubated with native proteins, and reported as mean ± SEM of
659 6 independent experiments

Figure 1:

A



B

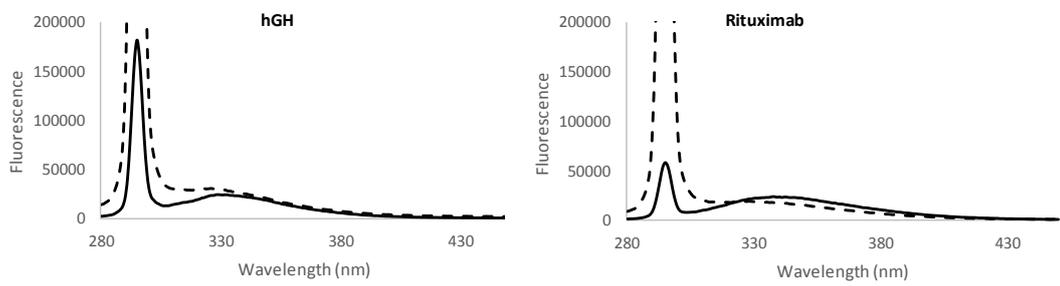


Figure 2

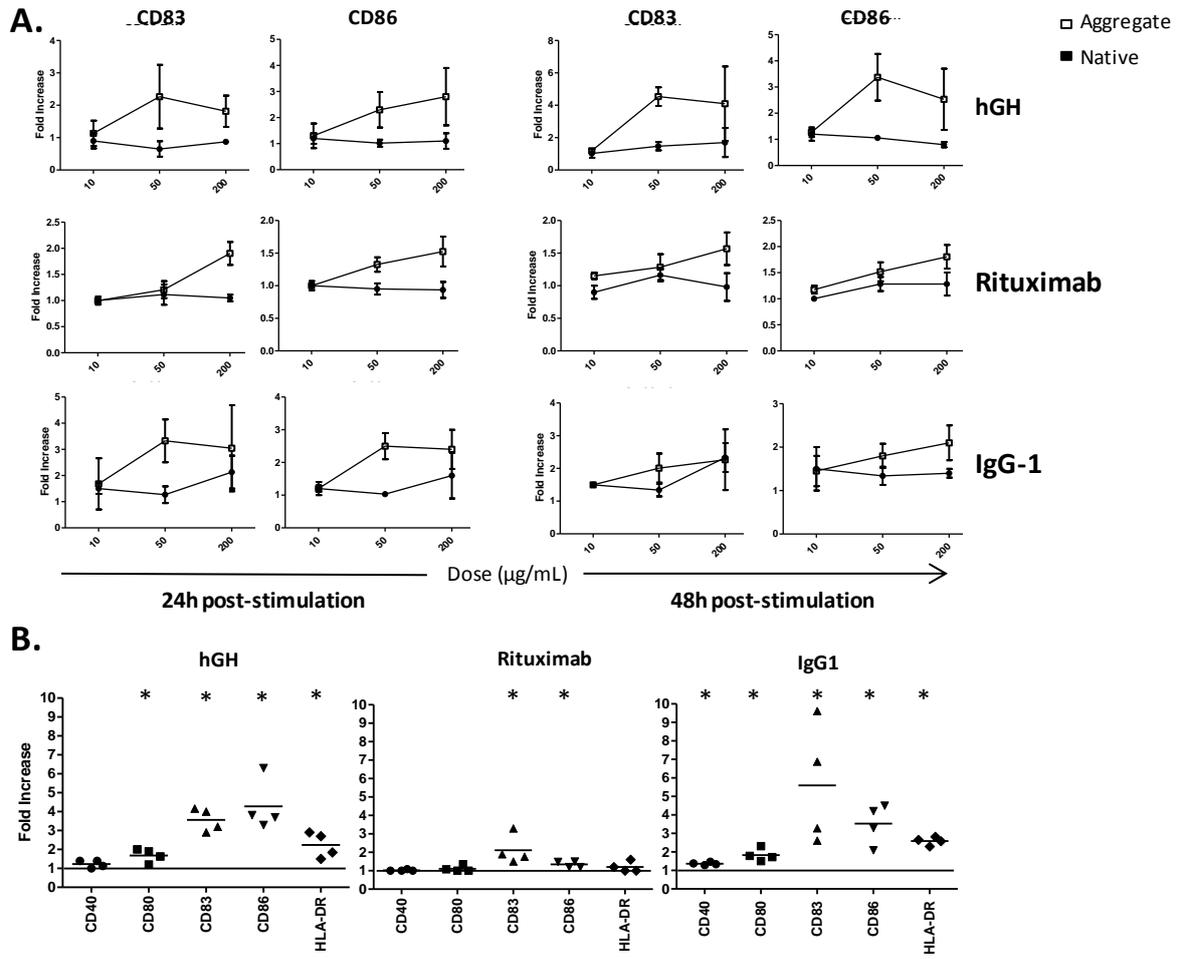


Figure 3:

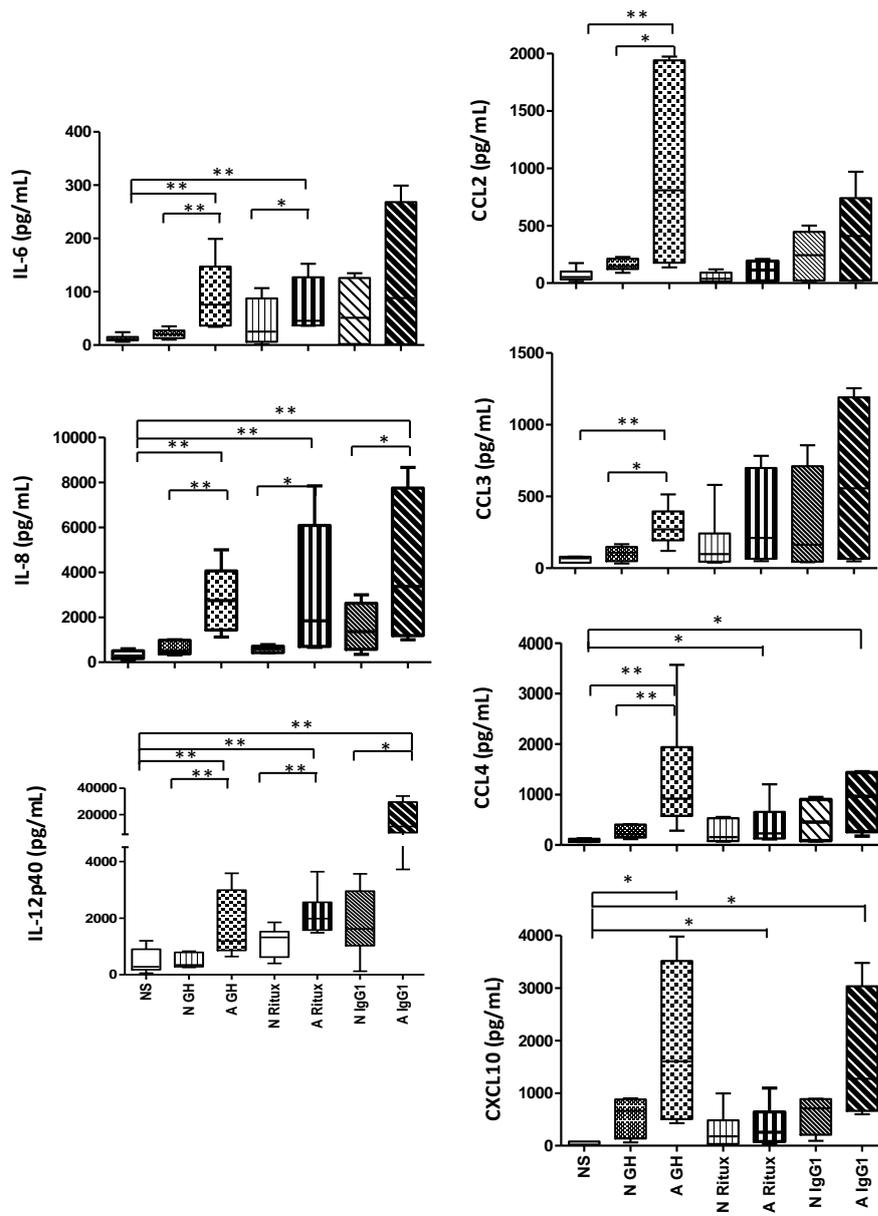


Figure 4:

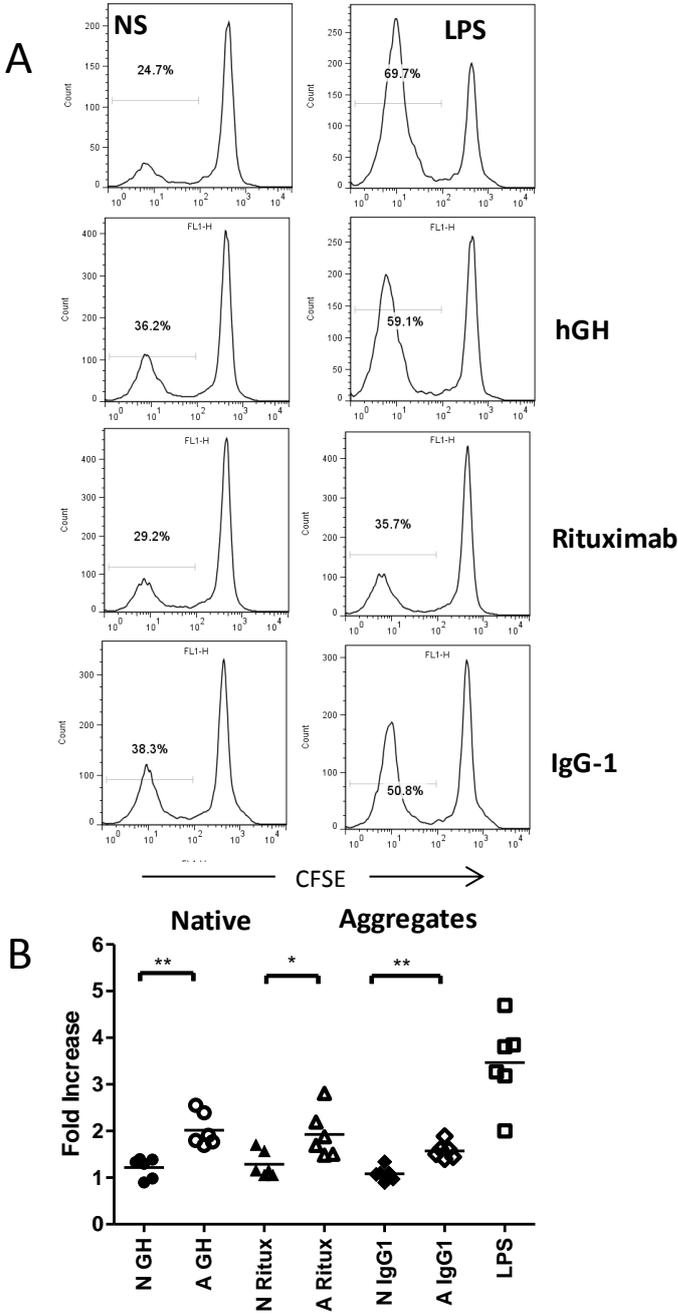


Figure 5:

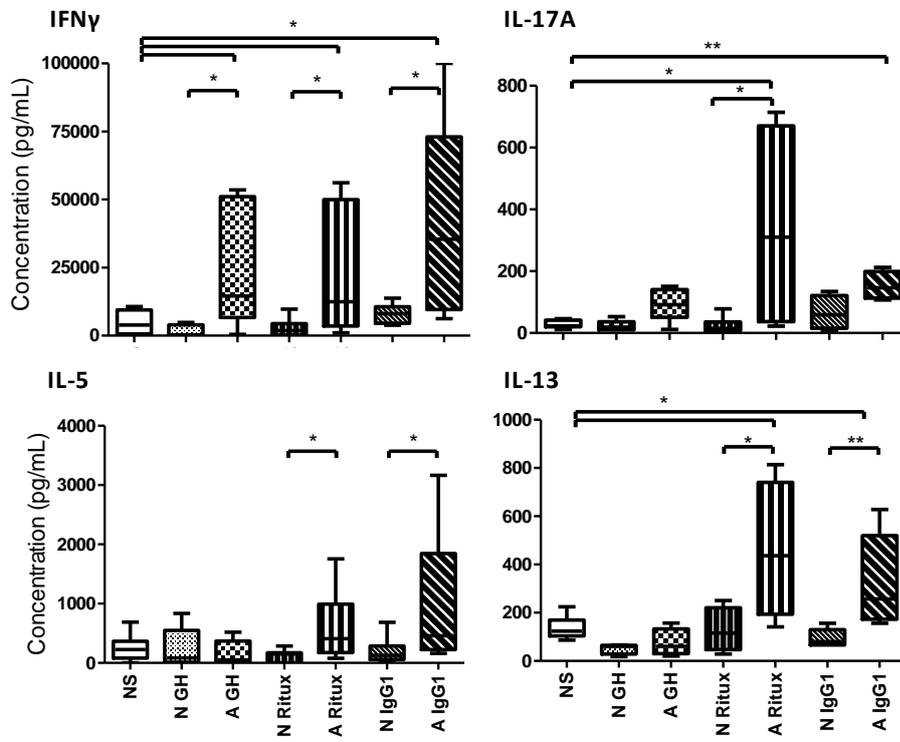


Table 1:

Fold Increase aggregated vs native	hGH	Rituximab	IgG1
IL-6	3,64±1,15	1,61±0,07	2,670±0,8
IL-8	11,62±6,75	5,298±2,7	2,472±0,86
IL-12p40	4,53±1,5	2,31±0,62	12,09±4,15
CCL2	5,80±2,18	2,08±0,48	1,47±0,16
CCL3	4,45±2,19	2,67±0,97	2,38±0,52
CCL4	7,61±4,55	3,46±1,67	3,39±1,12
CXCL10	4,37±1,33	1,67±0,35	3,18±0,93

Résultats complémentaires : Mécanismes intracellulaires induits lors de l'interaction des cellules dendritiques avec les agrégats d'hormone de croissance

1. Introduction

L'implication des agrégats de protéines dans l'induction de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques est bien admise, cependant les études démontrant les mécanismes cellulaires mis en jeu sont encore peu nombreuses. Différentes études montrent que les agrégats d'anticorps peuvent induire l'activation de cellules du système immunitaire. Joubert et collaborateurs ont mis en évidence une signature cytokinique par les cellules mononucléées du sang (PBMC) en réponse aux agrégats d'anticorps. L'activation des cellules, potentiellement médiée par les TLR2 et 4, ainsi que par les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines conduisait à la production d'IL-1 β , d'IL-6, de CCL2, CCL3, CCL4, MMP2 (Matrix Metalloproteinase 2) et de TNF α (Joubert et al., 2012). Deux études se sont intéressées plus particulièrement à l'effet des agrégats d'anticorps sur la maturation des cellules dendritiques. Rombach-Riegraf et collaborateurs ont observé une augmentation de l'expression de CD80, CD83 et CD86 suite à une incubation des DC avec des agrégats d'anticorps. Ils ont par ailleurs montré que les agrégats d'anticorps induisaient une augmentation de la présentation de peptides issus de l'anticorps natif par la DC, aussi bien en terme de quantité qu'en terme de diversité de peptides (Rombach-Riegraf et al., 2014). Enfin, une dernière étude s'est intéressée à l'effet de préparations d'anticorps contenant de faibles proportions d'agrégats (moins de 3% de la protéine totale) sur la maturation des DC. Au cours de ce travail, les auteurs ont montré que les agrégats de Rituximab et de Trastuzumab ainsi produits n'avaient pas d'effet prononcé sur la maturation des DC. Ils ont en effet observé que les agrégats modulaient peu l'expression des marqueurs de surface (CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR), et que seuls les agrégats de Trastuzumab modulaient la production d'IL-10, les agrégats de Rituximab n'ayant d'impact sur aucune des cytokines testées (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 et IL-12). Enfin, l'étude montre que les agrégats sont internalisés par les DC et dirigés vers le compartiment endosomal dans les 30 minutes qui suivent leur interaction (Ahmadi et al., 2015).

Nous avons précédemment montré que les agrégats de d'hormone de croissance, comme les agrégats de Rituximab, étaient impliqués dans l'acquisition d'un phénotype mature des DC. Cependant, notre étude a montré que le profil de maturation était différent en réponse aux deux types de protéine, et que ceci avait des répercussions sur la mise en place d'une réponse lymphocytaire CD4+. Ainsi les agrégats de hGH induisent une expression plus large des marqueurs d'activation des DC (CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR), alors que les agrégats de Rituximab induisent uniquement l'expression de CD83 et CD86. De plus, les profils cytokiniques induits par les 2 types d'agrégats sont semblables, avec induction de la sécrétion d'IL-6, IL-8 et d'IL-12p40, mais les agrégats de hGH induisent en plus une forte sécrétion des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10, ce qui n'est pas le cas avec les agrégats de Rituximab. L'ensemble de ces résultats suggère que les agrégats de protéines peuvent être assimilés à des signaux de danger et qu'ils peuvent de ce fait interagir de manière différente avec les récepteurs membranaires des DC, par exemple les RFc ou les PRR. Cependant les mécanismes intracellulaires déclenchés par ces agrégats sont encore inconnus.

Les agrégats de hGH sont notamment capables d'induire une forte sécrétion de CXCL10, chimiokine impliquée dans le recrutement et l'activation des LyT Th1. CXCL10, lie CXCR3 exprimé par les LyB, les NK, les macrophages, les DC et les LyT. En plus de son rôle chimio-attractant, CXCL10 a été décrit comme modulant la réponse LyT CD4+. Elle agit en effet en induisant une augmentation de la sécrétion d'IFN γ par ces cellules, et une diminution de la production d'IL-5 et d'IL-13 (Romagnani et al., 2005). Elle induit également une synthèse plus importante de l'ARNm de T-bet, et régule négativement l'expression de GATA-3, facteurs de transcription exprimés dans les LyT Th1 et Th2 respectivement (Groom et al., 2012; Romagnani et al., 2005). Le promoteur de CXCL10 contient des sites de liaison pour NF- κ B, le complexe AP-1 (hétérodimère c-fos/c-jun) régulé par JNK, C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein beta), qui peut être régulé par p38 MAPK *via* MEF2 ou par ERK. Enfin, le promoteur contient également des séquences ISRE (IFN-Stimulated Responsive Element), permettant la fixation des IRF, ainsi que des séquences pour la fixation des STAT, ces éléments pouvant être régulés par la voie JAK. Divers stimuli peuvent aboutir à la production de CXCL10. Il est notamment connu que des agonistes du TLR4, comme le LPS (Gorina et al., 2011), ou du TLR9 (Yang et al., 2014) peuvent conduire à sa synthèse. L'IFN γ est également un puissant inducteur de CXCL10, notamment par l'intermédiaire de la voie Jak1-STAT1 (Clarke et al., 2010; Qi et al., 2009).

CCL3 fait partie des chimiokines de la famille MIP-1 (Macrophage Inflammatory Proteins). Cette chimiokine peut lier deux récepteurs, CCR1 exprimé par les monocytes, les LyT, les neutrophiles et les éosinophiles et CCR5, exprimé par les monocytes, les LyT et les DC (Maurer and Von Stebut, 2004). CCL3 est notamment impliqué dans la migration

transendothéliale des LyT. Il permet le recrutement des LyT au site inflammatoire par l'augmentation de l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 (Ma and Ma, 2014). L'analyse du promoteur montre des sites de fixation pour les STAT, AP-1 et C/EBP notamment (Nakayama et al., 2004). Dans les DC plasmacytoïdes, l'expression de CCL3 est régulée par p38 MAPK suite à une stimulation par le TLR9. Ce dernier va agir en induisant l'activation de NF- κ B, nécessaire pour l'expression de CCL3. En revanche, ERK ne joue pas de rôle dans la régulation de la chimiokine (Osawa et al., 2006). Dans le LyB, p38 MAPK joue également un rôle (mineur) dans l'expression de CCL3, tout comme JNK. En revanche, ERK et JAK3 semblent prépondérant dans sa régulation, tandis que NF- κ B n'a pas d'impact sur l'expression de la chimiokine (Nakayama et al., 2004).

L'objectif de cette deuxième partie vise à apporter des éléments de réponse concernant l'impact des agrégats sur les voies de signalisation impliquées dans la maturation de la DC. Nous avons pour cela repris le modèle de maturation des moDC par les agrégats de hGH. Nous montrons d'abord que ces agrégats sont capables d'augmenter les transcrits d'IL-1 β , IL-6, IL-8 et d'IL-12p40, ainsi que ceux des chimiokines CCL3 et CXCL10. Puis nous montrons que la production des transcrits de CCL3 et CXCL10 est diminuée par l'utilisation d'inhibiteurs de différentes molécules intervenant dans la signalisation intracellulaire impliquée dans l'expression de CXCL10.

2. Matériel et méthodes

2.1 Production et caractérisation des agrégats de hGH

L'hormone de croissance employée est la préparation CRS obtenue de la Pharmacopée Européenne, et reprise à 1mg/mL en PBS. Les agrégats de hGH ont été générés en appliquant le protocole décrit précédemment. Brièvement, un stress d'agitation (stirr stress) à 1000 rpm a été appliqué pendant 72 heures à température ambiante.

La caractérisation des agrégats a été réalisée à l'aide des méthodes décrites précédemment : DLS, dichroïsme cellulaire et spectroscopie de fluorescence. Une analyse par chromatographie d'exclusion stérique a complété ces données. Brièvement, 100 μ L d'échantillons à 0.2mg/mL de protéine sont injectés dans une colonne TSK gel filtration Column, G2000 SW_{XL} (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), et analysés à température ambiante sur une chaîne à un débit de 0,4 mL/min. La phase mobile de la colonne est un tampon PBS réalisé selon les recommandations de la monographie « Solution concentrée d'érythropoïétine »

(Pharmacopée Européenne 8.4). Les chromatogrammes obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel AZUR 5.0.10.0 (Datalys). Le pourcentage d'oligomères sortant de la colonne est calculé en comparant l'aire sous la courbe de chaque pic, avec celle correspondant au monomère.

2.2 Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains

Les cellules dendritiques sont différenciées à partir de monocytes du sang. Les PBMC sont tout d'abord isolés par gradient de Ficoll. Les monocytes CD14⁺ sont ensuite purifiés par tri magnétique par sélection positive. Ils sont ensuite mis en culture à raison de 10⁶ cellules/ml en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence de GM-CSF (550 U/ml) et d'IL-4 (550 U/ml) (Miltenyi Biotec) pendant 5 jours, à 37°C, sous atmosphère humidifiée, à 5 % de CO₂. La différenciation des cellules dendritiques (moDC) et leur caractère immature sont vérifiés par cytométrie en flux en quantifiant l'expression des marqueurs de surface : CD1a, CD86, CD83, DC-SIGN.

2.3 Traitement des moDC par les agrégats de hGH

Les moDC (10⁶ cellules) ont été incubées en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence de hGH native ou agrégée à 50 µg/mL, pendant 4, 8 ou 24 heures selon les expériences.

Dans certaines expériences, les cellules sont prétraitées avec différents inhibiteurs pharmacologiques avant d'être stimulées par les agrégats de hGH. Les cellules sont préincubées 2h par le JAK Inhibitor I [inhibiteur de JAKI] à la concentration de 0.5 µM ; 1h par le BAY 11-7085 [inhibiteur d'Ikkβ] à la concentration de 3µM ; 30 minutes par le PD98059 [inhibiteur de ERK 1/2] à 50 µM ; le SP600125 [inhibiteur de JNK], à 20 µM ; et le SB203580 [inhibiteur de MAPK] à la concentration de 20 µM. Tous les inhibiteurs ont été obtenus auprès de Calbiochem, Darmstadt, Allemagne.

2.4 Isolement des ARN, Reverse Transcription et PCR quantitative (RT-qPCR)

Après 4, 8 ou 24 heures de stimulation, les moDC sont récupérées et lavées en PBS. Les ARN totaux sont ensuite extraits à l'aide du kit Nucleospin® RNA (Macherey Nagel), dosés et contrôlés pour leur intégrité. Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir d'1µg d'ARN total avec des amorces oligo (dT) (MWG Biotech), 2U/µL d'inhibiteurs d'ARNases et 0,2U/µL de la transcriptase reverse AMV (Promega, France) en suivant le protocole du fournisseur de l'enzyme. Les qPCR sont réalisées en utilisant la technique du SYBR Green sur un appareil CFX96 (Biorad). Chaque milieu réactionnel de 10 µL est constitué de : 4 µL d'une dilution 1:50 de cDNA, amorces sens et anti-sens (0,5 µM), préparation de Sso Advanced Supermix (Biorad, France). Après activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 30 secondes, la réaction PCR est réalisée sur 44 cycles de 5 secondes à 95°C et 5 secondes à 60°C ; la lecture du signal SYBR Green est faite à la fin de chaque cycle. A la fin de la réaction, la dénaturation des amplicons en ADNdb est effectuée pour connaître leur homogénéité, indicatrice de la spécificité de la réaction d'amplification. Les amorces utilisées sont résumées dans le tableau 11.

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IL-1β	ACA GAC CTT CCA GGA GAA TG	GCA GTT CAG TGA TCG TAC AG
IL-6	TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG	GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC-3
IL-8	TCT CTT GGC AGC CTT CCA TGA	TGG GGT GGA AAG GTT TGG AG
IL-12p40	TGG AGT GCC AGG AGG ACA GT	TCT TGG GTG GGT CAG GTT TG
CCL2	ACT CTC GCC TCC AGC ATG AA	TTG ATT GCA TCT GGC TGA GC
CCL3	TCT GCA ACC AGT TCT CTG CAT CAC	ACT GGC TGC TCG TCT CAA AGT A
CCL4	CGC CTG CTG CTT TTC TTA CAC	GGT TTG GAA TAC CAC AGC TTG
CCL5	GCC CAC ATC AAG GAG TAT TTC TAC A	CGG TTC TTT CGG GTG ACA A
CXCL10	TCT AAG TGG CAT TCA AGG AGT ACC	AAA GAC CTT GGA TTA ACA GGT TGA
GAPDH	CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA	TGT CGT CAT GAG TCC TTC CA
β-actine	GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA	GCA CAC GCA GCT CAT TG TAG

Tableau 11: Amorces utilisées pour la qPCR

2.5 Analyse protéique par western blot

Les protéines totales sont obtenues après lyse des cellules dans un tampon de lyse composé de: 20 mM Tris HCl pH7,4, 137 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA,1% Triton, 2 mM de Pyrophosphate de sodium, 10% de glycérol 1 mg/ml aprotinine, 1 mg/ml leupeptine, 0.1 M PMSF, 100 µM orthovanadate de sodium, 1 M DTT, 10 mg/ml pepstatine, et H2O). Les lysats sont centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Les extraits protéiques sont ensuite isolés et dosés avec la méthode BCA (Bi-Cincohninic acid Assay) (Sigma, St Louis, MO). Trente

microgrammes de protéines dénaturées sont séparés sur gel SDS-PAGE 10%, puis transférés sur une membrane de polyvinylidone difluoride (PVDF, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). La membrane est saturée avec du TBS (Tris Buffer Saline) 1X supplémenté de 3% de BSA (Bovine Serum Albumin, Biowest, Nuaille, France) pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec l'un des anticorps primaires présentés dans le tableau 12.

Protéine d'intérêt	Référence (fournisseur)
P-JNK	CST #9251 (Ozyme)
P-p38	CST #9211 (Ozyme)
P-p65	CST #3033 (Ozyme)
P-Erk	CST #9101 (Ozyme)

Tableau 12: Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot

Après lavages dans une solution de TBS 1X 0.2% Tween, la membrane est incubée 45 minutes avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase (CS #7074, Cell Signaling, Ozyme, France). Les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (ECL, Biorad). L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par densitométrie associée à une analyse informatique grâce à un Chemidoc (Biorad). Après chaque révélation, la membrane est dé hybridée par une solution de Re-Blot 1X (Millipore, Molsheim, France), afin de révéler d'autres protéines.

L'activation de NF- κ B a également été mesurée par une technique de pull-down. Pour cela, les DC après stimulation sont lysées 20 minutes à 4°C dans un tampon hypertonique constitué de Non-diet P40 (NP40), 20% glycérol, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 420 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM orthovanadate de sodium, 1 mM de sodium pyrophosphate, 125 mM acide okadaïque, 62,5 mM EDTA, 40 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 1 g/ml aprotinine, 1 g/ml pepstatine, 1 g/ml leupeptine. Après centrifugation à 15000 rpm et à 4°C pendant 20 min, les oligonucléotides suivants (MWG biotech) sont biotinylés en 5' et hybridés : 5'-TTG AGG GGA CTT TCC CAG G-3' and 5'-CCT GGG AAA GTC CCC TCA A-3' selon la séquence du promoteur de NF- κ B. Des oligonucléotides mutés sont utilisés comme contrôle de fixation non spécifique : 5'-TTG AGG CGA CTT TCC CAG G-3' et 5'-CCT GGG AAA GTC GCC TCA A-3'. Les extraits totaux 150 μ g sont incubés à 4°C pendant 90 minutes avec 2 μ g d'oligonucléotide couplés à 30 μ l de billes de streptavidine-agarose (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les complexes sont lavés dans du tampon de lyse et élués par ébullition dans du tampon de réduction (Glycérol 40%, 125 mM tris pH 6,8, SDS 4%, mercaptoéthanol 5%, Bromophénol B 0,025%). Les protéines sont ensuite analysées par WB et révélées par les anticorps anti-phospho p65, comme décrit

précédemment. Les lysats totaux (50 μ g) sont également migrés sur gel d'acrylamide 10% comme contrôle.

3. Résultats

3.1 Caractérisation des agrégats

Les agrégats utilisés dans cette étude ont été produits selon le protocole décrit dans l'article précédent. La caractérisation a été complétée par une analyse en dichroïsme circulaire et en chromatographie d'exclusion de taille (SEC).

Le dichroïsme circulaire est une technique permettant l'analyse des structures secondaires des protéines. Les résultats obtenus pour la hGH native et agrégée sont présentés dans la figure 24.

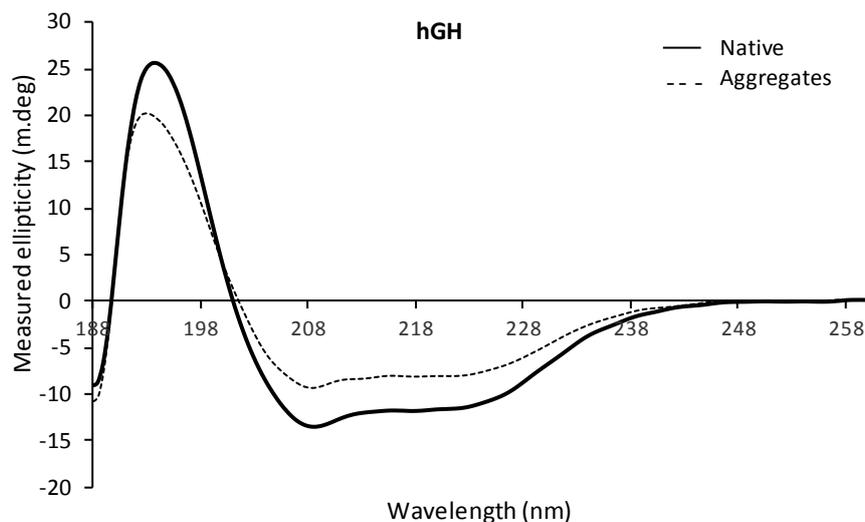


Figure 24: Analyse de l'hormone de croissance humaine native ou agrégée par dichroïsme circulaire.

Les échantillons sont analysés en UV lointains. L'enregistrement du signal est effectué entre 188 et 258 nm.

L'hormone de croissance humaine est une petite protéine composée de quatre hélices α et de trois mini-hélices. Le spectre des hélices α est observé pour la GH native, avec un creux entre 210 et 230 nm. On note que l'agitation induit une perte partielle des hélices α , comme observé avec la réduction de l'amplitude de la courbe.

La SEC permet de détecter des agrégats inférieurs à 1µm de diamètre, d'en déduire la masse moléculaire mais également de les quantifier relativement au monomère. Les résultats obtenus pour la GH native et la GH agrégée sont présentés dans le tableau 13.

	Monomères (%)	Dimères (%)	Multimères (%)	Fragments (%)	Agrégats insolubles (%)
hGH Native	96,3	0,5	0	3,2	0
hGH agrégée	49,4	1,5	0,3	2,8	46

Tableau 13: Analyse de l'hormone de croissance humaine native et agrégée par chromatographie d'exclusion de taille.

Vingt microlitres, soit 20 µg de hGH native ou agrégée ont été injectés dans la colonne. Les proportions sont calculées à partir de l'aire sous la courbe correspondant à chaque pic de rétention. Les agrégats insolubles correspondent à la fraction de protéine qui n'est pas entrée dans la colonne.

La hGH native contient de manière quasi-exclusive de la protéine sous forme monomérique. On constate en effet la présence uniquement de 0.5% de GH sous forme dimérique, et l'on ne détecte aucune forme d'agrégat de taille supérieure. On note néanmoins la présence de produits de dégradation, à hauteur de 3% environ. L'agitation induit la formation de peu d'agrégats solubles. On note en effet une légère augmentation du pourcentage de dimère (1.5%), ainsi qu'une très faible proportion d'agrégats plus larges (0.3%). En revanche, on observe une forte diminution du taux de protéine monomérique suite à l'agitation (49.4%). Ceci est dû à la formation d'agrégats insolubles, c'est-à-dire présentant une taille supérieure à 1µm. Ces agrégats insolubles représentent 46% du mélange.

3.2 Les agrégats de GH modulent l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines dans les DC

Nous avons précédemment montré que les agrégats de hGH induisaient une augmentation de la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines. Nous avons donc voulu vérifier si nous pouvions observer cette modulation au niveau transcriptionnel. Nous avons ainsi étudié l'expression des transcrits d'*IL1β*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12p40*, *CCL3* et *CXCL10* par qPCR après 4h, 8h ou 24h d'incubation avec la GH native ou agrégée. La dose de hGH utilisée est de 50 µg/mL, en accord avec l'étude précédente. Les résultats sont présentés dans la figure 25.

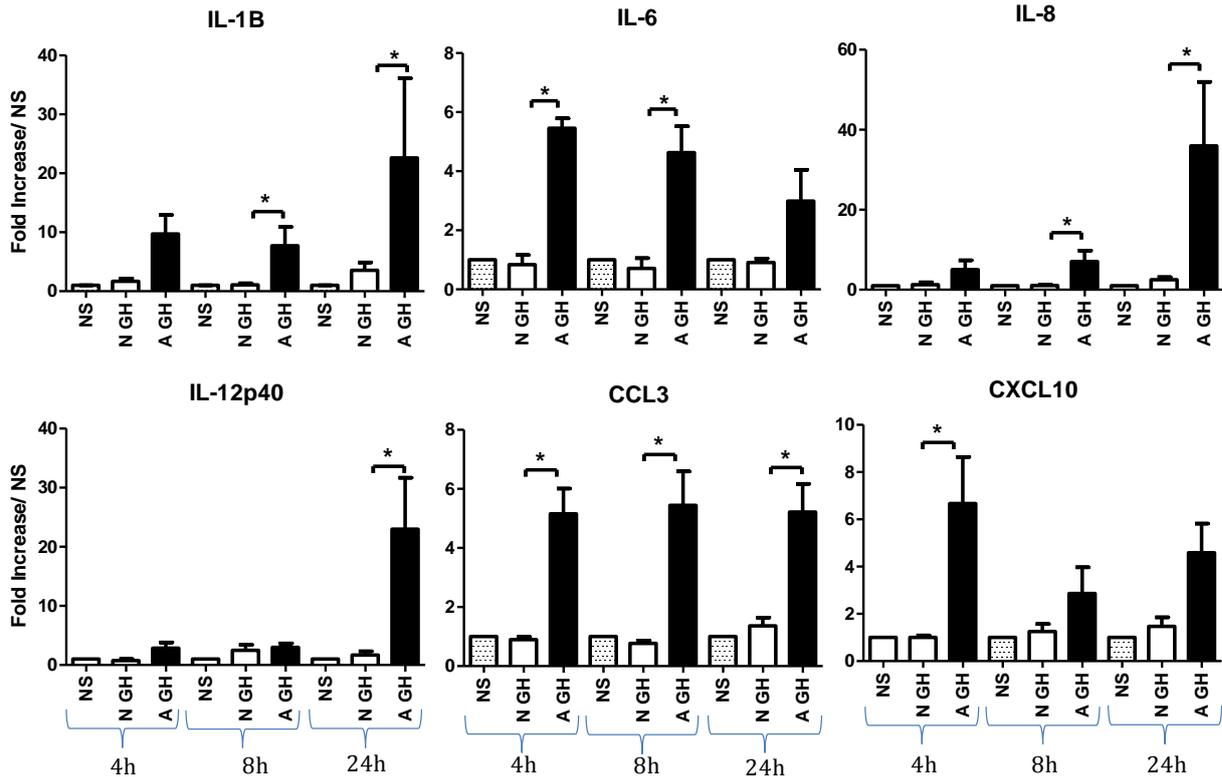


Figure 25: Analyse de l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines par qPCR.

Les cellules ont été incubées 4h, 8h ou 24h en présence de la GH native ou agrégée à la dose de 50µg/mL. Les résultats sont présentés sous forme d'index de stimulation des cellules incubées en présence de la GH native ou agrégée par rapport aux cellules non stimulées correspondantes pour chaque temps de stimulation. (n=4, p<0,05, T-test de Mann-Withney)

On observe que la hGH native induit très peu d'augmentation des transcrits, mais que les agrégats induisent une augmentation des transcrits de toutes les cytokines et chimiokines, qui peut avoir lieu à différents temps. En effet, cette augmentation peut être observée dès 4h pour *IL-6*, *CCL3* et *CXCL10*, ou être tardive, 24h pour *IL-12p40*. Dans le cas de *IL-1β* et de *IL-8* on constate une augmentation de l'expression des transcrits en réponse aux agrégats de GH au cours du temps. Dans le cas de *CCL3*, l'induction est maintenue à un niveau quasi stable jusqu'à 24 heures. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment pour la production des cytokines et chimiokines, sauf pour *IL-1β* qui n'est pas détectable en protéine.

3.3 Implication des voies de signalisation

L'expression des transcrits de cytokines et chimiokines est régulée par différentes voies de signalisation. Notamment, les protéines p38 MAPK, ERK, JNK, NF-κB, ainsi que JAK et STAT peuvent réguler l'expression de *CCL3* et *CXCL10* (Gorina et al., 2011; Nakayama et al., 2004; Osawa et al., 2006; Shen et al., 2006; Tibbles et al., 2002). Dans un premier temps, nous avons

voulu savoir quel était le statut d'activation de ces protéines lors de la stimulation des moDC par les agrégats de hGH. Nous avons pour cela étudié par western blot la phosphorylation de JNK, p65, ERK et p38MAPK après 30 minutes d'incubation avec la hGH native ou les agrégats. Un western blot représentatif pour chaque protéine ainsi qu'une quantification sont présentés dans le panel A de la figure 26. Nous avons également étudié la capacité de liaison de NF- κ B à ses séquences consensus, témoin de son activation en utilisant une technique de pull-down. Les résultats sont présentés dans le panel B de la figure 26.

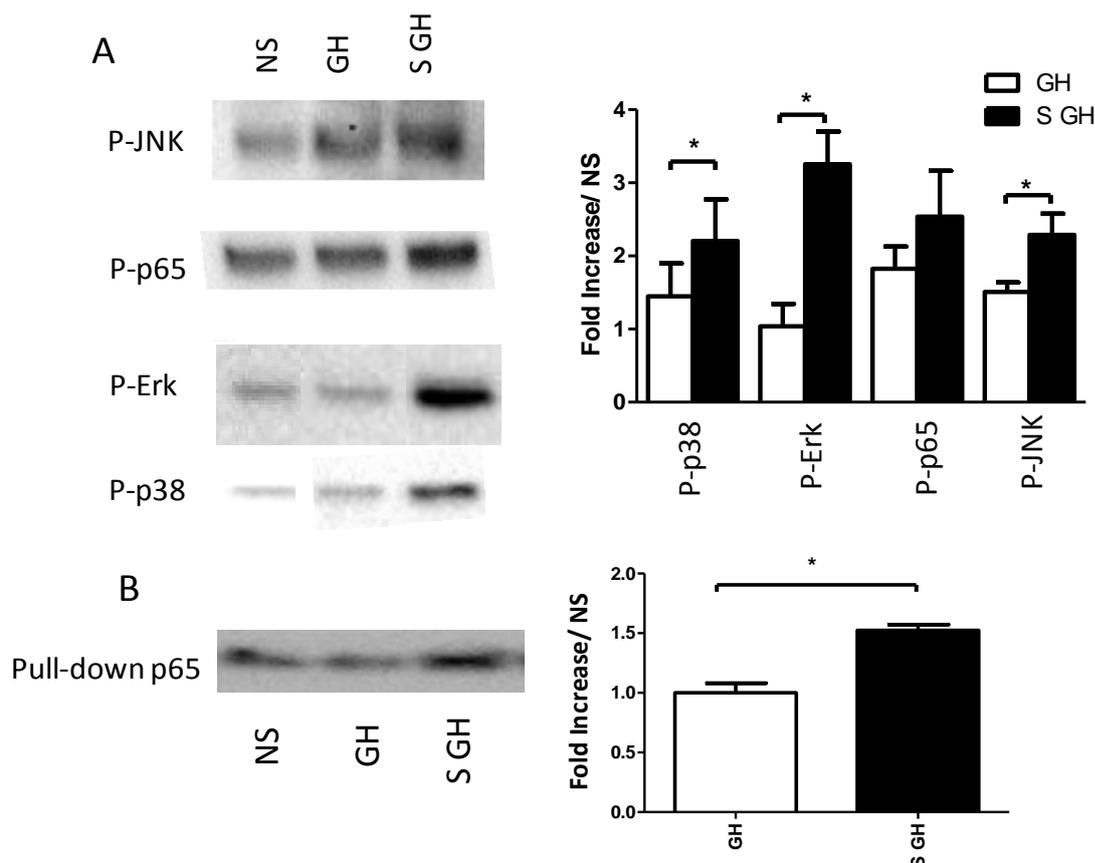


Figure 26: Analyse de la phosphorylation des protéines impliquées dans les voies d'activation induites par les agrégats d'hormone de croissance.

(A). Les moDC ont été incubées 30 minutes en milieu de culture seul ou présence de la hGH native ou agrégée à la dose de 50 μ g/mL. Panel de gauche : western blot représentatif de 4 expériences réalisées. L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™. Panel de droite : analyse quantitative de la phosphorylation des protéines après incubation avec la hGH native ou agrégée. Les résultats sont exprimés en index de stimulation des DC incubées en présence de la protéine native ou agrégée par rapport aux cellules non stimulées. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité de protéines totales obtenues après transfert. (n=4, *=p<0,05, test de Mann-Withney). (B) Analyse de la capacité de liaison de la protéine p65 par technique de pull-down. Les DC ont été incubées en présence de la GH native ou agrégée (50 μ g/mL) pendant 30 minutes. Après lyse, les échantillons sont incubés en présence d'oligonucléotides représentant la séquence consensus de liaison de p65 couplés à des billes de streptavidine-agarose. La fixation de p65 sur les oligonucléotides est analysée par western blot et révélée par un anticorps anti phospho-p65. Panel de droite : analyse quantitative de la fixation de p65 aux oligonucléotides. Les résultats sont exprimés en index de stimulation des DC incubées en présence de la GH native ou agrégée par rapport aux cellules non stimulées (n=4, *=p<0,05, test de Mann-Withney).

On peut noter que la hGH native induit une légère augmentation significative de la phosphorylation de p38 MAPK, de JNK et de ERK comparée aux cellules non stimulées.

Par la technique de pull-down, nous avons pu observer que la GH native ne modulait pas la fixation de p65 à sa séquence consensus. En revanche, on constate que les agrégats induisent une augmentation significative de l'activité de NF- κ B, de par une fixation accrue de p65 à sa séquence consensus.

Dans un second temps, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de ces protéines, nous avons étudié leur implication dans l'induction des ARNm de CCL3 et CXCL10 par les agrégats de hGH. Les concentrations d'inhibiteurs utilisées ont été déterminées précédemment au laboratoire (Antonios et al., 2010). Les résultats sont présentés dans la figure 27.

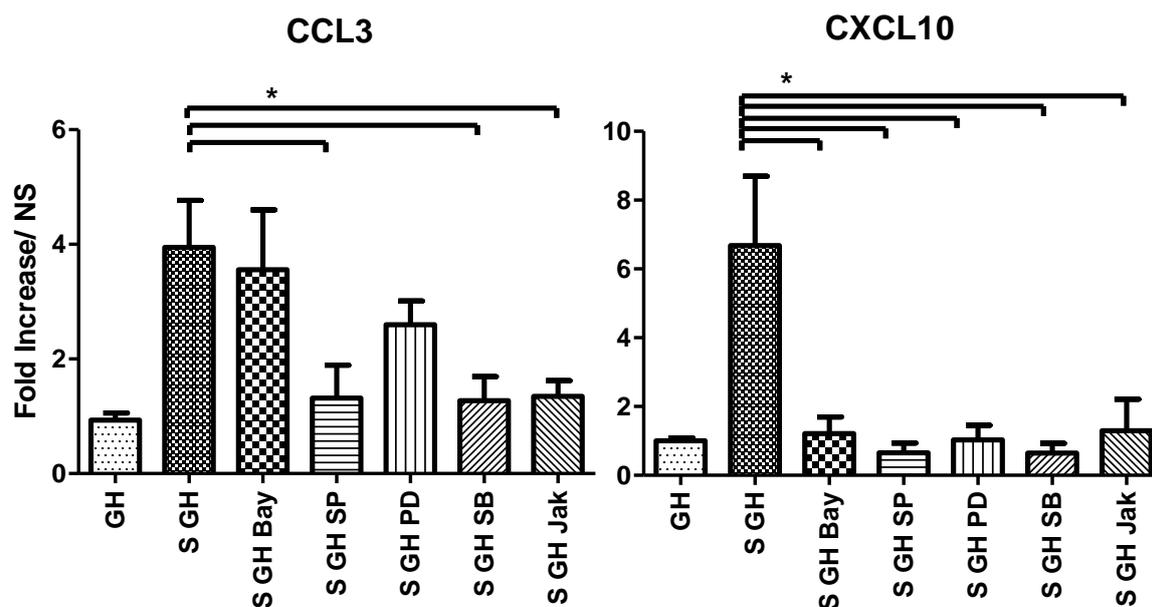


Figure 27: Analyse des transcrits de CCL3 et CXCL10 en réponse aux agrégats de GH en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de différentes protéines de signalisation.

Les cellules ont été pré-traitées avec les inhibiteurs, puis incubées 4h en présence des agrégats d'hGH à la dose de 50 μ g/mL. Les résultats sont exprimés en index de stimulation des cellules incubées en présence de la hGH native ou agrégée par rapport aux cellules non stimulées, en présence ou non d'inhibiteurs. (n=4, *=p<0,05, test de Mann-Withney). Les inhibiteurs ont été utilisés aux concentrations suivantes : Bay 3 μ M, SP600125 : 20 μ M, PD98059 : 50 μ M, SB203580 : 20 μ M, JAK Inhibitor I : 0.5 μ M. GH : DC incubées en présence de GH native, S GH : DC incubées en présence des agrégats de GH, S GH inhibiteur : DC pré-incubées avec l'inhibiteur correspondant puis stimulées avec les agrégats de GH.

On peut observer des effets différents des inhibiteurs en fonction des transcrits étudiés. Dans le cas de CCL3, on constate une forte diminution de l'expression des transcrits suite à

Résultats complémentaires

l'inhibition de JNK, p38MAPK et JAK. L'inhibition de ERK tend à diminuer l'expression de *CCL3*, en revanche, l'inhibition de I κ B n'a pas d'effet prononcé. L'absence de modulation des transcrits de *CCL3* par les inhibiteurs de NF- κ B et ERK s'explique par le fait que le promoteur de *CCL3* ne contient pas de séquence de fixation de NF- κ B (Nakayama et al., 2004).

En ce qui concerne *CXCL10*, on peut noter que l'inhibition des différentes voies de signalisation altère profondément l'expression des ARNm. En effet, l'inhibition de I κ B, JNK, ERK, p38 MAPK et JAK abolit l'augmentation de l'expression des transcrits observée suite à une stimulation des DC par les agrégats de GH.

Au final, ces résultats montrent que les agrégats de hGH induisent la production de CXCL10 et CCL3 en recrutant p38MAPK, ERK, JNK et JAK, et que NF- κ B est également recruté pour induire la production de CXCL10.

Résultats complémentaires : Etude de la modulation des fonctions des cellules dendritiques par les agrégats d'anticorps, dans le cadre Projet ABIRISK

1. Introduction

Le Projet européen ABIRISK (Anti-Biopharmaceutical Immunization: prediction and analysis of clinical relevance to minimize the RISK) vise à développer une approche intégrative pour l'étude de l'immunisation des patients aux biomédicaments, en réunissant un réseau de cliniciens, de biologistes, de scientifiques de méthodologistes et de biostatisticiens. Par ailleurs, la collaboration avec des industries pharmaceutiques appartenant à la Fédération européenne des associations et industries pharmaceutiques (EFPIA) permet une transmission directe des résultats expérimentaux pour le développement des bioproduits (BP) et la prise en charge des patients.

L'objectif du Consortium est de mieux prédire l'immunogénicité des protéines thérapeutiques utilisées pour le traitement de l'hémophilie A, de la sclérose en plaques, de la polyarthrite rhumatoïde et des maladies inflammatoires intestinales, afin de minimiser le risque d'immunisation contre celles-ci. Le projet est organisé autour de différents axes :

- L'accès à de larges cohortes de patients traités avec des BP
- Une expertise complémentaire sur les méthodes de détection des ADA
- De nouvelles approches pour caractériser la réponse lymphocytaire contre les BP
- Le développement et la validation de nouveaux outils prédictifs de l'immunogénicité
- L'intégration des données expérimentales et les observations cliniques

Pour cela, ABIRISK est organisé en 5 groupes de travail ou WorkPackages (WP) dont les principales missions et les interactions sont indiquées sur la figure 28.

- Le WP1 développe et valide des méthodes de détection des ADA, gère les cohortes de patients et définit le statut des patients avec les méthodes validées

- Le WP2 utilise les données produites par le WP1 pour identifier les patients qui développent des ADA et identifier des marqueurs génétiques de prédisposition à développer une réponse immune. Il caractérise également la réponse ADA en terme de structure et fonctionnalité des anticorps. Enfin, il étudie les mécanismes cellulaires sous jacents à la production d'ADA.
- Le WP3 évalue les méthodes prédictives de l'immunogénicité aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, et développe de nouvelles approches dans cet objectif.
- Le WP4 est en charge de développer et d'entretenir une base de données permettant de répertorier les résultats générés par les groupes précédents.
- Enfin, le WP5 est constitué des équipes de direction et de communication du Consortium.

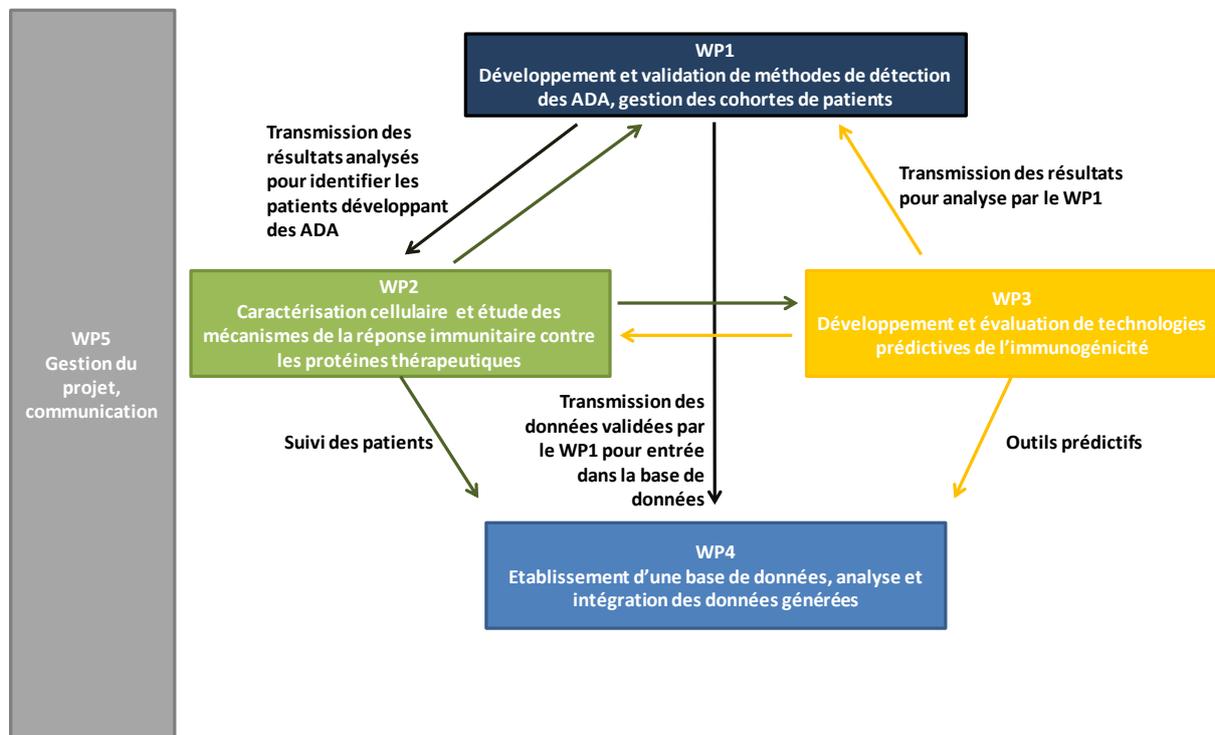


Figure 28: Organisation du Consortium ABIRISK.

Le WP3 s'intéresse à l'évaluation du panel de techniques actuellement utilisées pour prédire l'immunogénicité des bioproduits, mais aussi au développement de nouvelles méthodologies dans cette optique. Il s'attache également à la compréhension des effets de la formulation et l'agrégation des BP sur l'immunogénicité. La diversité des missions de ce groupe de travail a conduit à décliner 10 sous-groupes, chacun en charge d'une tâche, tout en gardant une logique transversale et une communication forte entre sous-groupes.

Work Package	Principaux objectifs
WP3.1	Evaluation de la valeur prédictive des populations T présentes chez les patients développant des ADA
W3.2	Méthodes <i>in silico</i> prédictives de l'immunogénicité des BP
W3.3	Identification des peptides agrégés présentés dans un contexte HLA par les cellules dendritiques. Corrélation avec les épitopes T identifiés par d'autres WP
WP3.4	Mapping des épitopes T déterminant la réponse immunitaire
WP3.5	Mesure de l'affinité des peptides processés par les cellules dendritiques pour les molécules HLA de classe II
WP3.6	Modulation des fonctions des cellules dendritiques par les BP
WP3.7	Identification des réponses immunitaires précoces induites par les BP, à l'aide d'essais <i>in vitro</i> sur PBMC humains.
WP3.8	Développement d'un modèle d'organe lymphoïde artificiel et évaluation de son potentiel à prédire l'immunogénicité des BP
WP3.9	Evaluation de modèles de souris immunodéficientes pour prédire l'immunogénicité des BP
WP3.10	Etablissement de protocoles standardisés pour l'analyse des agrégats et des modifications post-traductionnelles des protéines thérapeutiques.

Notre laboratoire collabore avec 2 autres partenaires du Consortium (Novartis Pharma et Bayer Pharma) dans le cadre de la tâche WP3.6. L'objectif est d'étudier la modulation des fonctions des cellules dendritiques par 4 anticorps monoclonaux utilisés dans le traitement de maladies inflammatoires, avec des degrés d'humanisation divers : le Rituximab, l'Infliximab, l'Adalimumab et le Natalizumab, dont les caractéristiques et indications sont rappelées dans le tableau 14.

Spécialité thérapeutique	Indications
Natalizumab, humanisé	Sclérose en plaque
Infliximab, chimérique	Maladie de Crohn, Polyarthrite rhumatoïde, Psoriasis, Rectocolite hémorragique
Rituximab, chimérique	Lymphome malin non hodgkinien, Polyarthrite rhumatoïde, Leucémie lymphoïde chronique
Adalimumab, humain	Polyarthrite rhumatoïde, Maladie de Crohn, Psoriasis, Spondylarthrite ankylosante, Rectocolite hémorragique

Tableau 14: Anticorps utilisés pour l'étude WP3.6 et indications thérapeutiques

Nous présentons ici la démarche expérimentale ainsi que les résultats associés.

2. Présentation de l'étude

La démarche expérimentale est la suivante, elle est schématisée sur la figureX :

- Les agrégats d'anticorps ont été produits et caractérisés dans le cadre du WP3.10. Chacun des partenaires a reçu une quantité définie d'anticorps natifs et agrégés.
- Une harmonisation des protocoles d'isolement et de culture des moDC a été effectuée. Des expériences préliminaires d'étude du phénotype membranaire des moDC stimulées avec des activateurs connus tel que le LPS ont été réalisées pour comparer les résultats entre sites.
- Une étude de faisabilité a été menée sur un faible nombre de donneurs, afin de suivre par différentes techniques les paramètres d'activation des moDC stimulées avec les anticorps natifs ou agrégés, et identifier les plus pertinents. Une seconde étude (follow-up study) reprenant l'analyse de ces paramètres pour un plus grand nombre de donneurs est à venir et permettra d'apporter une réponse définitive sur leur pertinence en tant qu'indicateurs d'activation par les agrégats.

Les anticorps natifs et agrégés ont été fournis par les partenaires en charge de cette tâche (WP3.10). Deux types de stress ont été appliqués : un stress physique, de pompage à travers une seringue (shear stress, ou stress de cisaillement), et un stress thermique par chauffage des préparations d'anticorps (heat stress). Pour chaque stress, deux intensités ont été utilisées : modérée (L1) ou forte (L2). Le tableau 15 résume les conditions appliquées, et le tableau 16 les concentrations des solutions d'anticorps utilisées.

Intensité	Shear Stress	Heat Stress
Non stressé	Anticorps natif	Anticorps natif
Modérée (L1)	3 cycles de pompage	65°C, 6 heures
Forte (L2)	10 cycles de pompage	55°C, 24 heures

Tableau 15: Descriptif des conditions de stress appliquées aux solutions d'anticorps.

Anticorps	Concentration (mg/mL)
Rituximab	10
Infliximab	10
Natalizumab	20
Adalimumab	50

Tableau 16: Concentrations des solutions d'anticorps employées pour la réalisation des différents stress.

La caractérisation des agrégats a été effectuée selon quatre techniques complémentaires par les partenaires du WP3.10 : analyse par turbidimétrie, par Dynamic Light Scattering (DLS), par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et par une technique de Micro Flow Imaging (MFI).

Pour mettre en évidence des marqueurs d'activation des moDC en réponse aux agrégats, il a été décidé d'étudier le phénotype membranaire par cytométrie en flux, et d'analyser l'expression de cytokines et chimiokines soit au niveau transcriptionnel par qPCR, soit au niveau protéique, par dosage dans les surnageants de culture, par technique multiplex. Enfin, l'activation des voies de signalisation est également étudiée par technique multiplex. Le travail a été réparti comme suit, chaque partenaire ayant en charge une technique d'analyse.

- Partenaire INSERM UMR 996 : analyse de l'expression des transcrits de différentes cytokines et chimiokines par qPCR,
- Partenaire Bayer Pharma (Wuppertal, Allemagne) : dosage de cytokines par technique multiplex (MSD),
- Partenaire Bayer Pharma (San Francisco, USA) : analyse des voies de signalisation par multiplex
- Partenaire Novartis Pharma : analyse du phénotype membranaire des moDC par cytométrie en flux.

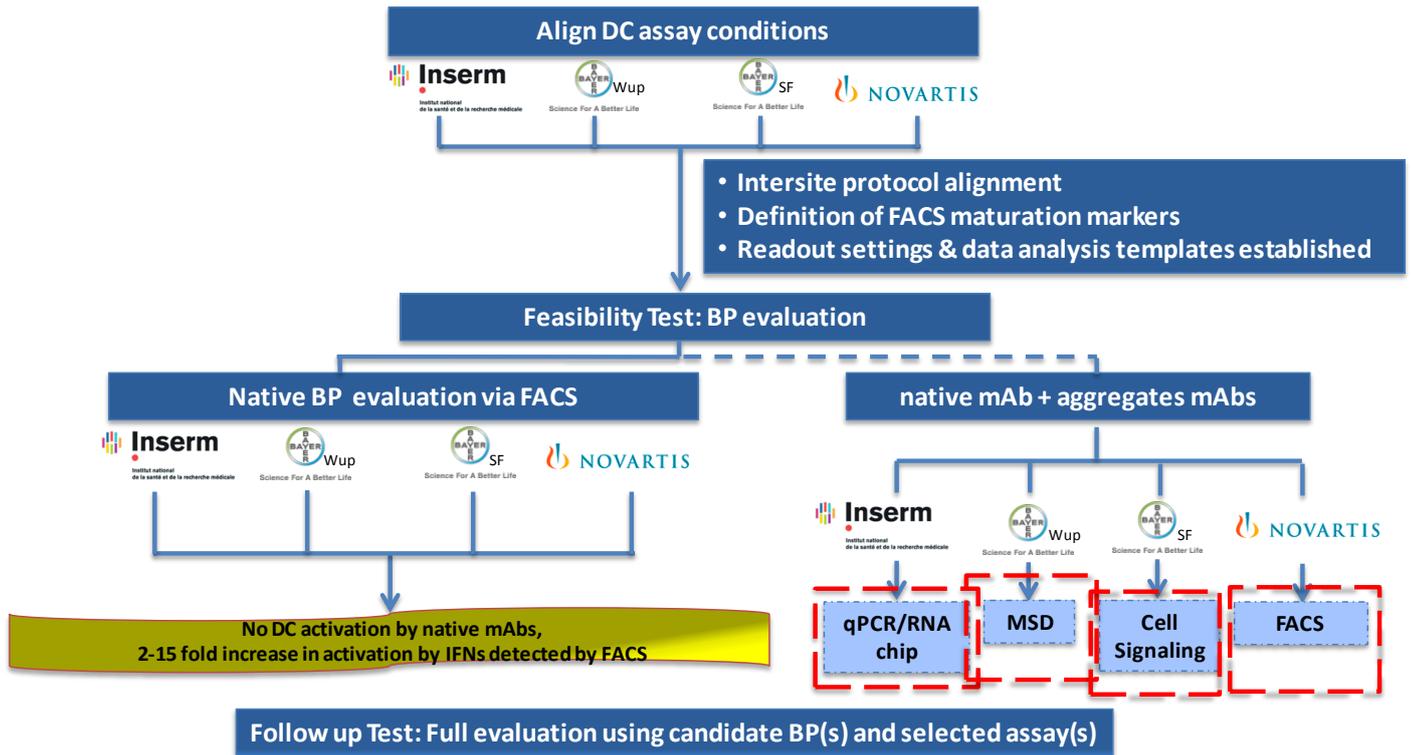


Figure 29: Démarche expérimentale pour l'étude de l'activation des moDC par les agrégats d'anticorps.

Nous présentons ci-après la méthode et résultats obtenus pour l'étude des transcrits de cytokines/chimiokines, que nous avons réalisée au laboratoire. Pour des raisons de confidentialité, les résultats générés par les autres partenaires ne seront pas décrits.

3. Matériel et méthode

3.1 Traitement des moDC par les anticorps natifs ou agrégés

Les cellules dendritiques sont différenciées à partir de monocytes du sang comme décrit précédemment. Les DC sont stimulées *in vitro* 6h ou 24h par les protéines natives ou agrégées, fournies par le WP3.10, ou avec du LPS à 25ng/mL qui sert de contrôle positif. Deux concentrations différentes d'anticorps natif ou d'agrégats sont testées: 10 µg/mL et 100 µg/mL. La cytotoxicité des produits a été vérifiée après 24h de stimulation par un marquage des DC à l'Iodure de Propidium, et n'excède pas 10%. Pour cette étude, les deux types de stress « heat » et « shear » sont testés, à leur intensité la plus élevée (L2).

3.2 Analyse des transcrits de cytokines et chimiokines par PCR quantitative (RT-qPCR)

L'isolement des ARN, ainsi que la rétrotranscription et les PCR quantitatives sont réalisées selon le protocole précédemment décrit. Les amorces utilisées sont également identiques. Les transcrits analysés sont : IL-1 β , d'IL-6, IL-8, IL-12p40, TNF- α , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, et CXCL10.

4. Résultats

Les agrégats d'anticorps modulent différemment l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines

L'expression des transcrits de cytokines et chimiokines a été quantifiée après 6h et 24h de stimulation des moDC par les anticorps natifs ou agrégés. Ces temps de stimulation ont d'une part été sélectionnés suite aux expériences réalisées au laboratoire, avec les agrégats de hGH et de Rituximab que nous avons générés, et en accord avec la littérature (Bruckner et al., 2012). Les résultats obtenus avec l'**Infliximab** montrent que les protéines natives ne modulent pas l'expression des différents transcrits quels que soient la concentration ou le temps d'analyse. Par ailleurs, les agrégats d'infliximab générés par « shear stress » (L2) ne semblent pas affecter la transcription des différents gènes étudiés (résultats montrés en annexe 1). En ce qui concerne le « heat stress » (L2), les résultats sont représentés dans la figure 30, par les moyennes d'index de stimulation par rapport aux cellules non stimulées. On note une induction de certains transcrits à la dose de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, à savoir *IL-1 β* , *IL-8*, *CCL3* et *CCL4* après 6h de stimulation. Nous ne notons pas de modulation majeure des autres transcrits, et cet effet n'est pas observé à 24h. Cet effet est plus marqué pour la dose de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pour laquelle on observe une induction d'*IL-1 β* , *IL-8*, *TNF α* , *CCL3* et *CCL4* à 6h. Par ailleurs, on observe une augmentation significative des transcrits d'*IL-12p40* et de *CCL3* à 24h, ainsi qu'une tendance à l'augmentation pour les transcrits de *CCL2* et *CCL4* à 24h.

Résultats complémentaires

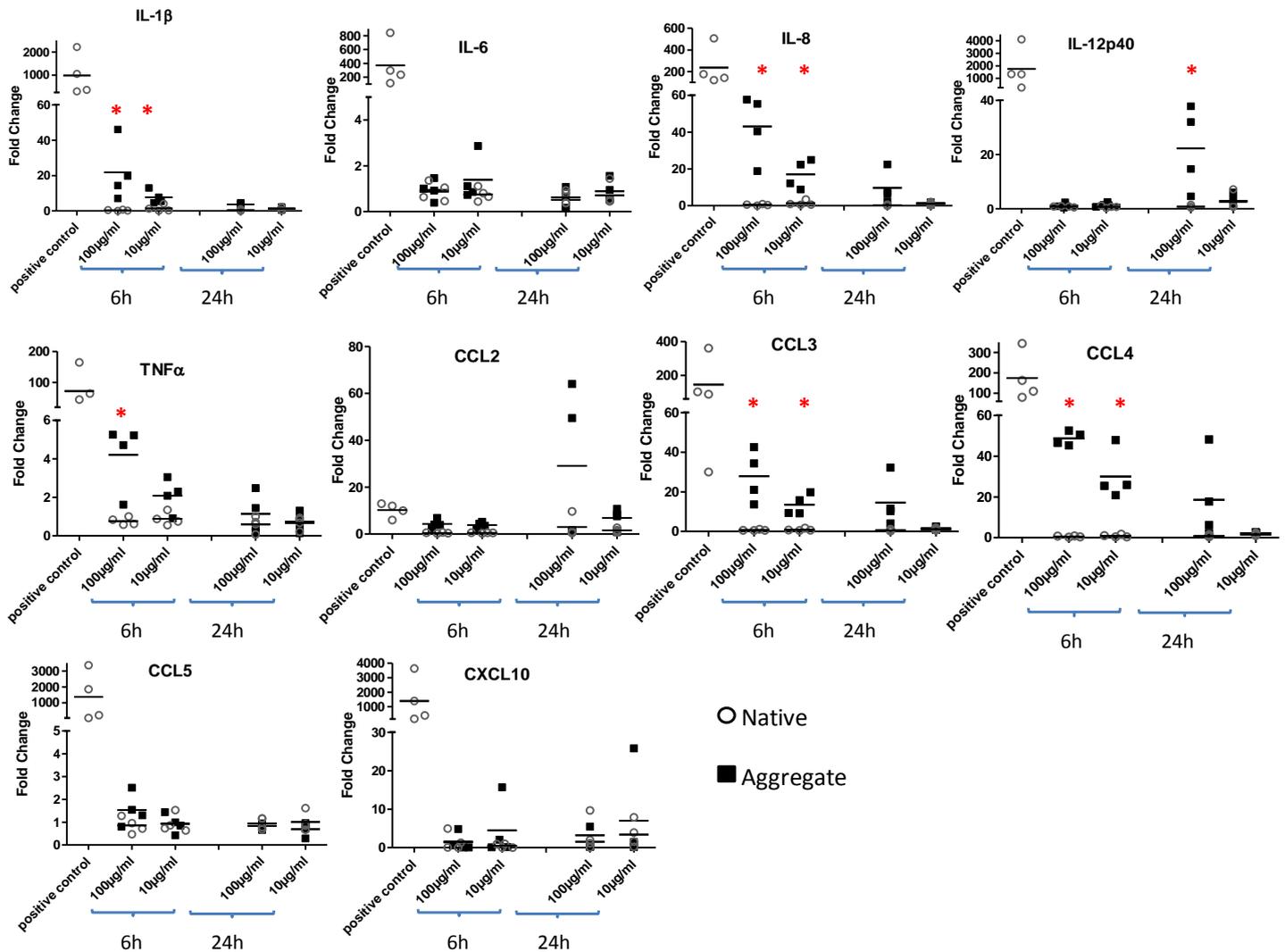


Figure 30: Effet des agrégats d'Infliximab (Heat Stress L2) sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines après 6h ou 24h de stimulation.

Les résultats sont exprimés en index de stimulation par rapport aux cellules non stimulées. Le contrôle positif est réalisé en stimulant les moDC par le LPS à 25 ng/mL . n=4 * = p<0,05, test de Mann-Whitney

En ce qui concerne le **Natalizumab et l'Adalimumab**, nous n'avons pas noté de modulation des transcrits en réponse aux protéines natives ou aux différents types d'agrégats (heat stress, L2 ou Shear stress, L2), quelque soit la concentration ou le temps de stimulation étudié. Les agrégats de **Rituximab** « heat stress » induisent une faible induction de *CXCL10*, mais le monomère semble induire la même tendance. Les résultats sont présentés dans la figure 31 sous forme de « heat map », pour tous les anticorps. Pour chaque transcrit, un code couleur est attribué en fonction de l'index de stimulation moyen obtenu par rapport aux cellules non stimulées.

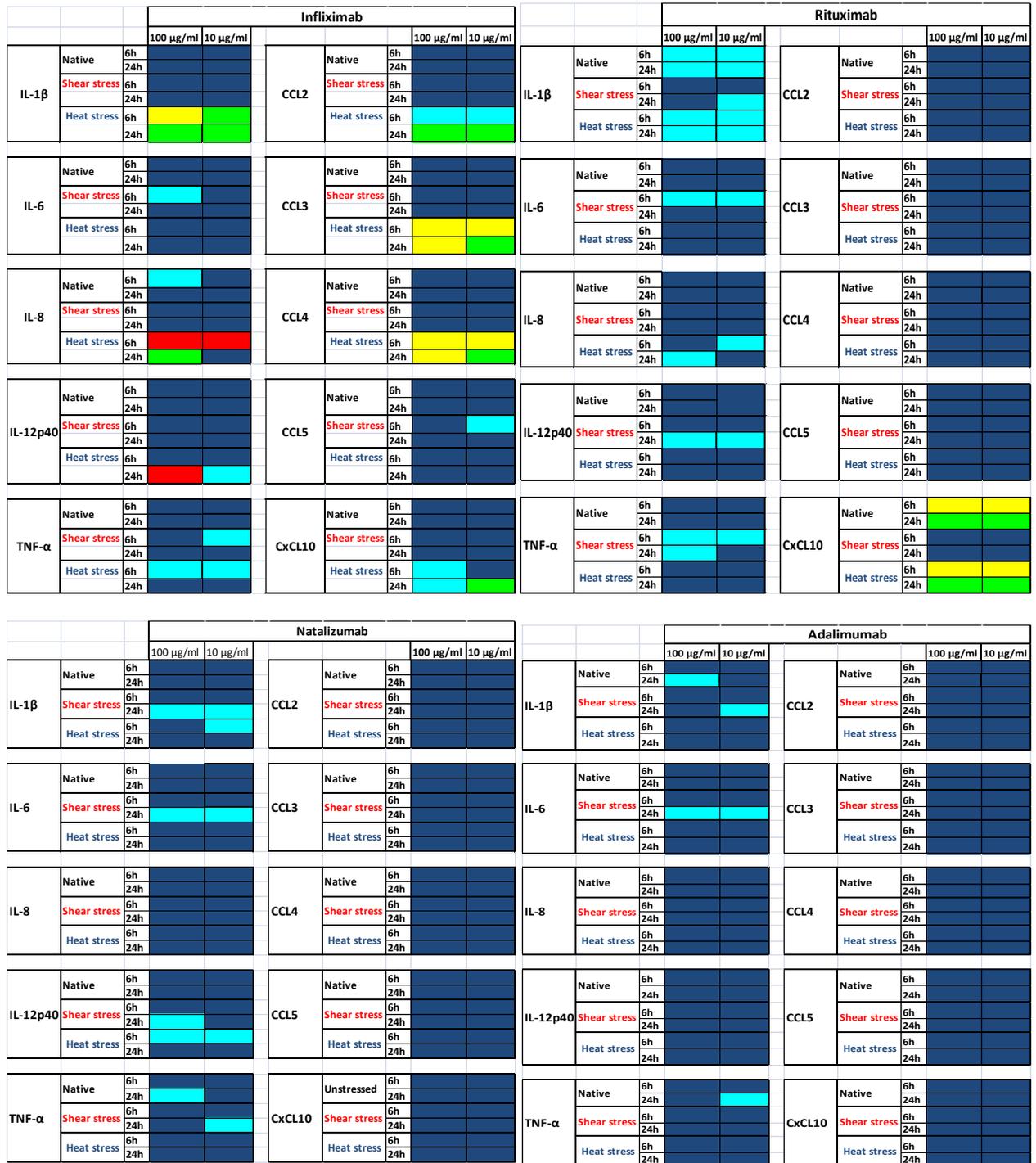
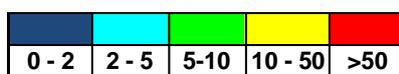


Figure 31: Heat map : Effet des agrégats d'Infliximab, Rituximab, Natalizumab et Adalimumab (Heat Stress et shear stress, L2) sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines après 6h ou 24h de stimulation.

Les résultats sont exprimés par un code couleur, en fonction de l'index de stimulation par rapport aux cellules non stimulées (n=4).



Discussion

L'objectif de ce travail de thèse est de mieux comprendre le lien entre la présence d'agrégats dans les préparations de protéines thérapeutiques et l'immunogénicité dirigée contre ces protéines. Différentes observations cliniques suggèrent que les agrégats de protéines pouvaient favoriser *in vivo* le développement d'ADA. Dans le but de valider ces observations, divers modèles murins transgéniques pour la protéine d'intérêt ont été développés. Dans ces modèles, les animaux rendus tolérants pour la protéine native ont été traités avec des préparations contenant des agrégats, et les résultats montrent la mise en place de réponses immunitaires, avec production d'anticorps contre la protéine native. Les études *in vitro* visant à analyser les réponses cellulaires sont encore peu nombreuses, et s'intéressent en particulier aux agrégats d'anticorps. Elles ont montré que ces agrégats induisent d'une part une production de différentes cytokines et chimiokines par des PBMC en culture (Joubert et al., 2012), et d'autre part une activation des cellules dendritiques, objectivée par une modulation de l'expression des marqueurs de surface, et une augmentation de la présentation de peptides provenant des protéines étudiées (Ahmadi et al., 2015; Rombach-Riegraf et al., 2014).

Une partie de notre étude s'est focalisée sur l'effet *in vitro* d'agrégats de protéines thérapeutiques sur le phénotype des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes. Nous avons d'abord établi un modèle d'agrégats à partir de protéines de complexités différentes : l'hormone de croissance et deux anticorps, sur lesquelles un stress d'agitation a été appliqué afin de former des agrégats. Ce stress a notamment été décrit comme induisant la formation de particules de taille importante, qui permettent une activation des PBMC en culture (Joubert et al. 2011 et 2012). Ces agrégats ont été ensuite caractérisés selon des méthodes orthogonales, c'est-à-dire en utilisant des techniques complémentaires (DLS et SEC pour l'analyse de la taille, dichroïsme circulaire et spectroscopie de fluorescence pour les modifications de structure). Nous avons notamment observé que les agrégats issus des différentes protéines ont des tailles comparables, comprises entre 0,8 et 1.9 μm . Il s'agit d'un élément important dans la mesure où il a été montré que des agrégats de taille supérieure au micromètre pouvaient induire une réponse cellulaire plus forte (Joubert et al., 2012). Par ailleurs, cette homogénéité de taille autorise la comparaison des effets des agrégats formés avec les différentes protéines. Néanmoins, afin d'avoir une caractérisation complète de nos préparations d'agrégats, une analyse de la dispersion de la taille de particules générées ainsi

qu'une quantification de celles-ci serait nécessaire. Il faudrait pour cela utiliser une technique telle que la MFI ou la light obscuration, qui permettent de quantifier les agrégats entre 1 μm et 100 μm et de donner une plage d'analyse plus large. En effet, la DLS nous permet de déterminer uniquement la taille de la population d'agrégats majoritaire. Nous n'avons donc pas d'information concernant le pourcentage de protéine présente sous forme d'agrégat dans nos préparations. La technique de SEC permettrait d'approcher ce résultat, mais uniquement pour connaître le pourcentage d'agrégats solubles, soit inférieurs à 1 μm . Le pourcentage d'agrégation est un paramètre important, dans la mesure où le Rituximab, dont la formulation contient du PS80 présente une population majoritaire d'agrégats légèrement supérieure à celle de l'IgG1 non formulée. En se limitant à la DLS, nous pourrions conclure que le PS80 ne joue aucun rôle au cours de l'agrégation. Or, cet excipient stabilise les protéines et permet de prévenir la formation d'agrégats, comme montré au cours d'une étude, où l'agrégation du Rituximab induite par agitation est abolie en présence de PS80 (Liu et al., 2013; Mahler et al., 2005). Les résultats que nous avons obtenus divergent, dans le sens où nous observons des agrégats après agitation. Mais cet écart peut en partie s'expliquer par l'intensité du stress appliqué (600 rpm contre 1000 rpm). Par ailleurs, Ahmadi et collaborateurs ont induit par agitation des agrégats de Rituximab dont la caractérisation, effectuée notamment par DLS, montre que la population majoritaire se situe autour de 1,5 μm . Or, par SEC, ils observent également que les agrégats représentent moins de 1% de leur préparation (Ahmadi et al., 2015). Il a également été montré que deux anticorps différents soumis au même stress pouvaient présenter des proportions d'agrégats très différentes, même si la population majoritaire est de taille similaire (Rombach-Riegraf et al., 2014). Ces résultats soulignent le caractère primordial d'une caractérisation complète des préparations d'agrégats.

Dans ce travail, nous montrons que les agrégats de GH et d'une IgG1 polyclonale humaine purifiée induisent la maturation des moDC, avec augmentation de l'expression de différents marqueurs de surface, en particulier CD83, CD86 et HLA-DR. En revanche, nous avons observé que les agrégats de Rituximab modulaient de manière moins prononcée l'expression des marqueurs. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature. En effet, Ahmadi et collaborateurs n'ont pas observé de modulation majeure du phénotype des moDC en réponse aux agrégats de Rituximab, hormis une faible augmentation de l'expression de CD86. En revanche, ils ont observé que les DC présentaient une expression accrue de CD86 et HLA-DR en réponse au Trastuzumab agrégé par agitation (Ahmadi et al., 2015). Rombach-Riegraf et collaborateurs ont également étudié la modulation de CD80, CD83 et CD86 en réponse à différents types d'agrégats de deux anticorps. Ils ont notamment mis en évidence une forte

variabilité de réponse pour les différents stress étudiés, et observé que la préparation présentant le plus d'agrégats induisait la plus forte modulation de l'expression des trois marqueurs (Rombach-Riegraf et al., 2014).

Nous avons également observé que les DC stimulées par les agrégats produisent différentes cytokines et chimiokines, telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10. Une partie de ces protéines se retrouve dans la signature cytokinique mise en évidence par Joubert sur les PBMC stimulés par des agrégats d'anticorps (Joubert et al., 2012). Au niveau des cytokines étudiées, nous pouvons observer une certaine homogénéité de résultats entre les trois produits étudiés, chaque type d'agrégats induisant la production d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-12p40. En revanche, on note une divergence de réponse au niveau des chimiokines. Dans le cas du Rituximab, on observe une faible modulation de la production de CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10 comparativement à la protéine native. Les résultats obtenus avec les agrégats d'IgG1 présentent un profil similaire, mais ces derniers augmentent de manière importante la production de CXCL10. Ces résultats sont à mettre en regard de ceux obtenus par Joubert et collaborateurs. Dans cette étude, les agrégats d'anticorps induisent une augmentation de la production de CCL2, CCL3 et CCL4 par les PBMC (Joubert et al., 2012). Les niveaux de production de chimiokines observés dans cette étude sont bien plus importants (de l'ordre du ng/ml) que ceux obtenus dans notre modèle (de l'ordre du pg/ml). Ceci peut notamment s'expliquer par la nature même des cellules utilisées. En effet, ces cytokines et chimiokines peuvent être produites par les différents types cellulaires présents au sein des PBMC, tels que les monocytes et les macrophages.

Globalement, on constate que les agrégats d'IgG1 induisent une maturation des DC plus complète que celle induite par les agrégats de Rituximab. Ceci s'observe au niveau du phénotype, avec une expression de plus de marqueurs de surface par les DC stimulées par les agrégats d'IgG1, mais également au niveau des cytokines et chimiokines, puisqu'il est nécessaire d'avoir une concentration d'agrégats de Rituximab quatre fois supérieure à la concentration d'agrégats d'IgG1 (200 µg/ml contre 50 µg/ml respectivement) pour induire des sécrétions de cytokines et de chimiokines comparables. Cette différence observée pour les deux anticorps pourrait s'expliquer par la nature des agrégats produits. D'autres études ont montré que plus la préparation présentait d'agrégats, meilleure était la réponse cellulaire (Joubert et al., 2012; Rombach-Riegraf et al., 2014). Dans une autre étude, le même groupe a mis au point une technique de séparation des agrégats selon leur taille par FACS. Ils ont ensuite mesuré sur les PBMC la production des cytokines constituant en partie la signature précédemment mise en évidence. Les résultats montrent que les agrégats les plus volumineux induisent les réponses les plus fortes, aussi bien en terme de concentration de cytokines produites qu'en terme de pourcentage de donneurs qui répondent (Telikepalli et al., 2015).

Nous constatons également que les DC présentent des profils cytokiniques différents suite à la stimulation par les agrégats de GH par rapport aux agrégats d'anticorps. En effet, la production des cytokines IL-6, IL-8 et IL-12p40 est relativement homogène, mais on note des différences de production pour les chimiokines. En particulier, les agrégats de GH, comparativement à la protéine native, induisent une forte production de CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10. Les agrégats d'anticorps quant à eux ne modulent peu voire pas la production de ces chimiokines qui est considérée comme restreinte aux DC inductrices de LyT Th1 (Lebre et al., 2005; Romagnani et al., 2005), notamment parce que CCL2 CCL3 et CCL4 lient CCR5, exprimé uniquement par les LyT Th1 au sein de la population des LyT CD4⁺ (Loetscher et al., 1998). Le profil de cytokines et chimiokines étudiés correspond à celui observé suite à une stimulation des DC par des signaux de danger, en particulier des agonistes TLR (Bruckner et al., 2012; Castiello et al., 2011).

Bien que le niveau d'activation des moDC par les agrégats de GH et d'anticorps soit variable, il est suffisant pour induire une réponse T CD4⁺ allogénique. En effet, nous avons pu constater que les agrégats des différents produits induisaient la prolifération de LyT CD4⁺. Par ailleurs, nous avons mesuré la production de cytokines par ces LyT. Les DC stimulées par les agrégats de GH induisent un profil cytokinique restreint à l'IFN γ , et l'on observe une tendance à l'augmentation de la production d'IL-17. Le résultat est différent dans le cas des anticorps. Ceux-ci conduisent en effet à une réponse mixte avec une production d'IFN γ , d'IL-17, d'IL-5 et d'IL-13. Le profil est similaire entre les deux anticorps, même si l'on note des niveaux de production variables entre les produits, l'IgG1 induisant une plus forte production d'IFN γ tandis que le Rituximab tend à induire une plus forte production d'IL-17. Ces résultats de polarisation T confirment les hypothèses annoncées par les profils de cytokines et chimiokines des DC, à savoir que les agrégats de GH induisent une activation des DC qui favorise un profil Th1, alors que les agrégats d'anticorps permettent aux DC d'induire une activation mixte des T helper.

Cette différence de profil entre les agrégats de GH et ceux d'anticorps pourrait être étudiée plus en détail. Pour cela, il faudrait dans un premier temps étudier l'expression des facteurs de transcription dans des LyT naïfs activés par les DC stimulées par les différents types d'agrégats, ce qui permettrait de confirmer les résultats obtenus au niveau cytokinique. A l'heure actuelle, nous savons que les agrégats d'anticorps induisent une réponse mixte, sans savoir quelle est la proportion de chacune des populations induite. Une approche complémentaire serait d'étudier d'autres marqueurs exprimés par les DC ou les LyT, car certains sont spécifiques de sous-populations de LyT. Par exemple, le couple CD70/CD27, exprimé respectivement par le LyT et la DC sont des marqueurs d'une polarisation Th1 (Bakdash et al., 2013). Ox40L quant à lui est une

molécule exprimée par la DC après une interaction CD40/CD40L, et est impliquée dans l'orientation Th2 de la réponse lymphocytaire (Chen et al., 1999; Jenkins et al., 2007).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de signalisation activées dans les DC suite à leur interaction avec les agrégats. Nous avons tout d'abord montré, par une approche de western blot et une technique de pull-down, que les agrégats de GH induisaient l'activation des voies p38MAPK, ERK, JNK et NF- κ B. Ces voies sont notamment induites lors de l'activation des DC par des signaux de danger, via les TLR. Ainsi, les voies MAPK et NF- κ B sont bien connues pour permettre l'induction de cytokines inflammatoires (Kawai and Akira, 2006). Nous avons axé notre étude sur l'analyse de la modulation des transcrits de *CCL3* et *CXCL10*, exprimées plus spécifiquement par les DC inductrices de LyT Th1. Le choix de ces 2 chimiokines a également été guidé par l'observation de la séquence des promoteurs des gènes étudiés (voir partie résultats complémentaires). Les résultats de qPCR montrent que les inhibitions des voies NF- κ B ; p38MAPK, JNK, ERK et JAK abolissent l'expression des transcrits de *CXCL10* en réponse aux agrégats de GH. D'autre part, l'augmentation des transcrits de *CCL3* par les agrégats de GH est inhibée par le blocage des voies JAK, p38 MAPK et JNK. Elle n'est que partiellement altérée par l'inhibiteur de la voie ERK et n'est pas affectée par les inhibiteurs de NF- κ B.

La signalisation induisant l'expression de *CXCL10* a été testée dans d'autres modèles cellulaires, et en réponse à divers stimuli, apparentés à des signaux de danger. Il a notamment été montré qu'une stimulation d'astrocytes de rat par le TLR4 conduisait à une expression de *CXCL10* dépendante de p38 MAPK et de JNK, mais indépendante de ERK. Par ailleurs, le contrôle de l'expression de *CXCL10* semble s'effectuer sous la dépendance de TRIF, l'absence de Myd88 ne modulant pas la régulation de la chimiokine (Gorina et al., 2011). La régulation Myd88-indépendante de *CXCL10* avait précédemment été mise en évidence dans le macrophage murin (Kawai et al., 2001). Par ailleurs, la voie TRIF peut conduire à l'activation d'IRF3, qui peut réguler l'expression de *CXCL10*, ainsi que de l'IFN β (Honda and Taniguchi, 2006). Ce dernier point est intéressant dans la mesure où l'IFN β , en se fixant au récepteur de l'IFN à la surface des DC peut induire l'activation de la voie JAK/STAT, et notamment JAK1/STAT1. Une explication possible de l'implication de JAK dans la production de *CXCL10* dans notre contexte serait que les agrégats induisent une activation d'IRF3 qui induit notamment la synthèse d'IFN β . Celui-ci pourrait agir en autocrine ou en paracrine sur les cellules voisines, induire l'activation de l'axe JAK/STAT qui participerait à la production de *CXCL10*. Il a également été observé l'implication des voies p38 MAPK et JNK dans la production de *CXCL10* dans des cellules microgliales murines stimulées par du LPS et de l'IFN γ (Shen et al., 2006).

La régulation de *CCL3* semble variable en fonction du type cellulaire et du stimulus étudiés. En effet, il a été montré que ERK ne modulait pas l'expression de la chimiokine dans les DC

plasmacytoïdes en réponse au TLR9 (Osawa et al., 2006), tandis que son inhibition affecte l'expression de CCL3 dans les LyB infectés par EBV (Nakayama et al., 2004). La p38MAPK, JNK et JAK régulent également positivement l'expression de la chimiokine, ce qui concorde avec les sites de fixation des facteurs de transcription situés dans son promoteur (Nakayama et al., 2004).

Comme pour ces observations, nos résultats vont donc dans le sens d'une activation des DC par un signal de danger, qui serait dans ce cas représenté par les agrégats de GH. Pour aller plus loin dans l'exploration de ces voies de signalisation, l'analyse des facteurs de transcription de la famille des IRF semble importante. Les IRF sont notamment impliqués dans l'activation de la transcription des gènes de cytokines et chimiokines suite à l'activation de la cascade de signalisation induite par l'engagement des TLR. La signalisation induite par les TLR2 et TLR4 conduit notamment à l'action d'IRF3, comme nous l'avons vu précédemment, et d'IRF7 (Gabriele and Ozato, 2007; Taylor et al., 2006). D'autre part, IRF1, IRF2 et IRF5 ont récemment été identifiés comme éléments régulateurs sur le promoteur du gène codant pour le marqueur d'activation CD83 (Stein et al., 2013). IRF1 et IRF8 sont également décrits comme régulant l'expression de l'IL-12 (Honda and Taniguchi, 2006).

Joubert et collaborateurs ont montré que les agrégats d'anticorps modulaient la réponse des PBMC via différents récepteurs : FcγRI, FcγRIII, TLR2 et TLR4 (Joubert et al., 2012). Cette hypothèse peut être valable pour les moDC, dans la mesure où elles expriment les FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b) et FcγRIII (CD16) (Guilliams et al., 2014). Par ailleurs, les TLR2 et TLR4 sont exprimés abondamment par les moDC (Schreibelt et al., 2010). La production de cytokines Th2 par les LyT pourrait conforter également l'hypothèse d'une implication des FcγR dans la stimulation induite par les agrégats d'anticorps. En effet, les DC stimulées par le FcγRIII favorisent une polarisation Th2 (Rivas-Carvalho et al., 2004).

Dans la perspective de l'identification des récepteurs cibles, l'utilisation d'outils comme des cellules HEK transfectées avec les gènes codant pour différents TLR couplés à un gène rapporteur NFκB-luciférase permettrait d'identifier ceux qui sont modulés par les agrégats. Une approche par siRNA pourrait également être employée pour valider l'implication du ou des TLR identifiés dans le modèle moDC. La production d'IL-12p40 d'une part, ainsi que les voies de signalisation activées d'autre part semblent conforter l'hypothèse du TLR4. Cette cytokine est en effet induite en réponse à différents agonistes de ce récepteur tel que le LPS ou le sulfate de nickel (Antonios et al., 2010) tandis que les MAPK et la voie NF-κB sont induites notamment en réponse au TLR4 (Kawai and Akira, 2006). Les récepteurs scavenger pourraient également constituer une bonne cible. En effet, ceux-ci, en particulier le récepteur de classe B CD36, ont

notamment pour ligand les peptides β -amyloïdes (Moore et al., 2002). Or les protéines agrégées peuvent présenter des structures « amyloïd-like » (Maas et al., 2007). L'activation des MAPK par les agrégats pourrait notamment être induite par les récepteurs scavenger (Zani et al., 2015). L'interaction d'un ligand avec CD36 induit notamment l'activation des Tyrosine kinases Fyn et Lyn. Etudier leur activation (par phosphorylation) par western blot, et utiliser des inhibiteurs pharmacologiques permettrait de mesurer l'implication de ce récepteur dans l'interaction des DC avec les agrégats. Enfin, ces récepteurs sont décrits comme pouvant s'hétérodimériser avec les TLR. En particulier, le CD36 peut servir de co-récepteur pour les TLR4 et TLR6, ce qui a pour effet de potentialiser la réponse pro-inflammatoire contre les lipoprotéines oxydées de basse densité (Stewart et al., 2010).

Au final, nos résultats confirment le potentiel immunomodulateur des agrégats sur les DC. Le schéma général ainsi que les hypothèses d'interaction sont détaillés ci-après ainsi que dans la figure 32. Les agrégats fixeraient un récepteur à la surface des DC, et seraient internalisés par un mécanisme de phagocytose, ou seraient directement internalisés par macropinocytose. Ceci déclencherait une signalisation interne dans la DC résultant en l'expression de cytokines et chimiokines inflammatoires. Les DC vont également subir des modifications phénotypiques, avec augmentation de l'expression notamment de récepteurs de chimiokines (CCR7 et CXCR4), ce qui va leur permettre de migrer dans les ganglions lymphatiques drainants. Une expression accrue des molécules de co-stimulation et du CMH-II leur permettra d'établir une synapse avec les LyT, induisant leur prolifération. Les DC stimulées par les agrégats de GH orienteront préférentiellement les LyT vers une réponse Th1, tandis que les agrégats d'anticorps induiront une réponse mixte Th1, Th2, Th17.

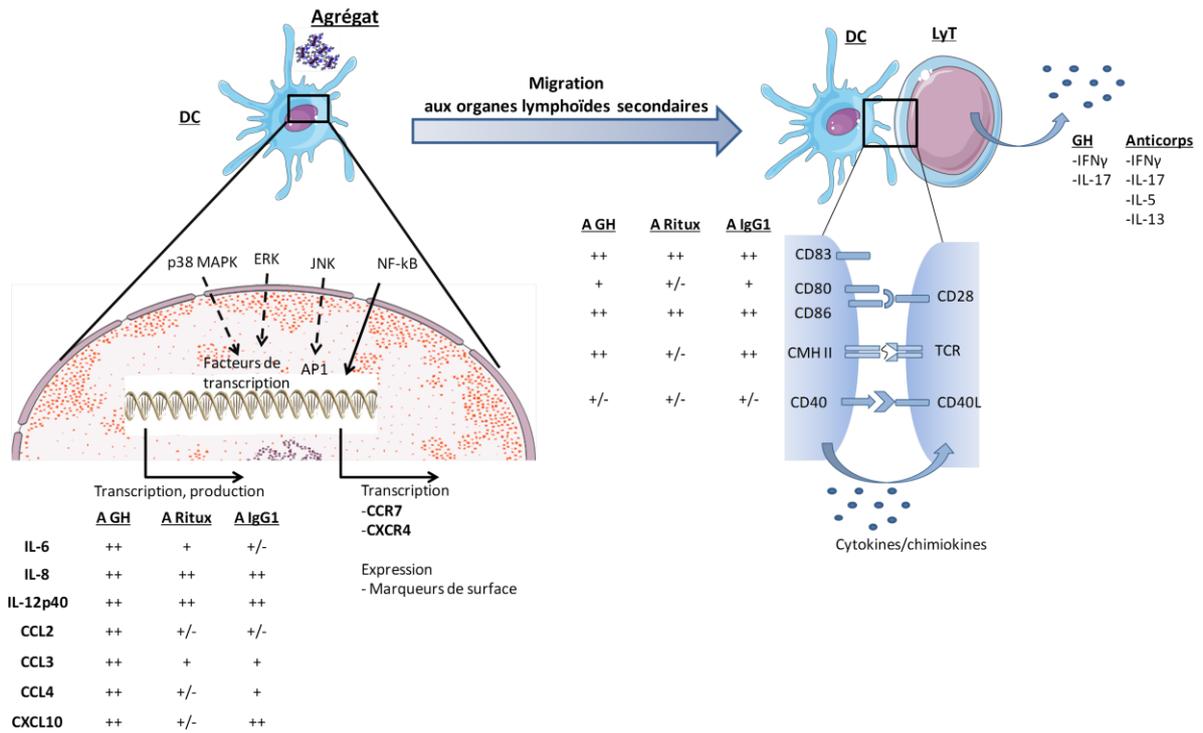


Figure 32: Schéma général de l'interaction entre les agrégats et les cellules dendritiques et ses conséquences phénotypiques et fonctionnelles.

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate , PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, Rock: Rho-associated protein kinase, Cdc42: Cell division control protein 42, MAPK: mitogen associated protein kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, AP-1: activator protein 1

Perspectives

Ces résultats confirment l'effet immunomodulateur des agrégats d'anticorps sur les DC et montrent pour la première fois celui des agrégats d'hormone de croissance humaine. Nous avons par la suite cherché à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction des DC avec les agrégats. Il a précédemment été montré que les agrégats d'anticorps pouvaient être internalisés par les DC, et dirigés vers le compartiment endosomal (Ahmadi et al., 2015). Néanmoins, le mécanisme exact d'internalisation n'a pas été étudié en détail. Ce processus peut s'effectuer selon trois grands mécanismes, la macropinocytose, l'endocytose médiée par récepteur et la phagocytose. Ces mécanismes font intervenir différentes molécules et protéines (non-exclusives entre les différentes voies). La PI3K par exemple est impliquée à la fois dans la macropinocytose et la phagocytose. Ces deux voies font également intervenir différentes Rho GTPases. Par ailleurs, elles font toutes deux intervenir les filaments d'actine, tandis que l'endocytose va faire intervenir la clathrine ou la cavéoline et l'actine (Doherty and McMahon, 2009). L'activation des Rho GTPases va conduire à l'activation de différentes voies de signalisation, notamment les MAPK (p38MAPK, JNK, ERK) ainsi que la voie NF- κ B (Chaturvedi et al., 2011; Kim et al., 2005; Ninkovic and Roy, 2012).

Afin de comprendre comment la DC pourrait internaliser les agrégats, une approche intéressante serait de marquer les agrégats et d'utiliser des inhibiteurs de différentes protéines impliquées dans les processus d'internalisation. Une étude s'est justement intéressée aux voies d'internalisation d'agrégats de peptides, où les auteurs ont montré que la taille des agrégats déterminait la voie d'internalisation par des cellules HEK293. Ils ont en effet montré que les agrégats de faible taille (inférieure à 0,5 μ m) étaient internalisés par endocytose de phase liquide (voie indépendante de la clathrine, impliquant la dynamine et l'actine), tandis que les agrégats plus volumineux (d'une taille supérieure à 1 μ m) étaient capturés par macropinocytose et phagocytose (Couceiro et al., 2015). Les agrégats que nous avons générés ont une taille d'environ 1,5 μ m. Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'ils sont internalisés par macropinocytose et/ou phagocytose. L'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation de l'actine notamment ne permet pas de discriminer la voie d'internalisation. Il faut donc utiliser différents inhibiteurs ciblant des protéines impliquées spécifiquement dans les différentes voies. La Rho kinase, activée par la GTPase Rho A, est impliquée dans la phagocytose, tandis que la tyrosine kinase Src est impliquée dans la macropinocytose et l'endocytose (Doherty and McMahon, 2009). En utilisant des inhibiteurs ciblant ces protéines, en plus d'inhibiteurs de l'actine et de la

clathrine, nous pourrions mesurer l'importance de la phagocytose et de l'endocytose dans l'internalisation des agrégats.

Ce travail est actuellement en cours de réalisation avec les agrégats de GH. Il serait donc intéressant d'étudier ces mécanismes dans le cas des anticorps. Ceci permettrait ainsi de comparer les voies impliquées dans l'internalisation de différents types de protéines.

Nous avons pu voir que des agrégats d'une petite protéine, la GH, peuvent, comme les agrégats d'anticorps, induire la maturation des DC. Il serait intéressant de déterminer si les agrégats d'une autre protéine peuvent conduire aux mêmes effets. L'EPO serait un bon candidat, dans la mesure où la présence d'agrégats dans les spécialités semble être la cause des cas d'immunogénicité conduisant au développement d'une PRCA (Schellekens and Jiskoot, 2006). Néanmoins, aucune étude cellulaire n'a été réalisée dans ce sens. Ces résultats valideraient définitivement l'impact des agrégats dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques, confirmant ainsi la nécessité d'obtenir des préparations contenant le moins d'agrégats possibles.

Bibliographie

- Aguzzi, A., Kranich, J., and Krautler, N.J. (2014). Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol.* *35*, 105–113.
- Ahmadi, M., Bryson, C.J., Cloake, E. a, Welch, K., Filipe, V., Romeijn, S., Hawe, A., Jiskoot, W., Baker, M.P., and Fogg, M.H. (2015). Small Amounts of Sub-Visible Aggregates Enhance the Immunogenic Potential of Monoclonal Antibody Therapeutics. *Pharm. Res.* *32*, 1383–1394.
- Alonso, A., Bayón, Y., Renedo, M., and Crespo, M.S. (2000). Stimulation of Fc gamma R receptors induces monocyte chemoattractant protein-1 in the human monocytic cell line THP-1 by a mechanism involving I kappa B-alpha degradation and formation of p50/p65 NF-kappa B/Rel complexes. *Int. Immunol.* *12*, 547–554.
- Antonios, D., Rousseau, P., Larangé, A., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2010). Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO₄. *J. Immunol.* *185*, 89–98.
- Armstrong, J.K., Hempel, G., Koling, S., Chan, L.S., Fisher, T., Meiselman, H.J., and Garratty, G. (2007). Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* *110*, 103–111.
- Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., and Dwek, R. a (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 21–50.
- Arsenault, R.J., Kogut, M.H., and He, H. (2013). Combined CpG and poly I: C stimulation of monocytes results in unique signaling activation not observed with the individual ligands. *Cell. Signal.* *25*, 2246–2254.
- Arthur, J.S.C., and Ley, S.C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 679–692.
- Arvinte, T., Palais, C., Green-Trexler, E., Gregory, S., Mach, H., Narasimhan, C., and Shameem, M. (2013). Aggregation of biopharmaceuticals in human plasma and human serum: Implications for drug research and development. *MAbs* *5*, 491–500.
- Astermark, J. (2012). Prevention and prediction of inhibitor risk. *Haemophilia* *18 Suppl 4*, 38–42.
- Bachem, A., Hartung, E., Güttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., et al. (2012). Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent

lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation. *Front. Immunol.* *3*, 1–12.

Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., D'Haens, G., Carbonez, A., and Rutgeerts, P. (2003). Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* *348*, 601–608.

De Baets, G., Schymkowitz, J., and Rousseau, F. (2014). Predicting aggregation-prone sequences in proteins. *Essays Biochem.* *56*, 41–52.

Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Mohammadian, J., Farahani, E.V., and Masoumian, M.R. (2009). Prevention of human granulocyte colony-stimulating factor protein aggregation in recombinant *Pichia pastoris* fed-batch fermentation using additives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* *52*, 141–148.

Baicl, A., Knopf, M., Fehr, K., Skvaril, F., and Böni, A. (1980). Kinetics of the Different Susceptibilities of the Four Human Immunoglobulin G Subclasses to Proteolysis by Human Lysosomal Elastase. *Scand. J. Immunol.* *12*, 41–50.

Bakdash, G., Sittig, S.P., van Dijk, T., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2013). The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* *4*, 1–18.

Baker, M.P., Reynolds, H.M., Lumericis, B., and Bryson, C.J. (2010). Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self. Nonself.* *1*, 314–322.

Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J.J.F. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341–352.

Banchereau, J., Banchereau, J., Briere, F., Briere, F., Caux, C., Caux, C., Davoust, J., Davoust, J., Lebecque, S., Lebecque, S., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Immunology* *18*, 767–811.

Barnard, J.G., Singh, S., Randolph, T.W., and Carpenter, J.F. (2011). Subvisible particle counting provides a sensitive method of detecting and quantifying aggregation of monoclonal antibody caused by freeze-thawing: insights into the roles of particles in the protein aggregation pathway. *J. Pharm. Sci.* *100*, 492–503.

Barnard, J.G., Babcock, K., and Carpenter, J.F. (2013). Characterization and quantitation of aggregates and particles in interferon- β products: potential links between product quality attributes and immunogenicity. *J. Pharm. Sci.* *102*, 915–928.

Bartelds, G.M., Wijbrandts, C. a, Nurmohamed, M.T., Stapel, S., Lems, W.F., Aarden, L., Dijkmans, B. a C., Tak, P.P., and Wolbink, G.J. (2010). Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor

- naive patients: a cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 817–821.
- Bartelds, G.M., Krieckaert, C.L.M., Nurmohamed, M.T., Van Schouwenburg, P. a., Lems, W.F., Twisk, J., Dijkmans, B. a C., Aarder, L., and Wolbink, G.-J. (2011). Development of Antidrug Antibodies Against Adalimumab and Association With Disease Activity and Treatment Failure During Long-term Follow-up. *JAMA* 305, 1460.
- van Beers, M.M.C., Sauerborn, M., Gilli, F., Hermeling, S., Brinks, V., Schellekens, H., and Jiskoot, W. (2010a). Hybrid transgenic immune tolerant mouse model for assessing the breaking of B cell tolerance by human interferon beta. *J. Immunol. Methods* 352, 32–37.
- van Beers, M.M.C., Sauerborn, M., Gilli, F., Brinks, V., Schellekens, H., and Jiskoot, W. (2010b). Aggregated recombinant human interferon Beta induces antibodies but no memory in immune-tolerant transgenic mice. *Pharm. Res.* 27, 1812–1824.
- Bendtzen, K. (2015). Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. *Front. Immunol.* 6, 1–5.
- Ben-Horin, S., Waterman, M., Kopylov, U., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Awadie, H., Weiss, B., and Chowers, Y. (2013). Addition of an immunomodulator to infliximab therapy eliminates antidrug antibodies in serum and restores clinical response of patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 444–447.
- Bennett, C.L., Luminari, S., Nissenon, A.R., Tallman, M.S., Klinge, S. a, McWilliams, N., McKoy, J.M., Kim, B., Lyons, E.A., Trifilio, S.M., et al. (2004). Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N. Engl. J. Med.* 351, 1403–1408.
- Benucci, M., Saviola, G., Meacci, F., Manfredi, M., Infantino, M., Campi, P., Severino, M., Iorno, M., Sarzi-Puttini, P., and Atzeni, F. (2013). No Correlations Between the Development of Specific IgA and IgM Antibodies Against Anti-TNF Blocking Agents, Disease Activity and Adverse Side Reactions in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Open Rheumatol. J.* 7, 75–80.
- Bertolotto, A., Deisenhammer, F., Gallo, P., and Sölberg Sørensen, P. (2004). Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J. Neurol.* 251 *Suppl* , II15–II24.
- Beshyah, S.A., Anyaoku, V., Niththyananthan, R., Sharp, P., and Johnston, D.G. (1991). The effect of subcutaneous injection site on absorption of human growth hormone: abdomen versus thigh. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 35, 409–412.
- Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, P., and Jain, N.K. (2002). Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Pharmazie* 57, 5–29.
- Bilate, A.M., and Lafaille, J.J. (2012). Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 733–758.

Bibliographie

- Billiet, T., Vande Casteele, N., Van Stappen, T., Princen, F., Singh, S., Gils, a., Ferrante, M., Van Assche, G., Cleynen, I., and Vermeire, S. (2015). Immunogenicity to infliximab is associated with HLA-DRB1. *Gut* 64, 2014–2016.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2003). Regulation of Phagosome Maturation by Signals from Toll-Like Receptors. *Science* (80-). 304, 1014–1019.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280–288.
- Boulianne, G.L., Hozumi, N., and Shulman, M.J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312, 643–646.
- ter Braak, E.W., Woodworth, J.R., Bianchi, R., Cerimele, B., Erkelens, D.W., Thijssen, J.H., and Kurtz, D. (1996). Injection site effects on the pharmacokinetics and glucodynamics of insulin lispro and regular insulin. *Diabetes Care* 19, 1437–1440.
- Braun, A., Kwee, L., Labow, M., and Alsenz, J. (1997). Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. *Pharm. Res.* 14, 1472–1478.
- Brennan, F.R., Morton, L.D., Spindeldreher, S., Kiessling, A., Allenspach, R., Hey, A., Muller, P.Y., Frings, W., and Sims, J. (2010). Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs* 2, 233–255.
- Brinks, V., Jiskoot, W., and Schellekens, H. (2011). Immunogenicity of therapeutic proteins: the use of animal models. *Pharm. Res.* 28, 2379–2385.
- Brooks, D., Qiu, W., Luster, A., and Ravetch, J. V (1989). STRUCTURE AND EXPRESSION OF HUMAN IgG FcRII(CD32) Functional Heterogeneity Is Encoded by the Alternatively Spliced Products of Multiple Genes. *J. Exp. Med.* 170, 1369–1385.
- Bruckner, M., Dickel, D., Singer, E., and Legler, D.F. (2012). Distinct modulation of chemokine expression patterns in human monocyte-derived dendritic cells by prostaglandin E(2). *Cell. Immunol.* 276, 52–58.
- Carpenter, J.F., Kendrick, B.S., Chang, B.S., Manning, M.C., and Randolph, T.W. (1999). Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics. *Methods Enzymol.* 309, 236–255.
- Carter-Su, C., Schwartz, J., and Smit, L.S. (1996). Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 187–207.
- Carter-Su, C., Schwartz, J., and Argetsinger, L.S. (2015). Growth hormone signaling pathways. *Growth Horm. IGF Res.*

- Casadevall, N. (2005). Epoetin-Induced Autoimmune Pure Red Cell Aplasia. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*, S67–S69.
- Casadevall, N., Dupuy, E., Molho-Sabatier, P., Tobelem, G., Varet, B., and Mayeux, P. (1996). Brief Report: autoantibodies against erythropoietin in a patient with pure red-cell aplasia. *N. Engl. J. Med.* *10*, 630–633.
- Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F.M., Krensky, A.M., and Stroncek, D.F. (2011). Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol. Immunother.* *60*, 457–466.
- Çelik, E., and Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.* *30*, 1108–1118.
- Celli, S., Garcia, Z., and Bousso, P. (2005). CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo. *J. Exp. Med.* *202*, 1271–1278.
- Chappert, P., and Schwartz, R.H. (2010). Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 552–559.
- Chaturvedi, L.S., Marsh, H.M., and Basson, M.D. (2011). Role of RhoA and its effectors ROCK and mDia1 in the modulation of deformation-induced FAK, ERK, p38, and MLC motogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *301*, C1224–C1238.
- Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 336–347.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 227–242.
- Chen, A.I., McAdam, A.J., Buhlmann, J.E., Scott, S., Lupher, M.L., Greenfield, E.A., Baum, P.R., Fanslow, W.C., Calderhead, D.M., Freeman, G.J., et al. (1999). OX40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* *11*, 689–698.
- Chen, G., Shaw, M.H., and Kim, Y. (2009). NOD-Like Receptors : Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu. Rev. Pathol.* *4*, 365–398.
- Chirmule, N., Jawa, V., and Meibohm, B. (2012). Immunogenicity to Therapeutic Proteins: Impact on PK/PD and Efficacy. *AAPS J.* *14*, 296–302.
- Christie, M., Torres, R.M., Kedl, R.M., Randolph, T.W., and Carpenter, J.F. (2014). Recombinant Murine Growth Hormone Particles are More Immunogenic with Intravenous than Subcutaneous Administration. *J. Pharm. Sci.* *103*, 128–139.
- Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grys, K.,

Bibliographie

- Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* *209*, 935–945.
- Chuang, C.-Y., Chen, T.-G., Tai, Y.-T., Chen, T.-L., Lin, Y.-H., Tsai, C.H., and Chen, R.-M. (2011). Toll-like receptor 2-mediated sequential activation of MyD88 and MAPKs contributes to lipopolysaccharide-induced sp-a gene expression in human alveolar epithelial cells. *Immunobiology* *216*, 707–714.
- Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.-T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B. a, Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., et al. (2008). Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1109–1117.
- Clark, R.H., Latypov, R.F., De Imus, C., Carter, J., Wilson, Z., Manchulenko, K., Brown, M.E., and Ketchum, R.R. (2014). Remediating agitation-induced antibody aggregation by eradicating exposed hydrophobic motifs. *MAbs* *6*, 1540–1550.
- Clarke, D.L., Clifford, R.L., Jindarat, S., Proud, D., Pang, L., Belvisi, M., and Knox, A.J. (2010). TNF?? and IFN?? synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF-??B, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* *285*, 29101–29110.
- Collin, M., McGovern, N., and Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology* *140*, 22–30.
- Cosimi, A.B., Colvin, R.B., Burton, R., Rubin, R., Goldstein, G., Kump, P., Hansen, W., Delmonico, F., and Russel, P. (1981). Use of Monoclonal Antibodies to T-Cell Subsets for Immunologic Monitoring and Treatment in Recipients of Renal Allografts. *N. Engl. J. Med.* *305*, 308–314.
- Couceiro, J.R., Gallardo, R., De Smet, F., De Baets, G., Baatsen, P., Annaert, W., Roose, K., Saelens, X., Schymkowitz, J., and Rousseau, F. (2015). Sequence-dependent internalization of aggregating peptides. *J. Biol. Chem.* *290*, 242–258.
- Crommelin, D.J. a., Sinderlar, R.D., and Meibohm, B. (2013). *Pharmaceutical Biotechnology*.
- Cromwell, M.E.M., Hilario, E., and Jacobson, F. (2006). Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* *8*, E572–E579.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
- Davies, M.J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *305*, 761–770.
- Deisenhammer, F., Reindl, M., and Berger, T. (2001). Immunoglobulin subclasses in patients with

- neutralizing and nonneutralizing antibodies against IFN-beta1b. *J. Interferon Cytokine Res.* *21*, 167–171.
- Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., and Hitchen, P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int. J. Microbiol.* *2010*.
- Delluc, S., Ravot, G., and Maillere, B. (2010). Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential. *Blood* *116*, 4542–4545.
- Delluc, S., Ravot, G., and Maillere, B. (2011). Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *FASEB J.* *25*, 2040–2048.
- Demeule, B., Palais, C., Machaidze, G., Gurny, R., and Arvinte, T. (2009). New methods allowing the detection of protein aggregates. *MAbs* *1*, 142–150.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 857–902.
- Ducancel, F., and Muller, B.H. (2012). Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *MAbs* *4*, 445–457.
- Ecker, D.M., Jones, S.D., and Levine, H.L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* *7*, 9–14.
- Egami, Y., Taguchi, T., Maekawa, M., Arai, H., and Araki, N. (2014). Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation: Gtpases and phosphoinositides in macropinocytosis. *Front. Physiol.* *5*.
- Ellis, E.F., and Henney, C.S. (1969). Adverse reactions following administration of human gamma globulin. *J. Allergy* *43*, 45–54.
- den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., and Jiskoot, W. (2011). Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm. Res.* *28*, 920–933.
- European Medicines Agency (2010). Assessment Report For MabThera Procedure No. : EMEA / H / C / 000165 / II / 0069.
- Fancke, B., and O’Keefe, M. (2013). Monitoring dendritic cell activation and maturation. *Methods Mol. Biol.* *960*, 359–370.
- Fang, L., Wu, H.M., Ding, P.S., and Liu, R.Y. (2014). TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in *Staphylococcus aureus*-stimulated RAW264.7 cells. *Cell. Signal.* *26*, 806–814.

Bibliographie

- Farrell, R. a, and Giovannoni, G. (2007). Measuring and management of anti-interferon beta antibodies in subjects with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* *13*, 567–577.
- Fathallah, A.M., Bankert, R.B., and Balu-Iyer, S. V (2013). Immunogenicity of subcutaneously administered therapeutic proteins--a mechanistic perspective. *AAPS J.* *15*, 897–900.
- Filipe, V., Jiskoot, W., Basmeleh, A.H., Halim, A., Schellekens, H., and Brinks, V. (2012). Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs* *4*, 740–752.
- Fisker, S. (2006). Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding protein: Methodological and clinical aspects. *Growth Horm. IGF Res.* *16*, 1–28.
- Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronèse, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., de Saint-Vis, B., Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Lebecque, S., et al. (2006). Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J. Immunol.* *177*, 7959–7967.
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 61–98.
- Flores-Fernández, G.M., Pagán, M., Almenas, M., Solá, R.J., and Griebenow, K. (2010). Moisture-induced solid state instabilities in alpha-chymotrypsin and their reduction through chemical glycosylation. *BMC Biotechnol.* *10*, 57.
- Food and Drug Administration (2012). Rituxan.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf.
- Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. a, Waite, J., Sacristán, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A., and Dustin, M.L. (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 79–105.
- Fradkin, A.H., Carpenter, J.F., and Randolph, T.W. (2009). Immunogenicity of aggregates of recombinant human growth hormone in mouse models. *J. Pharm. Sci.* *98*, 3247–3264.
- Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: Receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* *262*, 193–215.
- Freitag, A.J., Shomali, M., Michalakis, S., Biel, M., Siedler, M., Kaymakcalan, Z., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., Winter, G., and Engert, J. (2015). Investigation of the immunogenicity of different types of aggregates of a murine monoclonal antibody in mice. *Pharm. Res.* *32*, 430–444.
- Gabriele, L., and Ozato, K. (2007). The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* *18*, 503–510.

- Gamble, C.N. (1966). The role of soluble aggregates in the primary immune response of mice to human gamma globulin. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* *30*, 446–455.
- Gatto, D., and Brink, R. (2010). The germinal center reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 898–907.
- Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* *214*, 554–561.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 465–479.
- Genovese, M.C., Covarrubias, a., Leon, G., Mysler, E., Keiserman, M., Valente, R., Nash, P., Simon-Campos, J. a., Porawska, W., Box, J., et al. (2011). Subcutaneous abatacept versus intravenous abatacept: A phase IIIb noninferiority study in patients with an inadequate response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* *63*, 2854–2864.
- Golay, J.T., Clark, E.A., and Beverley, P.C. (1985). The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G₀ to the G₁ phase of the cell cycle. *J. Immunol.* *135*, 3795–3801.
- Goldstein, G., Fuccello, A.J., Norman, D.J., Shield, C.F., Colvin, R.B., and Cosimi, A.B. (1986). OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3. *Transplantation* *42*, 507–511.
- Gorina, R., Font-Nieves, M., Márquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., and Planas, A.M. (2011). Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF κ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* *59*, 242–255.
- Gottschalk, U. (2006). A Renaissance in Biomanufacturing: The Art of Purification. *BioPharm Int* *19*, S8–S9.
- Grabbe, S., Kämpgen, E., and Schuler, G. (2000). Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol. Today* *21*, 431–433.
- Greenwald, R.J., Boussiotis, V. a, Lorsbach, R.B., Abbas, a K., and Sharpe, a H. (2001). CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* *14*, 145–155.
- Gribben, F., Devereux, S., Thomas, N., Keim, M., Jones, H., Goldstone, A., and Linch, D. (1990). Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet* *335*, 434–437.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 659–702.
- Groom, J.R., Richmond, J., Murooka, T.T., Sorensen, E.W., Sung, J.H., Bankert, K., von Andrian, U.H.,

Bibliographie

Moon, J.J., Mempel, T.R., and Luster, A.D. (2012). CXCR3 Chemokine Receptor-Ligand Interactions in the Lymph Node Optimize CD4⁺ T Helper 1 Cell Differentiation. *Immunity* 37, 1091–1103.

De Groot, A.S., and Martin, W. (2009). Reducing risk, improving outcomes: Bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clin. Immunol.* 131, 189–201.

De Groot, A.S., Moise, L., McMurry, J. a, Wambre, E., Overtvelt, L. Van, Moingeon, P., Scott, D.W., Martin, W., Cd, C.D., and Foxp, H. (2008). Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc – derived peptide “ Tregitopes ” T Reg depletion. *October* 112, 3303–3311.

Guha, M. (2002). The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 32124–32132.

Guillerey, C., Mourieù, J., Polo, G., Doyen, N., Law, H.K.W., Chan, S., Kastner, P., Leclerc, C., and Dadaglio, G. (2012). Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK-cell responses after TLR9 triggering in mice. *Blood* 120, 90–99.

Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2014). The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 94–108.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60–73.

Hansen, T.K. (2002). Pharmacokinetics and acute lipolytic actions of growth hormone. Impact of age, body composition, binding proteins, and other hormones. *Growth Horm. IGF Res.* 12, 342–358.

Hao, Y., Chu, J., Wang, Y., Zhuang, Y., and Zhang, S. (2007). The inhibition of aggregation of recombinant human consensus interferon-?? mutant during *Pichia pastoris* fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 578–584.

Harding, F.A., Stickler, M.M., Razo, J., and DuBridge, R.B. (2010). The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* 2, 256–265.

Hardison, S.E., and Brown, G.D. (2012). review C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.* 13, 817–822.

Harris, R.J., Kabakoff, B., Macchi, F.D., Shen, F.J., Kwong, M., Andya, J.D., Shire, S.J., Bjork, N., Totpal, K., and Chen, A.B. (2001). Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 752, 233–245.

- Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2012). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol* 6, 599–609.
- Hermeling, S., Crommelin, D.J. a., Schellekens, H., and Jiskoot, W. (2004). Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharm. Res.* 21, 897–903.
- Hermeling, S., Schellekens, H., Maas, C., Gebbink, M.F.B.G., Crommelin, D.J. a, and Jiskoot, W. (2006). Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. *J. Pharm. Sci.* 95, 1084–1096.
- Hintz, R., Kenneth, M.D., Attie, M., Baptista, J., and Roche, A. (1999). Effect of Growth Hormone Treatment on Adult Height of Children with Idiopathic Short Stature. *N. Engl. J. Med.* 340, 502–507.
- Hoffmann, S., Hoffmann, S., Cepok, S., Cepok, S., Grummel, V., Grummel, V., Lehmann-horn, K., Lehmann-horn, K., Hemmer, B., and Hemmer, B. (2008). HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 Are Strongly Associated with the Development of Antibodies against Interferon- β Therapy in Multiple Sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 219–227.
- Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 644–658.
- Houdebine, L.-M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 107–121.
- Huang, C.-T., Sharma, D., Oma, P., and Krishnamurthy, R. (2009). Quantitation of protein particles in parenteral solutions using micro-flow imaging. *J. Pharm. Sci.* 98, 3058–3071.
- Human, P., Ilsley, H., Roberson, C., Grovender, E., Van Antwerp, B., Fogt, E., and Zilla, P. (2014). Assessment of the Immunogenicity of Mechanically Induced Interferon Aggregates in a Transgenic Mouse Model. *J. Pharm. Sci.* 722–730.
- Hwang, W.Y.K., and Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36, 3–10.
- Igyarto, B.Z., Jenison, M.C., Dudda, J.C., Roers, A., Mu, W., Koni, P.A., Campbell, D.J., Shlomchik, M.J., and Kaplan, D.H. (2009). Langerhans Cells Suppress Contact Hypersensitivity Responses Via Cognate CD4 Interaction and Langerhans. 25–27.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O. a, Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* 204, 105–115.
- Jahn, E.M., and Schneider, C.K. (2009). How to systematically evaluate immunogenicity of

Bibliographie

therapeutic proteins - regulatory considerations. *N. Biotechnol.* *25*, 280–286.

Jenkins, S.J., Perona-wright, G., Alan, G.F., Ishii, N., Macdonald, A.S., Jenkins, S.J., Perona-wright, G., Worsley, A.G.F., Ishii, N., and Macdonald, A.S. (2007). Dendritic Cell Expression of OX40 Ligand Acts as a Costimulatory, Not Polarizing, Signal for Optimal Th2 Priming and Memory Induction In Vivo. *J. Immunol.* *179*, 3515–3523.

Joffre, O. (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity - Joffre - 2008 - Immunological Reviews - Wiley Online Library. 234–247.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* *321*, 522–525.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* *207*, 1247–1260.

Joshi, V., Shivach, T., Yadav, N., and Rathore, A.S. (2014). Circular Dichroism Spectroscopy as a Tool for Monitoring Aggregation in Monoclonal Antibody Therapeutics. *Anal. Chem.*

Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., and Narhi, L.O. (2011). Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *J. Biol. Chem.* *286*, 25118–25133.

Joubert, M.K., Hokom, M., Eakin, C., Zhou, L., Deshpande, M., Baker, M.P., Goletz, T.J., Kerwin, B. a, Chirmule, N., Narhi, L.O., et al. (2012). Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses. *J. Biol. Chem.* *287*, 25266–25279.

Kaabi, Y. (2012). Growth hormone and its receptor: A molecular insight. *Saudi J. Heal. Sci.* *1*, 61.

Kaisho, T. (2012). Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine* *30*, 7652–7657.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* *13*, 816–825.

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* *167*, 5887–5894.

Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1751*, 119–139.

Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining Macropinocytosis. *Traffic* *10*, 364–371.

- Kerscher, B., Willment, J.A., and Brown, G.D. (2013). The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: An update. *Int. Immunol.* *25*, 271–277.
- Kerzerho, J., Maazi, H., Speak, A.O., Szely, N., Lombardi, V., Khoo, B., Geryak, S., Lam, J., Soroosh, P., Van Snick, J., et al. (2013). Programmed cell death ligand 2 regulates TH9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 1048–1057.e2.
- Kiese, S., Pappenberg, A., Friess, W., and Mahler, H.-C. (2008). Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody. *J. Pharm. Sci.* *97*, 4347–4366.
- Kim, J.S., Kim, J.G., Jeon, C.Y., Won, H.Y., Moon, M.Y., Seo, J.Y., Kim, J. Il, Kim, J., Lee, J.Y., Choi, S.Y., et al. (2005). Downstream components of RhoA required for signal pathway of superoxide formation during phagocytosis of serum opsonized zymosans in macrophages. *Exp. Mol. Med.* *37*, 575–587.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Thompson-snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Palucka, A.K., Reiter, Y., Banchereau, J., et al. (2009). Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity* *29*, 497–510.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* *256*, 495–497.
- Konrad, M.W., Childs, A.L., Merigan, T.C., and Borden, E.C. (1987). Assessment of the antigenic response in humans to a recombinant mutant interferon beta. *J. Clin. Immunol.* *7*, 365–375.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* *10*, 524–530.
- Koronakis, V., Hume, P.J., Humphreys, D., Liu, T., Hørning, O., Jensen, O.N., and McGhie, E.J. (2011). WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1. *Pnas* *108*, 14449–14454.
- Kosmac, M., Avcin, T., Toplak, N., Simonini, G., Cimaz, R., and Serbec, V. (2011). Exploring the Binding Sites of Anti-Infliximab Antibodies in. *Pediatr. Res.* *69*, 243–248.
- Kramarczyk, J.F., Kelley, B.D., and Coffman, J.L. (2008). High-throughput screening of chromatographic separations: II. Hydrophobic interaction. *Biotechnol. Bioeng.* *100*, 707–720.
- Krieckaert, C.L., Nurmohamed, M.T., and Wolbink, G.J. (2012). Methotrexate reduces immunogenicity in adalimumab treated rheumatoid arthritis patients in a dose dependent manner. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1914–1915.
- Krieckaert, C.L.M., Bartelds, G.M., Lems, W.F., and Wolbink, G.J. (2010). The effect of immunomodulators on the immunogenicity of TNF-blocking therapeutic monoclonal antibodies:

a review. *Arthritis Res. Ther.*

Kushwah, R., and Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 133, 409–419.

Laar, L. Van De, Coffey, P.J., and Woltman, A.M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF : molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119, 3383–3393.

Labrijn, A.F., Buijsse, A.O., van den Bremer, E.T.J., Verwilligen, A.Y.W., Bleeker, W.K., Thorpe, S.J., Killestein, J., Polman, C.H., Aalberse, R.C., Schuurman, J., et al. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat. Biotechnol.* 27, 767–771.

Lacroix-Desmazes, S., Misra, N., Bayry, J., Artaud, C., Drayton, B., Kaveri, S. V., and Kazatchkine, M.D. (2002). Pathophysiology of inhibitors to factor VIII in patients with haemophilia A. *Haemophilia* 8, 273–279.

Laird, M.H.W., Rhee, S.H., Perkins, D.J., Medvedev, A.E., Piao, W., Fenton, M.J., and Vogel, S.N. (2009). TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J. Leukoc. Biol.* 85, 966–977.

van der Laken, C.J., Voskuyl, a E., Roos, J.C., Stigter van Walsum, M., de Groot, E.R., Wolbink, G., Dijkmans, B. a C., and Aarden, L. a (2007). Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 253–256.

Lallemand, C., Kavrochorianou, N., Steenholdt, C., Bendtzen, K., Ainsworth, M. a., Meritet, J.F., Blanchard, B., Lebon, P., Taylor, P., Charles, P., et al. (2011). Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF α antagonists. *J. Immunol. Methods* 373, 229–239.

Lebre, M.C., Burwell, T., Vieira, P.L., Lora, J., Coyle, A.J., Kapsenberg, M.L., Clausen, B.E., and De Jong, E.C. (2005). Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol. Cell Biol.* 83, 525–535.

León, B., López-Bravo, M., and Ardavín, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519–531.

Li, H., Ayer, L.M., Lytton, J., and Deans, J.P. (2003). Store-operated Cation Entry Mediated by CD20 in Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 278, 42427–42434.

Liu, Z., and Roche, P.A. (2015). Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-

- restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front. Physiol.* 6, 1.
- Liu, L., Qi, W., Schwartz, D.K., Randolph, T.W., and Carpenter, J.F. (2013). The effects of excipients on protein aggregation during agitation: an interfacial shear rheology study. *J. Pharm. Sci.* 102, 2460–2470.
- Liu, Y., Reidler, H., Pan, J., Milunic, D., Qin, D., Chen, D., Vallejo, Y.R., and Yin, R. (2011). A double antigen bridging immunogenicity ELISA for the detection of antibodies to polyethylene glycol polymers. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 64, 238–245.
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., and Dayer, J.M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391, 344–345.
- Luo, Y., Lu, Z., Raso, S.W., Entrican, C., and Tangarone, B. (2009). Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fc γ receptors. 491–504.
- Ma, Y.R., and Ma, Y.H. (2014). MIP-1?? enhances Jurkat cell transendothelial migration by up-regulating endothelial adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Leuk. Res.* 38, 1327–1331.
- Maas, C., Hermeling, S., Bouma, B., Jiskoot, W., and Gebbink, M.F.B.G. (2007). A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals. *J. Biol. Chem.* 282, 2229–2236.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionic, a, Schmitz, J., and Hart, D.N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512–4520.
- Magdelaine-Beuzelin, C., Ohresser, M., and Watier, H. (2009). Neonatal Fc receptor, key control of immunoglobulins biodistribution. *Med. Sci. (Paris)*. 25, 1053–1056.
- Magombedze, G., Reddy, P.B.J., Eda, S., and Ganusov, V. V (2013). Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Front. Physiol.* 4, 206.
- Mahler, H.-C., Müller, R., Friess, W., Delille, A., and Matheus, S. (2005). Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 407–417.
- Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., and Kiese, S. (2009). Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.* 98, 2909–2934.
- Maini, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Davis, D., Macfarlane, J.D., Antoni, C., Leeb, B., Elliott, M.J., Woody, J.N., et al. (1998). Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* 41, 1552–1563.
- Malchinkhuu, E., Sato, K., Horiuchi, Y., Mogi, C., Ohwada, S., Ishiuchi, S., Saito, N., Kurose, H., Tomura, H., and Okajima, F. (2005). Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells. *Oncogene* 24, 6676–6688.

Bibliographie

- Maldonado, R., and Andrian, U. Von (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells.
- Maloney, D.G., Liles, T.M., Czerwinski, D.K., Waldichuk, C., Rosenberg, J., Grillo-Lopez, a, and Levy, R. (1994). Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 84, 2457–2466.
- Manning, M.C., Chou, D.K., Murphy, B.M., Payne, R.W., and Katayama, D.S. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm. Res.* 27, 544–575.
- Marichal-Gallardo, P. a., and Álvarez, M.M. (2012). State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: Process trends in design and validation. *Biotechnol. Prog.* 28, 899–916.
- Massa, G., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., and Bouillon, R. (1993). Five-year follow-up of growth hormone antibodies in growth hormone deficient children treated with recombinant human growth hormone. *Clin Endocrinol* 38, 137–142.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
- Maurer, M., and Von Stebut, E. (2004). Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1882–1886.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.-N., Low, D., et al. (2014). Human dermal CD14⁺ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 41, 465–477.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154–159.
- Miettinen, H.M., Rose, J.K., and Mellman, I. (1989). Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity. *Cell* 58, 317–327.
- Miller, L., Weissmüller, S., Ringler, E., Crauwels, P., Van Zandbergen, G., Seitz, R., and Waibler, Z. (2015). Danger signal-dependent activation of human dendritic cells by plasma-derived factor VIII products. *Thromb. Haemost.* 114, 268–276.
- Moise, L., Song, C., Martin, W.D., Tassone, R., De Groot, A.S., and Scott, D.W. (2012). Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clin. Immunol.* 142, 320–331.
- Mok, C. (2014). Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 87–100.
- Mond, J.J. (1995). T cell independent antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 349–354.

- Moore, W., and Leppert, P. (1980a). Role of Aggregated Human Growth Hormone (hGH) in Development of Antibodies to hGH*. *J. Clin. ...* 51.
- Moore, W. V, and Leppert, P. (1980b). Role of aggregated human growth hormone (hGH) in development of antibodies to hGH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 691–697.
- Moore, K.J., El Khoury, J., Medeiros, L. a., Terada, K., Geula, C., Luster, A.D., and Freeman, M.W. (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of β -amyloid. *J. Biol. Chem.* 277, 47373–47379.
- Mukherjee, S., Chowdhury, P., and Gai, F. (2009). Effect of dehydration on the aggregation kinetics of two amyloid peptides. *J. Phys. Chem. B* 113, 531–535.
- Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H., and Furue, M. (2006). Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.* 42, 1–11.
- Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K., and Yoshie, O. (2004). Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 78, 1665–1674.
- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74, 181–189.
- Narhi, L.O., Schmit, J., Bechtold-Peters, K., and Sharma, D. (2012). Classification of protein aggregates. *J. Pharm. Sci.* 101, 493–498.
- Neefjes, J., Jongsmma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–836.
- van der Neut Kolfshoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W., Martinez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T., Wiegman, L., Vink, T., Aarder, L., et al. (2007). Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. 317, 1554–1558.
- Ni, Y., and Chen, R. (2009). Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 31, 1661–1670.
- Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2001). <Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril: Elucidation of the Molecular Mechanism. *Biochemistry* 40, 6036–6046.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V (2008). Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* 96, 179–204.

Bibliographie

- Ninkovic, J., and Roy, S. (2012). Morphine decreases bacterial phagocytosis by inhibiting actin polymerization through cAMP-, Rac-1-, and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Am. J. Pathol.* *180*, 1068–1079.
- Novo Nordisk (2008). NovoSevenRT (rFactorVIIa). Full prescribing information. Novo Nord. Princeton, NJ, USA. [Http://www.novosevenrt.com/](http://www.novosevenrt.com/).
- O'Neill, L. a J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.
- Obrezanova, O., Arnell, A., Gómez de la Cuesta, R., Berthelot, M.E., Gallagher, T.R., Zurdo, J., and Stallwood, Y. (2015). Aggregation risk prediction for antibodies and its application to biotherapeutic development. *MAbs* *7*, 352–363.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* *12*, 695–708.
- Ogata, M., Ito, T., Shimamoto, K., Nakanishi, T., Satsutani, N., Miyamoto, R., and Nomura, S. (2013). Plasmacytoid dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming. *Int. Immunol.* *25*, 171–182.
- Okayama, Y., Tkaczyk, C., Metcalfe, D.D., and Gilfillan, A.M. (2003). Comparison of Fc epsilon RI- and Fc gamma RI-mediated degranulation and TNF-alpha synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for Fc gamma RI-induced degranulation. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1450–1459.
- Onitsuka, M., Kawaguchi, A., Asano, R., Kumagai, I., Honda, K., Ohtake, H., and Omasa, T. (2014). Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture. *J. Biosci. Bioeng.* *117*, 639–644.
- Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T., and Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 3833–3837.
- Osawa, Y., Iho, S., Takauji, R., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Horiguchi, S., Urasaki, Y., Matsuki, T., and Fujieda, S. (2006). Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *177*, 4841–4852.
- van Panhuys, N. (2016). TCR Signal Strength Alters T – DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. *Front. Immunol.* *7*, 1–14.
- van Panhuys, N., Klauschen, F., and Germain, R.N. (2014). T-Cell-Receptor-Dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4(+) T Cell Polarization In Vivo. *Immunity* *41*, 63–74.

- Parekh, R.B., Dwek, R. a, Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, a, Stanworth, D., Rademacher, T.W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., and Matsuta, K. (1985). Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* *316*, 452–457.
- Pavlou, A.K., and Reichert, J.M. (2004). Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1513–1519.
- Pekar, a H., and Frank, B.H. (1972). Conformation of proinsulin. A comparison of insulin and proinsulin self-association at neutral pH. *Biochemistry* *11*, 4013–4016.
- Peng, A., Gaitonde, P., Kosloski, M., Miclea, P., Varma, P., and Balu-Iyer, S. (2009). Effect of route of administration of human recombinant factor VIII on its immunogenicity in Hemophilia A mice. *J. Pharm. Sci.* *98*, 4480–4484.
- Pérez-Callejo, D., González-Rincón, J., Sánchez, a, Provencio, M., and Sánchez-Beato, M. (2015). Action and resistance of monoclonal CD20 antibodies therapy in B-cell non-hodgkin lymphomas. *Cancer Treat. Rev.* *41*, 680–689.
- Periti, P., Mazzei, T., and Mini, E. (2002). Clinical pharmacokinetics of depot leuprorelin. *Clin. Pharmacokinet.* *41*, 485–504.
- Ph. Eur. 2008. 2.9.19 (2008). Particulate contamination: Sub-visible particles, 6th edition.
- Philo, J.S. (2006). Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS J.* *8*, E564–E571.
- Pirazzoli P, Cacciari E, Mandini M, Cicognani A, Zucchini S, Sganga T, C.M. (1995). Follow-up of antibodies to growth hormone in 210 growth hormone-deficient children treated with different commercial preparations. *Acta Paediatr.* *84*, 1233–1236.
- Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity* *38*, 322–335.
- Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., and Deans, J.P. (2008). CD20 Homo-oligomers Physically Associate with the B Cell. *J. Biol. Chem.* *283*, 18545–18552.
- Pone, E.J., Xu, Z., White, C. a, Zan, H., and Casali, P. (2012). B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination. *Front. Biosci.* *17*, 2594–2615.
- Porter, C.J.H., and Charman, S. a. (2000). Lymphatic transport of proteins after subcutaneous administration. *J. Pharm. Sci.* *89*, 297–310.

Bibliographie

- Praditpornsilpa, K., Kupatawintu, P., Mongkonsritagoon, W., Supasyndh, O., Jootar, S., Intarakumthornchai, T., Pongskul, C., Prasithsirikul, W., Achavanuntakul, B., Ruangarnchanasetr, P., et al. (2009). The association of anti-r-HuEpo-associated pure red cell aplasia with HLA-DRB1*09-DQB1*0309. *Nephrol. Dial. Transplant.* *24*, 1545–1549.
- Pricop, L., Redecha, P., Teillaud, J., Frey, J., Fridman, W.H., Sautès-fridman, C., and Salmon, J.E. (2001). Differential Modulation of Stimulatory and Inhibitory Fc γ Receptors on Human Monocytes by Th1 and Th2 Cytokines. *J. Immunol.* *116*, 531–537.
- Purohit, V.S., Middaugh, C.R., and Balasubramanian, S. V (2006). Influence of aggregation on immunogenicity of recombinant human Factor VIII in hemophilia A mice. *J. Pharm. Sci.* *95*, 358–371.
- Qi, X.F., Kim, D.H., Yoon, Y.S., Jin, D., Huang, X.Z., Li, J.H., Deung, Y.K., and Lee, K.J. (2009). Essential involvement of cross-talk between IFN- γ and TNF- α in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J. Cell. Physiol.* *220*, 690–697.
- Radstake, T.R.D.J., Svenson, M., Eijsbouts, a M., van den Hoogen, F.H.J., Enevold, C., van Riel, P.L.C.M., and Bendtzen, K. (2009). Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 1739–1745.
- Ragnhammar, P., Friesen, H.J., Frödin, J.E., Lefvert, a K., Hassan, M., Osterborg, a, and Mellstedt, H. (1994). Induction of anti-recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Escherichia coli-derived) antibodies and clinical effects in nonimmunocompromised patients. *Blood* *84*, 4078–4087.
- Raker, V.K., Domogalla, M.P., and Steinbrink, K. (2015). Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front. Immunol.* *6*, 1–11.
- Raskin, P., Guthrie, R. a., Leiter, L., Riis, A., and Jovanovic, L. (2000). Use of insulin aspart, a fast-acting insulin analog, as the mealtime insulin in the management of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* *23*, 583–588.
- Reding, M.T. (2006). Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia* *12 Suppl 6*, 30–35; discussion 35–36.
- Reding, M.T., Lei, S., Lei, H., Green, D., Gill, J., and Conti-Fine, B.M. (2002). Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb. Haemost.* *88*, 568–575.
- Regnault, A.R., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., ThÇry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1999). Fc γ receptor-mediated induction of

- dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* *189*, 371–380.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 163–183.
- Repressé, Y., Peyron, I., Dimitrov, J.D., Dasgupta, S., Moshai, E.F., Costa, C., Borel-Derlon, A., Guillet, B., D’Oiron, R., Aouba, A., et al. (2013). Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the HMOX1 promoter. *Haematologica* *98*, 1650–1655.
- Rifkin, R. a., Maggio, E.T., Dike, S., Kerr, D. a., and Levy, M. (2011). N-Dodecyl-B-D-Maltoside Inhibits Aggregation of Human Interferon-B-1B and Reduces Its Immunogenicity. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *6*, 158–162.
- Rivas-Carvalho, A., Meraz-Ríos, M. a., Santos-Argumedo, L., Bajaña, S., Soldevila, G., Moreno-García, M.E., and Sánchez-Torres, C. (2004). CD16+ human monocyte-derived dendritic cells matured with different and unrelated stimuli promote similar allogeneic Th2 responses: Regulation by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int. Immunol.* *16*, 1251–1263.
- Robbins, D.C., and Mead, P.M. (1987). Free covalent aggregates of therapeutic insulin in blood of insulin-dependent diabetics. *Diabetes* *36*, 147–151.
- Robbins, D.C., Cooper, S.M., Fineberg, S.E., and Mead, P.M. (1987). Antibodies to covalent aggregates of insulin in blood of insulin-using diabetic patients. *Diabetes* *36*, 838–841.
- Roberts, C.J. (2014). Protein aggregation and its impact on product quality. *Curr. Opin. Biotechnol.* *30C*, 211–217.
- Romagnani, P., Maggi, L., Mazzinghi, B., Cosmi, L., Lasagni, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Angeli, R., Rotondi, M., Fili, L., et al. (2005). CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 1372–1379.
- Rombach-Riegraf, V., Karle, A.C., Wolf, B., Sordé, L., Koepke, S., Gottlieb, S., Krieg, J., Djidja, M.-C., Baban, A., Spindeldreher, S., et al. (2014). Aggregation of human recombinant monoclonal antibodies influences the capacity of dendritic cells to stimulate adaptive T-cell responses in vitro. *PLoS One* *9*, e86322.
- Rosenberg, A.S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* *8*, E501–E507.
- Rougeot, C., Marchand, P., Dray, F., Girard, F., Job, J.C., Pierson, M., Ponte, C., Rochiccioli, P., and Rappaport, R. (1991). Comparative study of biosynthetic human growth hormone immunogenicity in growth hormone deficient children. *Horm. Res.* *35*, 76–81.

Bibliographie

- Roy, S., Mason, B.D., Schöneich, C.S., Carpenter, J.F., Boone, T.C., and Kerwin, B.A. (2009). Light-induced aggregation of type I soluble tumor necrosis factor receptor. *J. Pharm. Sci.* *98*, 3182–3199.
- Ryff, J.C. (1997). Clinical investigation of the immunogenicity of interferon-alpha 2a. *J. Interferon Cytokine Res.* *17 Suppl 1*, S29–S33.
- Sabio, G., and Davis, R.J. (2014). TNF and MAP kinase signaling pathways. *Semin. Immunol.* *26*, 237–245.
- Said, A., and Weindl, G. (2015). Regulation of dendritic cell function in inflammation. *J. Immunol. Res.* *2015*, 1–28.
- De Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J.J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M.G., Banchereau, J., Zurawski, S., et al. (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* *9*, 325–336.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *J. Exp. Med.* *182*, 389–400.
- Saluja, A., and Kalonia, D.S. (2008). Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions. *Int. J. Pharm.* *358*, 1–15.
- Sasai, M., and Yamamoto, M. (2013). Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int. Rev. Immunol.* *32*, 116–133.
- Sato, K., and Fujita, S. (2007). Dendritic cells: nature and classification. *Allergol. Int.* *56*, 183–191.
- Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W., and Schellekens, H. (2010). Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* *31*, 53–59.
- Scanlon, K.M., Hawksworth, R.J., Lane, S.J., and Mahon, B.P. (2011). IL-17A induces CCL28, supporting the chemotaxis of IgE-secreting B cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *156*, 51–61.
- Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.* *289*, 35237–35245.
- Schellekens, H. (2002). Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 457–462.
- Schellekens, H., and Jiskoot, W. (2006). Erythropoietin-Associated PRCA: Still an Unsolved

Mystery. *J. Immunotoxicol.* 3, 123–130.

van Schouwenburg, P. a, Rispens, T., and Wolbink, G.J. (2013a). Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 164–172.

van Schouwenburg, P. a, van de Stadt, L. a, de Jong, R.N., van Buren, E.E.L., Kruithof, S., de Groot, E., Hart, M., van Ham, S.M., Rispens, T., Aarden, L., et al. (2013b). Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 104–109.

Van Schouwenburg, P. a., Krieckaert, C.L., Nurmohamed, M., Hart, M., Rispens, T., Aarden, L., Wouters, D., and Wolbink, G.J. (2012). IgG4 production against adalimumab during long term treatment of RA patients. *J. Clin. Immunol.* 32, 1000–1006.

Schreibelt, G., Tel, J., Sliepen, K.H.E.W.J., Benitez-Ribas, D., Figdor, C.G., Adema, G.J., and de Vries, I.J.M. (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1573–1582.

Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–S52.

Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K., and Morgan, A.C. (1985). Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy¹. *Cancer Res.* 45, 879–885.

Scott, D.W., Pratt, K.P., and Miao, C.H. (2013). Progress toward inducing immunologic tolerance to factor VIII. *Blood* 121, 4449–4456.

Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34, 440–445.

Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., and Kupper, T.S. (2012). Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36, 873–884.

Sethu, S., Govindappa, K., Alhaidari, M., Pirmohamed, M., Park, K., and Sathish, J. (2012). Immunogenicity to biologics: Mechanisms, prediction and reduction. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 60, 331–344.

Shaw, J., Wang, Y., Ito, T., Arima, K., and Liu, Y. (2010). Plasmacytoid dendritic cells regulate B-

cell growth and differentiation via CD70. *Blood* 115, 3051–3057.

Shen, Q., Zhang, R., and Bhat, N.R. (2006). MAP kinase regulation of IP10/CXCL10 chemokine gene expression in microglial cells. *Brain Res.* 1086, 9–16.

Shukla, A. a., Gupta, P., and Han, X. (2007). Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography. Case study for an Fc fusion protein. *J. Chromatogr. A* 1171, 22–28.

Smales, C.M., Pepper, D.S., and James, D.C. (2002). Protein modification during anti-viral heat-treatment bioprocessing of factor VIII concentrates, factor IX concentrates, and model proteins in the presence of sucrose. *Biotechnol. Bioeng.* 77, 37–48.

Smith, K.G.C., and Clatworthy, M.R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 328–343.

Smolen, J., Landewé, R.B., Mease, P., Brzezicki, J., Mason, D., Luijckens, K., van Vollenhoven, R.F., Kavanaugh, a, Schiff, M., Burmester, G.R., et al. (2009). Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 797–804.

Snapper, C.M., Peschel, C., and Paul, W.E. (1988). IFN-γ stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 140, 2121–2127. Immunology is online at : IFN-7 STIMULATES IgG2a SECRETION BY MURINE B CELLS STIMULATED WITH BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE.

Stein, M., Lang, S., Winkler, T., Deinzer, A., Erber, S., Nettelbeck, D., Naschberger, E., Jochmann, R., Stürzl, M., Slany, R., et al. (2013). Multiple Interferon Regulatory Factor and NF-κB Sites Cooperate in Mediating Cell-Type- and Maturation-Specific Activation of the Human CD83 Promoter in Dendritic Cells. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1331–1344.

Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 11, 155–161.

Strehl, R., Rombach-Riegraf, V., Diez, M., Egodage, K., Bluemel, M., Jeschke, M., and Koulov, A. V. (2012). Discrimination between silicone oil droplets and protein aggregates in biopharmaceuticals: A novel multiparametric image filter for sub-visible particles in microflow imaging analysis. *Pharm. Res.* 29, 594–602.

Szebeni, J. (2005). Complement activation-related pseudoallergy : A new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology* 216, 106–121.

Taflin, C., Charron, D., Glotz, D., and Mooney, N. (2012). Regulation of the CD4+ T cell allo-immune response by endothelial cells. *Hum. Immunol.* 73, 1269–1274.

- Taylor, P., Tamura, T., and Ozato, K. (2006). IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Res.* 16, 134–140.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tang, L., Persky, A.M., Hochhaus, G., and Meibohm, B. (2004). Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *J. Pharm. Sci.* 93, 2184–2204.
- Tel, J., Smits, E.L., Anguille, S., Joshi, R.N., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2012). Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* 120, 3936–3944.
- Telikepalli, S., Shinogle, H.E., Thapa, P.S., Kim, J.H., Deshpande, M., Jawa, V., Middaugh, C.R., Narhi, L.O., Joubert, M.K., and Volkin, D.B. (2015). Physical Characterization and In Vitro Biological Impact of Highly Aggregated Antibodies Separated into Size-Enriched Populations by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *J. Pharm. Sci.* 1–17.
- Thakrar K, Bodalia P, G.A. (2010). Assessing the efficacy and safety of Omnitrope. *Br J Clin Pharmacol* 2, 298–301.
- Tibbles, L.A., Spurrell, J.C.L., Bowen, G.P., Liu, Q., Lam, M., Zaiss, A.K., Robbins, S.M., Hollenberg, M.D., Wickham, T.J., and Muruve, D. a (2002). Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10. *J. Virol.* 76, 1559–1568.
- Tjota, M.Y., Hrusch, C.L., Blaine, K.M., Williams, J.W., Barrett, N. a, and Sperling, A.I. (2014). Signaling through Fc γ -associated receptors on dendritic cells drives IL-33-dependent TH2-type responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 706–713.e8.
- Tridandapani, S., Siefker, K., Teillaud, J., Carter, J.E., Wewers, M.D., and Anderson, C.L. (2002). Regulated Expression and Inhibitory Function of Fc γ RIIb in Human Monocytic Cells *. *J. Biol. Chem.* 277, 5082–5089.
- Uversky, V.N., Karnoup, a S., Khurana, R., Segel, D.J., Doniach, S., and Fink, a L. (1999). Association of partially-folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability. *Protein Sci.* 8, 161–173.
- Varrichi, G., Harker, J., Borriello, F., Marone, G., Hon, Durham, S., and Shamji, M. (2016). T Follicular Helper (T_{FH}) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Allergy*.
- Vazquez, M.I., Catalan-Dibene, J., and Zlotnik, A. (2015). B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 74, 318–326.

Bibliographie

- Vázquez-Rey, M., and Lang, D. a (2011). Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* *108*, 1494–1508.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* *9*, 1341–1346.
- Ventura, S., and Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* *24*, 179–185.
- Verhelst, D., Rossert, J., Casadevall, N., Krüger, A., Eckardt, K.U., and Macdougall, I.C. (2004). Treatment of erythropoietin-induced pure red cell aplasia: A retrospective study. *Lancet* *363*, 1768–1771.
- Veronese, F.M., and Mero, A. (2008). The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* *22*, 315–329.
- Villadangos, J. a., and Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* *29*, 352–361.
- Vincent, F.B., Morand, E.F., Murphy, K., Mackay, F., Mariette, X., and Marcelli, C. (2013). Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 165–178.
- van Vollenhoven, R.F., Emery, P., Bingham, C.O., Keystone, E.C., Fleischmann, R., Furst, D.E., Macey, K., Sweetser, M., Kelman, A., and Rao, R. (2010). Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J. Rheumatol.* *37*, 558–567.
- Vugmeyster, Y. (2012). Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World J. Biol. Chem.* *3*, 73.
- Vultaggio, a, Matucci, a, Nencini, F., Pratesi, S., Parronchi, P., Rossi, O., Romagnani, S., and Maggi, E. (2010). Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy* *65*, 657–661.
- Vultaggio, A., Matucci, A., Nencini, F., Pratesi, S., Petroni, G., Cammelli, D., Alterini, R., Rigacci, L., Romagnani, S., and Maggi, E. (2012). Drug-specific Th2 cells and IgE antibodies in a patient with anaphylaxis to rituximab. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *159*, 321–326.
- Wadhwa, M., Skog, a L., Bird, C., Ragnhammar, P., Lilljefors, M., Gaines-Das, R., Mellstedt, H., and Thorpe, R. (1999). Immunogenicity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) products in patients undergoing combination therapy with GM-CSF. *Clin Cancer Res* *5*, 1353–1361.

- Walsh, G. (2003). *Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnology*.
- Walsh, K.P., and Mills, K.H.G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* *34*, 521–530.
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* *185*, 129–188.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.* *289*, 1–30.
- Wang, J., Wang, X., Hussain, S., Zheng, Y., Sanjabi, S., Ouaz, F., and Beg, A.A. (2007). Distinct Roles of Different NF- κ B Subunits in Regulating Inflammatory and T Cell Stimulatory Gene Expression in Dendritic Cells. *J. Immunol.* *178*, 6777–6788.
- Wang, W., Nema, S., and Teagarden, D. (2010a). Protein aggregation--pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* *390*, 89–99.
- Wang, W., Ignatius, A.A., and Thakkar, S. V (2014). Impact of residual impurities and contaminants on protein stability. *J. Pharm. Sci.* *103*, 1315–1330.
- Wang, X., Singh, S.K., and Kumar, S. (2010b). Potential aggregation-prone regions in complementarity-determining regions of antibodies and their contribution towards antigen recognition: a computational analysis. *Pharm. Res.* *27*, 1512–1529.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* *15*, 98–108.
- Wells, J. a (1996). Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1–6.
- Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2003). Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *987*, 140–149.
- Whitmarsh, A.J. (2010). A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biol.* *8*, 47.
- Wu, H., Nie, Y., Huse, W.D., and Watkins, J.D. (1999). Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J. Mol. Biol.* *294*, 151–162.
- Yamane, H., and Paul, W.E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol. Rev.* *252*, 12–23.

Bibliographie

- Yang, Y., Dou, H., Li, X., Song, Y., Gong, W., Tan, R., and Hou, Y. (2014). FC-98 Regulates TLR9-Mediated of CXCL-10 Expression in Dendritic Cells via MAPK and STAT1 Signaling Pathway. *Biomed Res. Int.* *2014*, 1–10.
- Zani, I., Stephen, S., Mughal, N., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S., and Ponnambalam, S. (2015). Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells* *4*, 178–201.
- Zhang, Y.L., and Dong, C. (2005). MAP kinases in immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* *2*, 20–27.
- Zhang, A., Hu, P., Macgregor, P., Xue, Y., Fan, H., Suchecki, P., and Olszewski, L. (2014). Understanding the Conformational Impact of Chemical Modifications on Monoclonal Antibodies with Diverse Sequence Variation Using Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Structural Modeling. *Anal. Chem.*
- Zhang, J., Zhu, J., Bu, X., Cushion, M., Kinane, T., Avraham, H., and Koziel, H. (2004). Cdc42 and RhoB Activation Are Required for Mannose Receptor-mediated Phagocytosis by Human Alveolar Macrophages. *Mol. Biol. Cell* *16*, 824–834.
- Zhang, L., Lu, D., and Liu, Z. (2008). How native proteins aggregate in solution: a dynamic Monte Carlo simulation. *Biophys. Chem.* *133*, 71–80.
- Zhao, A., Hao, G., and Gu, J. (2013). Chemical crosslinking and mass spectrometric identification of interaction sites within soluble aggregate of protein therapeutics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *73*, 99–102.
- Zheng, J.Y., and Janis, L.J. (2006). Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *Int. J. Pharm.* *308*, 46–51.
- Zölls, S., Weinbuch, D., Wiggenhorn, M., Winter, G., Friess, W., Jiskoot, W., and Hawe, A. (2013). Flow Imaging Microscopy for Protein Particle Analysis-A Comparative Evaluation of Four Different Analytical Instruments. *AAPS J.* *15*, 1200–1211.
- Zou, J., and Shankar, N. (2015). Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B Signaling Pathways in the Regulation of Phagocytosis and Proinflammatory Cytokine Expression in Response to *E. faecalis* Infection. *PLoS One* *10*.
- Zwartkruis, F.J.T., and Burgering, B.M.T. (2013). Ras and macropinocytosis: trick and treat. *Cell Res.* *23*, 982–983.

Annexes

Annexe 1: Effet des agrégats d'Infliximab de Shear Stress sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines

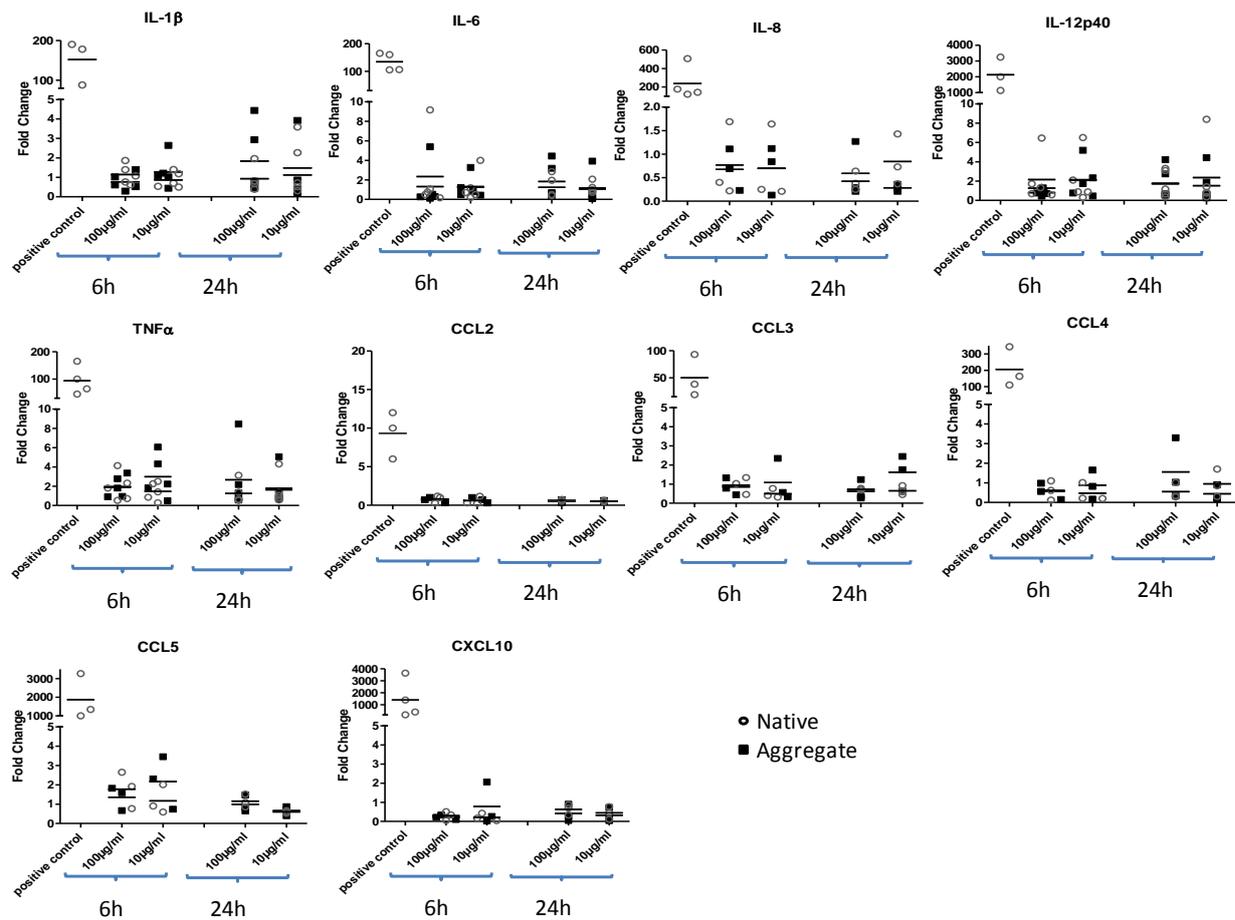


Figure 33: Effet des agrégats d'Infliximab (Shear Stress L2) sur l'expression des transcrits de cytokines et chimiokines après 6h ou 24h de stimulation.

Les résultats sont exprimés en index de stimulation par rapport aux cellules non stimulées. Le contrôle positif est réalisé en stimulant les moDC par le LPS à 25 ng/mL . n=4 * = p<0,05, test de Mann-Whitney

Annexe 2: Protein kinase CK2 controls T cell polarization through dendritic cells activation in response to contact sensitizers

Marie de Bourayne, **Yann Gallais**, Zeina El Ali, Philippe Rousseau, Marie-Hélène Damiens, Claude Cochet, Odile Filhol, Sylvie Chollet-Martin, Marc Pallardy, Saadia Kerdine-Römer

En révision : **Journal of Leukocyte Biology**

Title: Protein kinase CK2 controls T cell polarization through dendritic cells activation in response to contact sensitizers

Marie de Bourayne*, Yann Gallais*, Zeina El Ali†, Philippe Rousseau‡, Marie-Hélène Damiens*, Claude Cochet§, Odile Filhol§, Sylvie Chollet-Martin*, Marc Pallardy*, Saadia Kerdine-Römer*

*Universud, INSERM UMR-S 996 'Inflammation, Chemokines and Immunopathology', Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France

† Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Faculté de Médecine, Université Paris-Est, Créteil – France & UPEC, IMRB, INSERM UMR-S 955, Team 12, Créteil, France

‡Bloomfield Center for Research in Aging, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montréal, Québec H3T 1E2, Canada

§INSERM UMR 1036, Cancer and Infection Biology, iRTSV, CEA Grenoble, F-38054, France.

Short title: CK2, a key kinase in DCs activation in response to contact sensitizers

Corresponding author: Prof. Saadia Kerdine-Römer, INSERM UMR-996; Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Châtenay-Malabry

Tel: 00 33 (0) 1 4683 5779, Fax: 00 33 (0) 1 4683 5496

E-mail: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr

Keywords: Dendritic Cells, CK2, Th1/Th2/Th17 cells, Allergy, Cytokines

Abstract

Allergic contact dermatitis (ACD) represents a severe health problem with increasing worldwide prevalence. It is a T cell-mediated inflammatory skin disease caused by chemicals present in daily or professional environment. Nickel sulfate (NiSO_4) and 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) are two chemicals involved in ACD. These contact sensitizers are known to induce an up-regulation of phenotypic markers and cytokine secretion in dendritic cells (DCs), professional antigen-presenting cells, leading to the generation of CD8^+ Tc1/Tc17 and CD4^+ Th1/Th17 effector T cells.

In the present study, using a peptide array approach, we identify protein kinase CK2 as a new kinase involved in the activation of human monocytes-derived DCs (MoDCs) in response to NiSO_4 and DNCB. Inhibition of CK2 activity in MoDCs leads to an altered mature phenotype with lower expression of CD54, PDL-1, CD86 and CD40 in response to NiSO_4 or DNCB. We also show that CK2 activity regulates pro-inflammatory cytokine production such as $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-23 in MoDC. Moreover, using a DC/T cell co-culture model in an allogeneic set-up, our work demonstrate that CK2 activity in MoDCs plays a major role in the Th1 polarization in response to NiSO_4 and DNCB. Interestingly, we also demonstrate that CK2 inhibition in MoDCs leads to an enhanced Th2 polarization in the absence of contact sensitizer stimulation.

Introduction

Allergic Contact dermatitis (ACD) is a T-cell mediated inflammatory skin disease caused by type IV delayed hypersensitivity responses to contact allergens (1). Contact allergens are chemically reactive haptens (molecular weight < 500 Da). During skin penetration, they bind to self-proteins to generate immunogenic neo-antigens (2). DCs are the major players of the sensitization phase, the first phase of ACD. This phase is clinically unapparent and occurs at the first contact of skin with the chemical sensitizer and leads to the generation of hapten-specific T cells (3). DCs capture the hapten-self-protein complex, migrate through the lymphatic vessels and present the hapten-protein complex to naive T cells in the draining lymph node to generate CD8⁺ Tc1/Tc17 and CD4⁺ Th1/Th17 effector T cells which enter the blood circulation (3, 4). The second phase of ACD, termed elicitation phase, occurs upon re-exposure of sensitized individuals with the same hapten and is clinically apparent. Specific T lymphocytes are activated in the dermis and the epidermis, and trigger the inflammatory process responsible for the cutaneous lesions (3).

More than 3000 contact allergens have been identified. Nickel, present in jewellery, piercing, coins and smartphone, is a metallic hapten ranked as the number one allergen in term of frequency of positive patch test reactions (5). 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) is used as a reactive intermediate during the manufacture of fungicide, dyes or elastomer. DNCB is used to study the mechanisms of contact sensitivity because it is able to induce ACD in all immunocompetent humans (6). Moreover, DNCB is still the reference product in regulatory tests to measure the potency of sensitization.

Previously, using human *in vitro* DC models, we and others have demonstrated that chemical sensitizers like NiSO₄ induced phenotypic modifications with HLA-DR, CD86, CD40, CD83

and CCR7 up-regulation and secretion of inflammatory cytokines such as IL-8 and TNF α (7–10). Signalling pathways such as Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) have been reported to be involved in DC maturation in response to contact sensitizers (8, 9, 11, 12). Thus, inhibition of p38 MAPK, c-Jun N-Terminal Kinase (JNK), and Extracellular Regulated Kinase (ERK) abrogate the NiSO₄-induced up-regulation of CD86, CD83, and CCR7 expression. Otherwise, it was demonstrated that p38 MAPK, NF- κ B, and Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) were involved in IL-12p40 production induced by NiSO₄ (13). In response to DNCB, p38 MAPK controls the expression of HLA-DR, CD86, CD83 and the production of IL-8 by DCs (9). Moreover, p38 MAPK and JNK control TNF- α release in DNCB-stimulated DCs (7).

The hypothesis that chemical sensitizers can be perceived as a danger signal by DCs has been also proposed based on signaling pathways identified upon chemical sensitizer treatment and also known to be triggered by danger signals such as toll-like receptor agonists (7, 8, 12). Signaling pathways such as MAPKs and NF- κ B are known to be redox sensitive, and oxidative stress induced by chemical sensitizers has been shown to participate in the DC-maturation process (for review, see (14)). However, very little is known concerning upstream signals and therefore pathways that could be involved in MAPK and NF- κ B activation. To this extend, we performed a peptide array to find these original pathways implicated in the biological response of DCs to contact sensitizers. Results from this peptide array has highlighted the activation of protein kinase CK2 (formerly casein kinase 2), a multifunctional and pleiotropic protein, ubiquitous and constitutively active. CK2 is a multisubunit protein kinase exhibiting a quaternary structure composed of two catalytic subunits, CK2 α and CK2 α' , and two regulatory subunits CK2 β . As a signalling protein, CK2 is a promiscuous

kinase having many cellular functions associated with a wide repertoire of substrates. Indeed, CK2 has been found to regulate key transcription factors implicated in inflammation and cytokine signalling like NF- κ B and Activator Protein-1 (AP-1) (15).

To investigate the role of CK2 in DCs activation in response to contact sensitizers, we used a highly specific pharmacological inhibitor of CK2, CX-4945. In DCs differentiated from human monocytes (MoDCs), we showed that CK2 plays (1) a role in phenotypic maturation and cytokine production in response to NiSO₄ and DNCB, and (2) a major role in CD4⁺ T lymphocytes activation and in the control of Th1 polarization without affecting Th17 polarization.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Materials and methods

Generation of dendritic cells derived from human monocytes (MoDCs)

The generation of human MoDCs has been performed as previously described (13). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are isolated from whole blood of healthy donors obtained from Etablissement Français du Sang (EFS, Rennes, France) by density centrifugation with Ficoll–gradient (lymphocyte separation medium LSM 1077; PAA, Les Mureaux, France). Monocytes are further isolated from the mononuclear fraction through magnetic positive selection using MiniMacs separation columns (Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads following manufacturer's instructions (Direct CD14 isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany). These CD14⁺ cells are confirmed to have purity greater than 95%, based on CD14 expression (555398, BD Biosciences) evaluated by flow cytometry (FacsCalibur, BD Biosciences). Monocytes are cultured at 1×10^6 cells/ml in the presence of GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) (both from Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) in RPMI 1640 medium with Glutamax, 25 mM HEPES (Gibco Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum (Biowest, Paris, France), 1% sodium pyruvate (Gibco Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Gibco Invitrogen) [RPMIc]. Resulting Mo-DCs are DC-SIGN^{high}, CD1a^{high}, CD86^{low} and CD83^{low} as evaluated by flow cytometry (FacsCalibur, BD Biosciences).

Chemical treatment

MoDCs are washed twice and then incubated at 1×10^6 cells/ml. Cells are then treated with 2,4-dinitrochlorobenzene [DNCB (10 μ M), Sigma[®], Saint Louis, USA] or nickel sulfate [NiSO₄ (500 μ M), Sigma[®], Saint Louis, USA] for different period of time according to the

experiments. DNCB is dissolved in DMSO at 0.1% as a final concentration in complete medium whereas NiSO₄ is dissolved in saline. Inhibition of CK2 activity is performed using the pharmacological inhibitor CX-4945 (5 μM, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

Phosphokinome analysis of NiSO₄- and DNCB-stimulated MoDCs

Human MoDCs from 10 healthy donors has been selected for their response to NiSO₄ and DNCB: CD83 and CD86 up-regulation at 24 h by flow cytometry analysis (described below) and activation of phospho-p38 at 30 min evaluated by Western blot.

Immature Mo-DCs (1x10⁶ cells/donor/chemical) are treated with vehicle (DMSO or saline), NiSO₄ (500 μM) or DNCB (10 μM) for 30 min and 60 min in culture conditions (37°C, 5% CO₂) and are collected on ice, washed with PBS and resuspended in 25 μL cold lysis buffer triton 1% (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% triton X-100, 2.5 mM Na₄P₂O₄, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₃, 1 mM NaF, supplemented with Complete[®] (Roche) protease inhibitor cocktail). Cell lysates are pooled by treatment (molecule/time), cleaned by centrifugation, diluted in buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂ supplemented with Complete[®] protease inhibitor cocktail (Roche) and cleaned a second time as above. 80 μL of supernatant are mixed with 10 μL of Activation Mix [20 μCi of γ³³P-ATP (GE-Amersham)], 50 % glycerol, 5 mM DTT, 50 mM MgCl₂, 50 mM MnCl₂, 250 μg/mL PEG 8000, 250 μg/mL BSA), cleared by an additional centrifugation, loaded on one PepChip Kinomics Array (Pepscan Presto, NL) per sample and incubated for 2 h at 37°C in a humidified chamber. Arrays are washed four times alternatively with 2 M NaCl 1% Triton X-100 solution and PBS 1X 1% Triton X-100 solution, rinsed three times with distilled water, air dried and exposed on phosphor storage screen (GE-Amersham). It is then scanned with a resolution of 50 microns/pixel on a Storm Imager (GE-

Amersham) and array scans are quantified using in-house developed quantification software in a MatLab environment (Pepscan Presto, NL). Arrays contain 1024 peptides (48 controls, 976 experimental representing redundant phosphorylable motifs identified in the human genome), each in triplicate on an array. One array per sample results in a maximum of 3 data points per peptide. Background is subtracted for all individual spots. Spots are corrected for local minima and maxima on the array and flagged for a number of artefacts. Spots are subsequently filtered using the Kolmogorov-Smirnov statistic at a cut-off of $p=0.001$, to exclude spots with a value distribution that cannot be distinguished from the background, and a minimum of 2 values per peptide. As a threshold for significance only ratios corresponding to mean differing $2.0 \times$ (standard error mean 1 + standard error mean 2) are considered.

Treatment of MoDCs

On day 6, immature MoDCs are harvested and washed in RPMIc. MoDCs are then pretreated with the specific pharmacological inhibitor of CK2, CX-4945 (5 μM , sc-364475, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After one hour of incubation at 37°C , MoDCs are treated or not with NiSO_4 (500 μM), or DNCB (10 μM). The stimulation time at 37°C ranges from 30 min to 24 h depending on the experiment.

CK2 activity assay in MoDCs

The measurement of CK2 activity has been performed as previously described (16). Briefly, reaction is started by addition of the sample lysate (3 μl) to the reaction mixture (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 30 μM ATP, 45 μM of the synthetic peptide RRREDEESDDEE, and 1 μCi of (γ - ^{32}P) ATP/reaction in a final volume of 20 μl). Reaction is performed for 5 min at room temperature and stopped with 60 μl of 4% cold trichloroacetic acid. After centrifugation of the reaction mixture, the supernatant is spotted on

phosphocellulose paper squares. After three successive 15 min washes in cold phosphoric acid (0.5%), the radioactivity on phosphocellulose paper is counted in scintillation liquid. Results are expressed either as total activity (cpm) or as specific activity (cpm/ μ g protein/min reaction). Protein concentration is determined using the MicroBCA technique (Sigma, Saint Louis, USA).

Functional analysis of MoDC endocytosis: internalization of Dextran-FITC

The endocytic capacity of the cells has been analyzed by the measure of dextran-FITC uptake, a probe for Mannose Receptor-mediated endocytosis. MoDCs are pre-treated for 1 h at 37°C with DMSO or CX-4945 (5 μ M), washed and resuspended in RPMIc at 2×10^6 cells/ml. 100 μ l of the cell suspension are incubated for 1 min at 37°C (or at 4°C for controls) before the addition of 100 μ l of 1 mg/ml dextran-FITC (Molecular weight 40 kDa, Molecular probes Life technologies, Saint Aubin, France) solution for different times. At 15 min, 30 min, 1 h or 2 h, the reaction is stopped by adding 4 ml of cold PBS then cells are washed four times with cold PBS. The uptake of dextran-FITC is analyzed by flow cytometry using a FACsCalibur.

Flow cytometric analysis of MoDC maturation

After 24 h of treatment with DMSO or CX-4945 and/or chemical sensitizers (NiSO₄ or DNCB) the MoDCs phenotype is analyzed by flow cytometry. The labeling procedure is performed as follows: 2×10^5 cells/ml cells are washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.5% of bovine serum albumin (BSA) and stained with monoclonal antibodies (mAbs) in the dark on ice for 20 min. After washing with cold PBS, cells are fixed in 1% paraformaldehyde diluted in PBS. The following mAbs have been used: FITC-labeled mouse anti-human CD86 (2331, [FUN-1], BD Biosciences), anti-human CD40 (5C3, BD Biosciences) and anti-human PDL-1 (CD274) (MIH1, BD Biosciences); allophycocyanin

(APC)-conjugated mouse anti-human CD83 (HB15e, BD Biosciences), anti-human CD54 (HA58, BD Biosciences) and anti-human HLA-DR (G46-6, BD Biosciences). Appropriate isotype controls (mouse IgG1 κ , BD Biosciences) have been used at the same concentration to determine nonspecific staining. A minimum of 10 000 cells were analyzed on a FACSCalibur[®] cell analyzer using CellQuest[®] software (Becton Dickinson). Living cells were identified on the basis of their physical characteristics [forward scatter (FSC) and side scatter (SSC)]. Results are expressed as the relative fluorescence intensity (RFI), using the corrected mean fluorescence intensity (cMFI), as follows: cMFI = MFI of cells / MFI of isotype control; RFI = cMFI of treated cells / cMFI of untreated cells.

Quantitative real-time RT-PCR assay of cytokines in MoDCs

Total RNA is extracted after lysis of 6h treated MoDCs (10⁶ cells/ml) in RNA-PLUS reagent (MP Biomedicals, California, USA). Total RNA pellets are resuspended in RNase-free water and quantified by spectrophotometry. First-strand cDNA is synthesized from total RNA by using a Biometra thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). The reaction uses 1 μ g of total RNA, a deoxynucleotide triphosphate mixture (containing 25 mM deoxy-adenosine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, deoxy-cytidine triphosphate, and deoxy-thymidine triphosphate) and 50 μ M oligo (dT) primers (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Reverse transcription is carried out in 1x AMV reverse transcriptase reaction buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with RNase inhibitor (RNasine, Promega) at 40 U/ μ l, AMV reverse transcriptase (Promega) at 10 U/ μ l, and RNase-free water to a final volume of 10 μ l. A control without reverse transcriptase is used to confirm the absence of DNA contamination. Real-time PCR was performed using the SYBR Green technology on a Biorad CFX96 system. Each reaction mix consists of 1:50 diluted cDNA in 4 μ l final of nuclease-free water, 0.5 μ M each forward (fwd) and reverse (rev) primer for *irf-1*, *irf-4*, *irf-8*,

gapdh, *β-actin*, and Sso Advanced Supermix (Biorad, Marne-la-Coquette, France) in a total reaction volume of 10 μl. The following specific primers are used (forward and reverse, respectively): *irf-1*: 5'-ACC CTG GCT AGA GAT GCA GA-3' and 5'-TTT TCC CCT GCT TGT ATC G-3'; *irf-4*: 5'-AGC ATC TTC CGC ATC CCC-3' and 5'-CAT CTG CGG GTC CTC CAA-3'; *irf-8*: 5'-GAC AGT GGC TGA TCG AGC AG-3' and 5'-CTT CCA AGT GGC TGG TTC AGC-3'; *gapdh*: 5'-CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA-3' and 5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3'; *β-actin*: 5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3' and 5'-GCA CAC GCA GCT CAT TGT AG-3'.

After 30 s at 95°C for Sso7dfusion polymerase activation, amplification is allowed to proceed for 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 62°C for 5 s. Eightfold serial dilutions of mixed cDNA (from different samples) are analyzed for each target gene, allowing us to construct linear standard curves from which the efficiency (E) of each PCR run is evaluated. SYBR green fluorescence is detected at the end of each elongation cycle, after which a melting curve was constructed to confirm the specificity of the PCR products. Quantification is performed with Biorad CFX Manager Software, and data are analyzed with the delta-delta Ct method ($\Delta\Delta Ct$). Ratios are calculated as the geometrical mean of $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ values, where E is the efficiency and $\Delta\Delta Ct$ is the target gene expression of treated cells compared to normal levels in untreated cells, with correction for the expression of the reference genes *β-actin* and *GAPDH*. Results are expressed as the fold factor increase (i.e. ratio of $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of treated cells / $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of untreated cells).

MoDC/T-cell co-culture

The capacity of MoDCs to activate CD4⁺ T cells has been evaluated by the use of allogeneic T CD4⁺ lymphocytes labelled with 0.5 μM CFSE following the manufacturer's instructions.

CD4⁺ T cells are isolated from PBMCs by positive selection with the MACS CD4 isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). These T cells are confirmed to have purity greater than 95%, based on CD4 (555349, BD Biosciences) expression evaluated by flow cytometry.

MoDCs are pre-treated or not with CX-4945 (5 μ M) and then stimulated with NiSO₄ or DNCB for 24 h. Treated MoDCs are washed and then cultured with allogeneic CD4⁺ T cells at a 1:10 DC/T-cell ratio for 5 days in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% AB human serum, in round bottom 96-well plates. On day 5, CD4⁺ T cells proliferation is analyzed by flow cytometry and expressed as the percentage of CFSE^{low} cells present in the sample. Supernatants are then analyzed for cytokine release as described below.

Cytokine quantification in MoDCs and MoDC/T cell culture supernatants

The supernatants of 24h-cultured MoDCs have been assayed for IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-23 and MIP-1 β productions using Meso Scale Discovery (MSD, USA) multiplex assay (Human pro-inflammatory Panel-1, Prototype Human IL-23 and Chemokine Panel-1 kits).

Supernatants of MoDC-CD4⁺ T cell co-cultures have also been analyzed for their cytokine production. IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-10 and IL-17 (Human pro-inflammatory Panel-1 and V-PLEX Custom Human Cytokine Panel-1 kits) have been quantified using Meso Scale Discovery (MSD, USA) multiplex assay.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Differences between groups were evaluated with the Mann–Whitney U test (Prism software, GraphPad, La Jolla, CA). *p* values below 0.05 were considered as significant.

Results

Phosphokinome array

MoDCs from donors exhibiting at least a 1.5 fold increase of CD86 and phosphorylation of p38 MAPK at 30 and 60 min in response to chemical sensitizers have been analysed. As many upstream kinases are activated in response to the chemicals, only the top five of up-regulated kinases are presented for each time and each chemical (Fig. 1).

We show that DNCB and NiSO₄ activate different kinase profiles important for DCs biological process (Fig. 1). We find that two of these kinases are highly activated by both chemicals at both times (30 min and 60 min): ERK and CK2 subunits α or α' . Furthermore, CDC2, PKC, JNK, DNA-PKC and Fyn are also highly activated but have already been described as key players in DCs activation and function such as ERK (17–21). Among all these kinases, only CK2 was a new kinase that has not been described to play a role in DC biology to date. Thus, we have chosen to evaluate the role of CK2 in NiSO₄- and DNCB-stimulated MoDCs.

Inhibition of CK2 activity by CX-4945 does not modulate the uptake of dextran-FITC by MoDCs.

To address the role of CK2, we have used a specific pharmacological inhibitor of CK2, CX-4945. CX-4945 is a potent small inhibitor of CK2 displaying an excellent kinase selectivity profile (22) and inhibits drastically CK2 activity at 5 μ M without cytotoxicity in MoDCs (supplementary *data*).

DCs have three main functions: endocytosis, migration and antigen presentation to T lymphocytes. First, we have examined whether the inhibition of CK2 activity by CX-4945 impairs endocytic capacity, analyzed by dextran-FITC uptake by immature MoDCs. Cells are

thus pretreated or not with CX-4945 for 1h, washed and incubated with dextran-FITC solution at 37°C for different times (Fig. 2). MoDCs endocytic capacity is identical in presence or in absence of CX-4945. As negative control, similar experiments are performed at 4°C, in which the uptake of dextran-FITC by MoDCs is inhibited. These data indicate that CK2 does not control endocytic activity in MoDCs.

Inhibition of CK2 activity downregulates the expression of key surface markers for MoDCs maturation.

Since MoDCs activated by contact sensitizers have been shown to acquire a mature phenotype, we have evaluated the role of CK2 in the acquisition of a mature phenotype in response to NiSO₄ or DNCB. After incubation with CX-4945 for 1h, MoDCs are stimulated for 24h with NiSO₄ or DNCB and the expression of several MoDC maturation markers is quantified by flow cytometry. As previously described, NiSO₄ and DNCB induce MoDCs maturation (8, 9, 23), as shown by the increased expression of CD86, CD83, CD40, PDL-1 and MHC II (Fig. 3A and 3B). Contrary to NiSO₄, DNCB does not increase CD54 expression in our hands.

Pretreatment of MoDCs with CX-4945 significantly decreases NiSO₄-induced upregulation of CD86, PDL-1 and CD54 expression, with the following percentage reductions: CD86: 44 ± 7%, PDL-1: 60 ± 8% and CD54: 36 ± 7%. Only a slight decrease is observed for CD83 and CD40 (Fig. 3A). Pretreatment of DNCB-stimulated MoDCs with CX-4945 significantly decreases PDL-1, CD54 and CD40 expression, with the following percentage reductions: PDL-1: 38 ± 8%, CD54: 57 ± 10%, CD40: 40 ± 8% (Fig. 3B).

In control cells, CK2 does not modulate the expression of the studied markers CD86, CD83, PDL-1, CD54 and CD40 but negatively controls basal MHC II expression. Indeed, control

cells pretreated with CX-4945 exhibit a significant increase of MHC II expression (Fig. 3A and 3B).

These results show that CK2 controls PDL-1 and CD54 expression in response to DNCB and NiSO₄, while CK2 controls CD86 expression in response to NiSO₄ and CD40 in response to DNCB.

Taken together, these *data* demonstrate that the inhibition of CK2 activity prevents full MoDCs phenotypic maturation in response to DNCB and NiSO₄.

Inhibition of CK2 activity modulates cytokine production by MoDCs.

Then, we have quantified cytokine production in MoDCs' supernatants using a MSD Multiplex assay. Cytokines are measured 24h after NiSO₄- or DNCB-stimulation of MoDCs, pretreated or not with CX-4945. Both NiSO₄ and DNCB stimulation induce the production of pro-inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- α , and chemokines CCL-4 and CXCL-8 in MoDCs. Only NiSO₄ induces a relevant production of IL-1 β and IL-23 (Fig. 4A and 4B). In response to NiSO₄, inhibition of CK2 activity has no effect on CXCL-8 production, whereas IL-1 β and IL-23 productions are up-regulated compared to NiSO₄-stimulated MoDCs (Fig. 4A). Moreover, CX-4945 pretreatment leads to a decrease of IL-6, TNF- α and CCL-4 production in NiSO₄-stimulated MoDCs. In response to DNCB, CXCL-8 is down-regulated in MoDCs pretreated with CX-4945 (Fig. 4B). However, TNF- α production is increased in absence of CK2 activity in DNCB-stimulated MoDCs.

Taken together, these results evidence that CK2 plays a role in the production of several pro-inflammatory cytokines by MoDCs in response to NiSO₄ and DNCB.

Inhibition of CK2 activity impairs the capacity of DNCB and NiSO₄-treated MoDCs to activate CD4⁺ T lymphocyte proliferation.

Since we show that CK2 is involved in MoDCs mature phenotype acquisition and cytokine production, we have then studied the capacity of CX-4945-pretreated MoDCs to activate CD4⁺ T lymphocytes. Although NiSO₄ and DNCB are known to trigger contact hypersensitivity mainly through CD8⁺ cytotoxic effector T lymphocytes in mice (3), the question is to evaluate the importance of the CK2 activity in the functional capacity of human DCs to activate CD4⁺ T lymphocytes, a key step to initiate a full immune response (24).

NiSO₄- or DNCB- stimulated MoDCs pretreated or not with CX-4945 are co-incubated with allogeneic CD4⁺ T lymphocytes loaded with CFSE. Proliferation is evaluated on day 6 as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T cells. In the absence of DC treatment with NiSO₄ or DNCB, less than 30% of CD4⁺ T cells are CFSE^{low}. Pretreatment of MoDC with CX-4945 has no effect on CD4⁺ T cell proliferation in the absence of NiSO₄ or DNCB stimulation (Fig. 5A and 5B). NiSO₄- or DNCB- stimulated MoDCs augment the proliferation of CD4⁺ T lymphocytes with 49 ± 5% and 41 ± 3% of CFSE^{low} cells respectively. The proliferation of CD4⁺ T lymphocytes co-cultured with MoDCs pretreated with CX-4945 and then stimulated with NiSO₄ tends to be decreased (38 ± 5 % of CFSE^{low} cells) (Fig. 5A). However, T-cell proliferation is significantly decreased when MoDCs are pretreated with CX-4945 and then stimulated with DNCB (23 ± 2 % of CFSE^{low} cells) (Fig. 5B).

Collectively, these findings reveal that CK2 activity is involved in the capacity of NiSO₄- or DNCB- stimulated MoDCs to augment CD4⁺ T cell proliferation.

Inhibition of CK2 affects CD4⁺ T cell polarization induced by DNCB- and NiSO₄-activated MoDCs

CK2 appears to have an important role in MoDCs ability to activate CD4⁺ T lymphocyte proliferation and to modulate key cytokine production known to be involved in T cell polarization. We thus address its role in T cell polarization. MoDCs are incubated for 24 h with or without DNCB or NiSO₄ in presence or in absence of CX-4945, and then co-cultured with allogeneic CD4⁺ T lymphocytes. Cytokine production of activated T lymphocytes is evaluated 5 days later by quantifying cytokines in cell culture supernatants using a MSD Multiplex assay (Fig. 6). Since a high variability between donors is observed, results are expressed as fold increase compared to control DMSO or medium. As expected, NiSO₄- or DNCB-stimulated MoDCs augment the secretion of IFN γ by T cells, whereas IL-17 is only produced in the presence of NiSO₄-stimulated DCs. In absence of CK2 activity in DCs, secretion of IFN γ by T cells is downregulated in response to MoDC treated with either chemical (Fig. 6A and 6B). However, IL-17 production is maintained in the absence of CK2 activity, in response to MoDC treated with NiSO₄ (Fig. 6A). These results suggest that CK2 in DCs controls Th1 polarization by controlling T cells IFN γ secretion in response to both NiSO₄ and DNCB.

For Th2 cytokines, IL-5 and IL-13, inhibition of CK2 augments the level of these cytokines in conditions where MoDCs are not treated with either NiSO₄ or DNCB. These results suggest that CK2 activity could negatively regulate IL-5 and IL-13 expressions upon T-cell activation. However, in the absence of CK2 activity, cytokine levels are comparable to the one observed without the CK2 inhibition.

Inhibition of CK2 activity modulates mRNA expression of IRFs, key transcription factors in DCs and involved in T cell polarization.

Since the initiation of (Th1/Th17)/Th2 response is dependent on the expression of members of the ‘Interferon Regulatory Factors’ (IRFs) family in DCs, we have analysed by RT-qPCR the expression in MoDCs of the main IRFs described in T cell polarization: *irf-1*, *irf-4* and *irf-8*.

NiSO₄ stimulation induces the up-regulation of *irf-1*, *irf-8* and *irf-4* mRNA expression (Fig. 7A) whereas CX-4945 pretreatment of MoDCs before NiSO₄-stimulation leads to a strong downregulation of all the tested IRF mRNA expression. DNCB stimulation induces mRNA expression of *irf-1*, downregulates mRNA expression of *irf-4* and does not modulate *irf-8* mRNA (Fig. 7B). Loss of CK2 activity with CX-4945 pretreatment before DNCB stimulation leads to a significant decrease of *irf-1* mRNA expression. Interestingly, *irf-4* mRNA in MoDC expression is significantly increased in the absence of CK2 activity without chemical stimulation (Fig 7A and 7B).

DNCB and NiSO₄ induce the expressions of *irf* mRNA in a different manner. However, the three IRF (*irf-1*, *irf-4* and *irf-8*) induced in response to NiSO₄ and *irf-1* induced by DNCB-stimulation are regulated by CK2.

Discussion

Allergic contact dermatitis is a T-cell inflammatory disease wherein DCs play a crucial role. Chemical sensitizers like NiSO₄ and DNCB have been demonstrated to induce the expression of markers related to DCs maturation and function and the production of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, these chemicals induce the phosphorylation of MAPK family proteins and the activation of the NF- κ B pathway, mimicking the effects of danger signals and leading to the acquisition of a mature phenotype by DCs (7–9, 11–13).

Using a peptide array approach, we identify a new kinase protein kinase CK2 (formerly casein kinase 2), playing a role in the acquisition of a mature phenotype in DCs in response to DNCB and NiSO₄, two well-known contact sensitizers. CK2 has been described to participate in the activation of several major signalling pathways as Ras-Raf-MEK-ERK, p38 MAPK, PKC, and PI3 kinase-Akt, and to phosphorylate different MAPK's effectors (25). In this work, we have studied the role of CK2 in DC activation in response to contact sensitizers.

We find that CK2 controls both phenotypic and functional maturation of DC in response to NiSO₄ and DNCB. Our data are the first demonstrating such a role for CK2 in DCs. The inhibition of CK2 prevents NiSO₄-induced PDL-1, CD54 and CD86 up-regulation and prevents DNCB-induced PDL-1 and CD54 up-regulation. The significant up-regulation of phenotypic markers in DCs in response to NiSO₄ and DNCB are in agreement with other data from the literature (26, 27). Furthermore, CK2 inhibition in NiSO₄-stimulated MoDC reduces the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , but leads to an up-regulation of IL-23 and IL-1 β , cytokines involved in the Th17 response (31). Related to DNCB, the absence of CK2 activity reduces the production of the pro-inflammatory cytokine CXCL-8, but augments TNF- α production.

The main function of mature DCs is antigen-presentation and activation of antigen-specific T cells, leading to their proliferation and the production of cytokines essential for T cell polarization (28). In our study, we demonstrate that NiSO₄- or DNCB-stimulated MoDCs increase the proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells. In the absence of CK2 activity, the altered mature phenotype of NiSO₄-stimulated MoDCs does not affect T CD4⁺ lymphocyte proliferation, while DNCB-stimulated MoDCs are not able to maintain T lymphocyte proliferation.

NiSO₄-stimulated MoDC produce IL-17, already described *in vivo* and *in vitro* by other groups (26, 29). In response to contact allergens, *in vitro*, DCs preferentially secrete cytokines that polarize the T cell response towards Tc1/Th1 and Tc17/Th17 effector T cells (30). In ACD caused by nickel, there is a massive cellular infiltration dominated by CD4⁺ T cells producing IL-17 and IFN- γ in nickel-challenged skin (29). Pickard *et al.* (2007) also showed that DNCB leads to Th1 and Tc1 responses in human exposed to this chemical (24). In our hands, the absence of CK2 activity leads to an alteration of the cytokine profile secreted by T lymphocytes: we observe a decrease in IFN γ production in response to both chemicals whereas IL-17 production is maintained in response to NiSO₄. In the absence of CK2 activity in NiSO₄-stimulated MoDC, IL-23 and IL-1 β could promote Th17 polarization *versus* Th1/Th17 in the absence of CK2 activity. These data support that CK2 activity in DCs drives T cell polarization by preferentially inducing a Th1 response in response to contact sensitizers without modulating Th17 polarization.

The absence of CK2 in unstimulated DCs leads to a spontaneous Th2 polarization by increasing IL-5 and IL-13 production, whereas no effect is observed on allogeneic T CD4⁺ cell proliferation. These results suggest that the absence of CK2 activity in MoDC could lead to a DC phenotype prone to Th2 polarization. Moreover, CK2 activity could be a major regulator of Th2 polarization as Ulges *et al.* who demonstrated that CK2 allows regulatory T

cells (Treg) to suppress excessive Th2 response *in vivo* (31). However, the signal provided by chemical stimulation inhibits the Th2 response induced in the absence of CK2 activity.

The Interferon Regulatory Factors (IRFs) family can directly alter the transcription of cytokine genes by Th cells, and the IRF family controls many aspects of DC biology (32). IRFs govern the development of various DC subsets, promote and modulate DC maturation (33). The main IRF transcription factors involved in T cells polarization are IRF-1, IRF-4 and IRF-8. IRF-1 and IRF-8 are involved in IL-12 synthesis and drive Th1/ Th17 response (32, 34) whereas IRF-4 controls Th2 response (35, 36). In the present work, *irf-1* mRNA is induced in response to both chemicals while *irf-4* and *irf-8* mRNAs are only induced in response to NiSO₄. As already described in another study (34), IRF8 could induce Th1 and Th17 polarization through the production of IL-12 and IL-23 in our model. We find that DC stimulated with NiSO₄ are IRF1⁺⁺IRF8⁺⁺IRF4⁺⁺PD-L1^{high}CD54^{high} DCs, allowing a Th1/Th17 response, and DNCB-stimulated DCs are IRF1⁺PD-L1^{low} CD54^{low} allowing a Th1 response. The absence of IRF-8 and the low IRF-1 expressions could explain the lack of IL-12 and IL-17 productions, in response to DNCB. Inhibition of CK2 activity could convert these DC into IRF1⁺IRF8⁻IRF4⁺PD-L1^{low}CD54^{low} DCs in response to NiSO₄ and into IRF1⁻PD-L1⁻CD54⁻DCs in response to DNCB. This switch is in accordance with the Th17 polarisation in response to NiSO₄ and the absence of Th1 polarisation in response to DNCB in the absence of CK2 activity. Our study also shows that CK2 negatively controls *irf-4* transcription in unstimulated MoDCs. Since IRF-4 has been shown to be a key regulator of DC-Th2 development (37), we could propose that *irf-4* mRNAs induction, in MoDCs, explains the spontaneous Th2 polarization. Neither PDL-2 nor OX40L, two markers described as Th2 inducers, is induced in absence of CK2 activity in unstimulated MoDCs (data not shown). As Ulges *et al.* have demonstrated, the genetic ablation of the β-subunit of CK2 specifically in

Treg results in the maturation of IRF4⁺PDL-2⁺ DCs required for the development of Th2 response *in vivo*.

In conclusion, this work contributes to a better understanding of the role of CK2 in DC-T cells crosstalk, as recently described (31, 38, 39) and highlights CK2 as a key kinase in chemical sensitizer-induced DCs phenotype modulation, cytokine production and T CD4⁺ lymphocyte polarization. CK2 controls Th1 response through IFN- γ secretion by T cells and maintains Th17 polarization through IL-1 β and IL-23 production by DCs. As a transcription modulator, CK2 triggers an efficient immune response since this kinase modulates mRNA expression of several cytokines (data not shown) and transcription factors involved in T cell response. We also confirm that CK2 is a key kinase in the control of the Th2 response. Our study brings a novelty function of CK2 in response to contact sensitizers in DC.

Acknowledgments

We thank the Platform Trans-Prot (IPSIT-UPSud) and Claudine Deloménie for technical assistance.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

References

1. Peiser, M., T. Tralau, J. Heidler, A. M. Api, J. H. Arts, D. A. Basketter, J. English, T. L. Diepgen, R. C. Fuhlbrigge, A. A. Gaspari, J. D. Johansen, A. T. Karlberg, I. Kimber, J. P. Lepoittevin, M. Liebsch, H. I. Maibach, S. F. Martin, H. F. Merk, T. Platzek, T. Rustemeyer, A. Schnuch, R. J. Vandebriel, I. R. White, and A. Luch. 2011. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci* 69: 763–781.
2. Kaplan, D. H., B. Z. Igyártó, and A. A. Gaspari. 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* .
3. Vocanson, M., A. Hennino, A. Rozieres, G. Poyet, and J. F. Nicolas. 2009. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64: 1699–1714.
4. Freudenberg, M. A., P. R. Esser, T. Jakob, C. Galanos, and S. F. Martin. 2009. Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections. *G. Ital. Di Dermatologia E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Di Dermatologia E Sifilogr.* 144: 173–185.
5. Warshaw, E. M., D. V Belsito, J. S. Taylor, D. Sasseville, J. G. DeKoven, M. J. Zirwas, A. F. Fransway, C. G. T. Mathias, K. A. Zug, V. A. DeLeo, J. F. Fowler Jr, J. G. Marks, M. D. Pratt, F. J. Storrs, and H. I. Maibach. 2013. North American Contact Dermatitis Group patch test results: 2009 to 2010. *Dermat. contact, atopic, Occup. drug* 24: 50–59.
6. Friedmann, P. S., C. Moss, S. Shuster, and J. M. Simpson. 1983. Quantitation of sensitization and responsiveness to dinitrochlorobenzene in normal subjects. *Br. J. Dermatol.* 109 Suppl : 86–88.
7. Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, N. Rougier-Larzat, and M. Pallardy. 2004. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 123: 494–502.
8. Ade, N., D. Antonios, S. Kerdine-Romer, F. Boisleve, F. Rousset, and M. Pallardy. 2007. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol Sci* 99: 488–501.
9. Aiba, S., H. Manome, S. Nakagawa, Z. U. A. Mollah, M. Mizuashi, T. Ohtani, Y. Yoshino, and H. Tagami. 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 120: 390–399.
10. Toebak, M. J., P. R. Pohlmann, S. C. Sampat-Sardjoepersad, B. M. E. Von Blomberg, D. P. Bruynzeel, R. J. Scheper, T. Rustemeyer, and S. Gibbs. 2006. CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol. Vittr.* 20: 117–124.
11. Arrighi, J. F., M. Rebsamen, F. Rousset, V. Kindler, and C. Hauser. 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic

cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166: 3837–3845.

12. Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, and M. Pallardy. 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* 206: 233–244.

13. Antonios, D., P. Rousseau, A. Larange, S. Kerdine-Romer, and M. Pallardy. 2010. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO₄. *J Immunol* 185: 89–98.

14. Neves, B. M., M. Goncalo, A. Figueiredo, C. B. Duarte, M. C. Lopes, and M. T. Cruz. 2011. Signal transduction profile of chemical sensitizers in dendritic cells: an endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification? *Toxicol Appl Pharmacol* 250: 87–95.

15. Singh, N. N., and D. P. Ramji. 2008. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *J Mol Med* 86: 887–897.

16. Filhol, O., C. Cochet, P. Wedegaertner, G. N. Gill, and E. M. Chambaz. 1991. Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* 30: 11133–11140.

17. Ma, C., M. Muranyi, C. H. Chu, J. Zhang, and W.-M. Chu. 2013. Involvement of DNA-PKcs in the IL-6 and IL-12 response to CpG-ODN is mediated by its interaction with TRAF6 in dendritic cells. *PLoS One* 8: e58072.

18. Cejas, P. J., L. M. Carlson, J. Zhang, S. Padmanabhan, D. Kolonias, I. Lindner, S. Haley, L. H. Boise, and K. P. Lee. 2005. Protein kinase C betaII plays an essential role in dendritic cell differentiation and autoregulates its own expression. *J. Biol. Chem.* 280: 28412–28423.

19. Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188: 2175–2180.

20. Koga, Y., A. Matsuzaki, A. Suminoe, H. Hattori, and T. Hara. 2008. Expression of cytokine-associated genes in dendritic cells (DCs): Comparison between adult peripheral blood- and umbilical cord blood-derived DCs by cDNA microarray. *Immunol. Lett.* 116: 55–63.

21. Yanagawa, Y., N. Iijima, K. Iwabuchi, and K. Onoé. 2002. Activation of extracellular signal-related kinase by TNF-alpha controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 71: 125–132.

22. Pierre, F., P. C. Chua, S. E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M. K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J. P. Whitten, T. K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, K. Anderes, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, K. Trent, W. G. Rice, and D. M. Ryckman. 2011. Discovery and SAR of 5-(3-

chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* 54: 635–654.

23. Antonios, D., N. Ade, S. Kerdine-Romer, H. Assaf-Vandecasteele, A. Larange, H. Azouri, and M. Pallardy. 2009. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol Vitro*. 23: 227–234.

24. Pickard, C., A. M. Smith, H. Cooper, I. Strickland, J. Jackson, E. Healy, and P. S. Friedmann. 2007. Investigation of mechanisms underlying the T-cell response to the hapten 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 127: 630–637.

25. Meggio, F., and L. A. Pinna. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17: 349–368.

26. Hitzler, M., O. Majdic, G. Heine, M. Worm, G. Ebert, A. Luch, and M. Peiser. 2012. Human Langerhans Cells Control Th Cells via Programmed Death-Ligand 1 in Response to Bacterial Stimuli and Nickel-Induced Contact Allergy. *PLoS One* 7.

27. Turbica, I., Y. Gallais, C. Gueguen, H. Tharinger, C. Al Sabbagh, R. Gorges, H. Gary-Gouy, S. Kerdine-Romer, M. Pallardy, L. Mascarell, a. Gleizes, and S. Chollet-Martin. 2015. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J. Leukoc. Biol.* 97: 1–13.

28. Bousso, P. 2008. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 675–684.

29. Dyring-Andersen, B., L. Skov, M. B. Løvendorf, M. Bzorek, K. Søndergaard, J. P. H. Lauritsen, S. Dabelsteen, C. Geisler, and C. Menné Bonefeld. 2013. CD4+ T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- γ are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis* 68: 339–347.

30. Martin, S. F. 2015. New concepts in cutaneous allergy. *Contact Dermatitis* 72: 2–10.

31. Ulges, A., M. Klein, S. Reuter, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, N. Grebe, V. Staudt, N. Stergiou, T. Bohn, T.-J. Brühl, S. Muth, H. Yurugi, K. Rajalingam, I. Bellinghausen, A. Tuettenberg, S. Hahn, S. Reißig, I. Haben, F. Zipp, A. Waisman, H.-C. Probst, A. Beilhack, T. Buchou, O. Filhol-Cochet, B. Boldyreff, M. Breloer, H. Jonuleit, H. Schild, E. Schmitt, and T. Bopp. 2015. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nat. Immunol.* 16.

32. Lohoff, M., and T. W. Mak. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 125–135.

33. Gabriele, L., and K. Ozato. 2007. The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 503–510.

34. Yoshida, Y., R. Yoshimi, H. Yoshii, D. Kim, A. Dey, H. Xiong, J. Munasinghe, I. Yazawa, M. J. O'Donovan, O. A. Maximova, S. Sharma, J. Zhu, H. Wang, H. C. Morse, and

- K. Ozato. 2014. The Transcription Factor IRF8 Activates Integrin-Mediated TGF- β Signaling and Promotes Neuroinflammation. *Immunity* 40: 187–198.
35. Gao, Y., S. a Nish, R. Jiang, L. Hou, P. Licona-Limón, J. S. Weinstein, H. Zhao, and R. Medzhitov. 2013. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* 39: 722–32.
36. Rengarajan, J. 2002. Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts with NFATc2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression. *J. Exp. Med.* 195: 1003–1012.
37. Williams, J. W., M. Y. Tjota, B. S. Clay, B. Vander Lugt, H. S. Bandukwala, C. L. Hrusch, D. C. Decker, K. M. Blaine, B. R. Fixsen, H. Singh, R. Sciammas, and A. I. Sperling. 2013. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat. Commun.* 4: 2990.
38. Sawant, D. V, and A. L. Dent. 2015. It takes CK2 to suppress TH2. *Nat. Immunol.* 16: 224–225.
39. Bird, L. 2015. Regulatory T cells: CK2: keeping TH2 cells in check. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 134–134.

Footnotes

This work was supported by grants from the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) de l'Ile de France "Santé et environnement" (for M.D.B. support) and the Region Ile-de-France and ANR 11-CESA-015-01—Allergochem, ANR 2007 – SEST 002 01 – AllergoDC

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Legends

Figure 1. MoDCs display important kinase activity in response to NiSO₄ and DNCB.

Peptide microarray analysis of the predicted kinase activity of the top five kinases up-regulated in MoDCs upon 30 min and 60 min stimulation with (A) NiSO₄ 500 μM or (B) DNCB 10 μM. Protein lysates of ten independent donors are pooled and results are expressed as fold increase compared to control. ERK: extra-regulated kinase; CK2: protein kinase CK2; DNA-PKC: DNA dependant kinase C; EphA4: Ephrin type-A receptor 4; CDC2: cell division cycle protein 2 homolog; PKC: protein kinase C; FER: (fps/fes related) tyrosine kinase; JNK: c-Jun N-terminal Kinase

Figure 2. Inhibition of CK2 activity does not modulate uptake of dextran-FITC by MoDCs.

MoDCs are incubated with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μM) for 1h before incubation with dextran-FITC (0.5 mg/ml) at 37°C for various times, and the uptake of dextran-FITC is analyzed by flow cytometry on a FACsCalibur. MoDCs incubated with dextran-FITC (0.5 mg/ml) at 4°C are used as control. Histogram represents mean fluorescence intensity (MFI) of 3 independent experiments.

Figure 3. Inhibition of CK2 activity downregulates the expression of key surface markers of MoDCs maturation.

Immature MoDCs are pretreated for 1h with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μM) and then stimulated for 24h with (A) NiSO₄ 500 μM or (B) DNCB 10 μM. After 24h, the expression of cell-surface markers is quantified by flow cytometry. Data represent the result of 5 independent experiments and are expressed as the fold increase over control Medium (for

NiSO₄) or DMSO (for DNCB). *p < 0.05; **p < 0.01 (Mann Whitney test); RFI = Relative fluorescence intensity

Figure 4. Inhibition of CK2 activity modulates cytokine production by MoDCs.

Immature MoDCs are pretreated for 1h with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μM) and then stimulated for 24h with (A) NiSO₄ 500 μM or (B) DNCB 10 μM. IL-1β, CXCL-8, IL-6, TNF-α, CCL-4, IL-12p70 and IL-23 levels are quantified in MoDCs supernatants using Multi Scale Discovery Multiplex (MSD) assay. Data represent the result of 5 independent experiments and are expressed in pg/ml. *p < 0.05; **p < 0.01 (Mann Whitney test)

Figure 5. Inhibition of CK2 activity impairs DNCB but not NiSO₄ MoDC-induced CD4⁺ T lymphocyte proliferation.

CFSE-loaded CD4⁺ T lymphocytes are cultured with allogeneic MoDCs pretreated with (A) NiSO₄ 500 μM or (B) DNCB 10 μM (ratio 1 T cell: 10 DCs) in the presence or absence of CX-4945 (CX, 5 μM). On day 6 the percentage of CFSE^{low} cells is determined by flow cytometry. Results are expressed as % of CFSE positive cells, corresponding to T cell proliferation. These results are representative of 6 independent experiments. *: p<0.05; ** p<0.01 (Mann Whitney test)

Figure 6. Inhibition of CK2 activity modulates DNCB and NiSO₄ MoDCs-induced CD4⁺ T lymphocyte polarization.

CD4⁺ T lymphocytes are co-incubated with MoDCs [both immature and (A) NiSO₄- or (B) DNCB- treated] in the absence or presence of CX-4945 (5 μM). On day 5, cytokines are quantified in the co-culture supernatants using Multi Scale Discovery (MSD) Multiplex assay. Results are expressed as fold increase compared to control Medium or DMSO; and showed as

dot plots (pg/ml). These results are representative of 6 independent experiments. * : $p < 0.05$;
** $p < 0.01$ (Mann Whitney test)

Figure 7. Inhibition of CK2 activity modulates mRNA expression of IRFs in MoDCs.

Immature MoDCs are pretreated for 1h with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μM) and then stimulated for 6h with (A) NiSO_4 500 μM or (B) DNCB 10 μM . IRF1, IRF8 and IRF4 mRNAs are quantified by real-time RT-PCR. Data represent the result of 5 independent experiments and are normalized to control.*: $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Mann Whitney test)

Supplementary data

Supplementary data 1. CK2 activity assay

MoDCs are pretreated for 1h with CX-4945 (CX, 5 or 10 μM) and stimulated for 6 hours with NiSO_4 (500 μM) or DNCB (10 μM). CK2 activity is measured using incorporation of (γ - ^{32}P) ATP using a synthetic peptide specific for CK2. Results are expressed as total activity (cpm) and are representative of 3 independent experiments.

Supplementary data 2. Cell viability

MoDCs are pretreated for 1h with CX-4945 (CX, 5 μM) and stimulated for 24 hours with (A) NiSO_4 (500 μM) or (B) DNCB (10 μM). Cell viability is assessed by propidium iodide incorporation using flow cytometry. Results are expressed as percentage of living cells and are representative of 3 independent experiments.

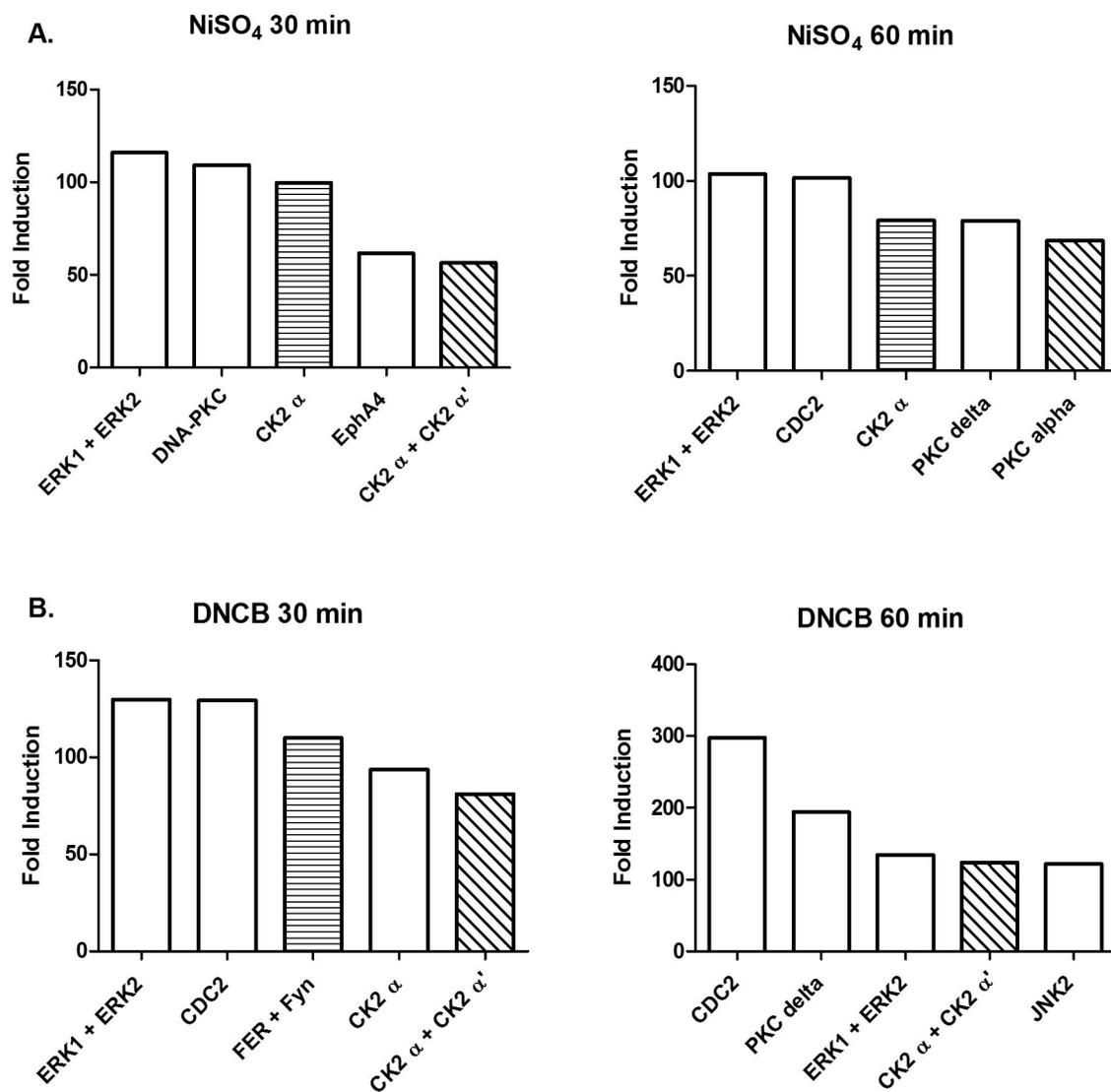


Figure 1

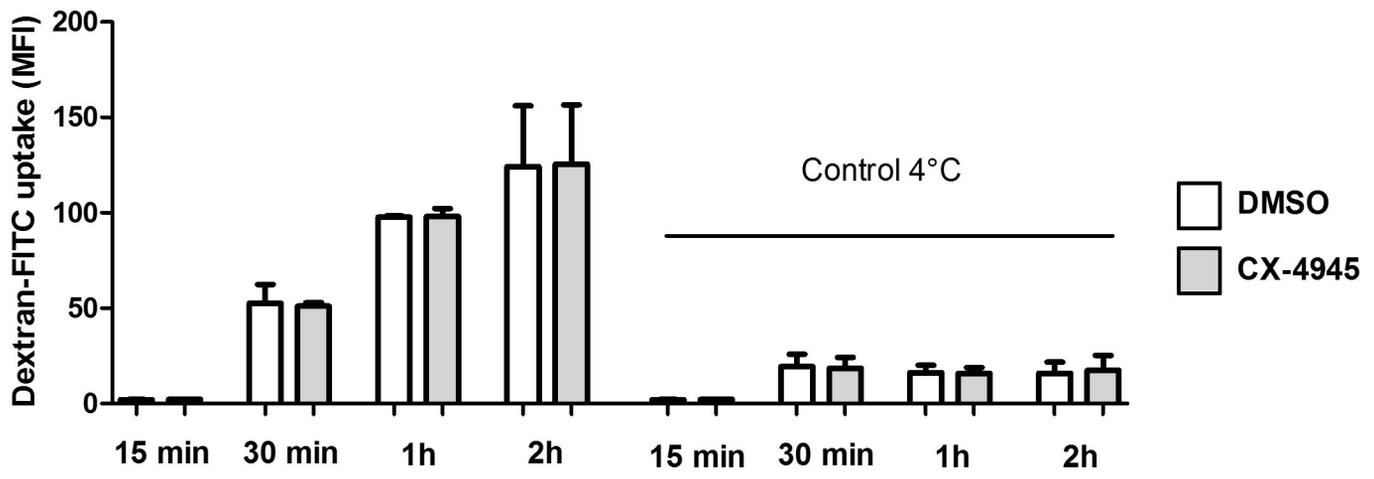


Figure 2

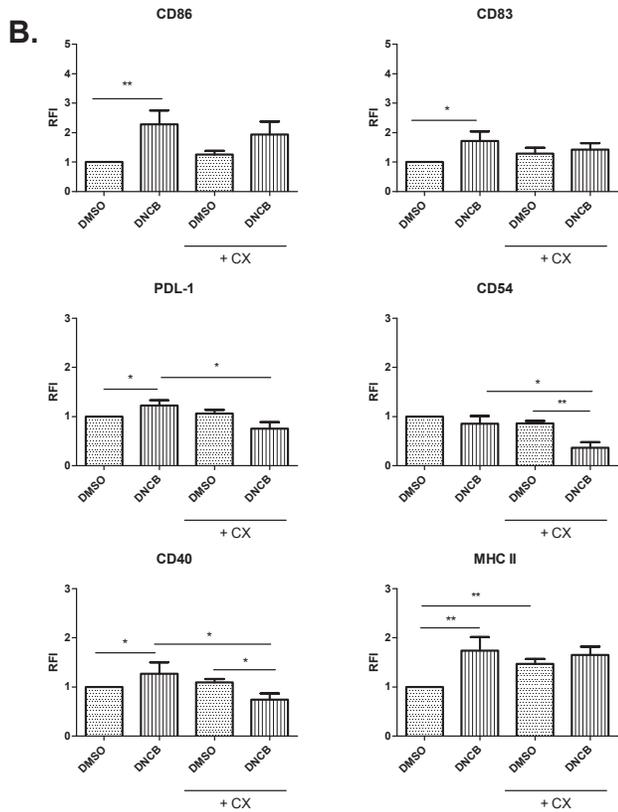
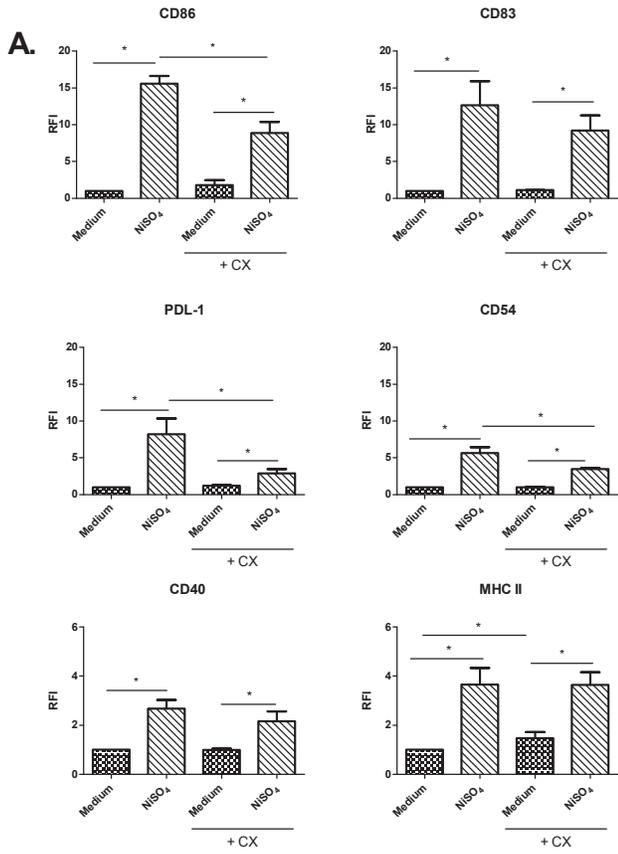


Figure 3

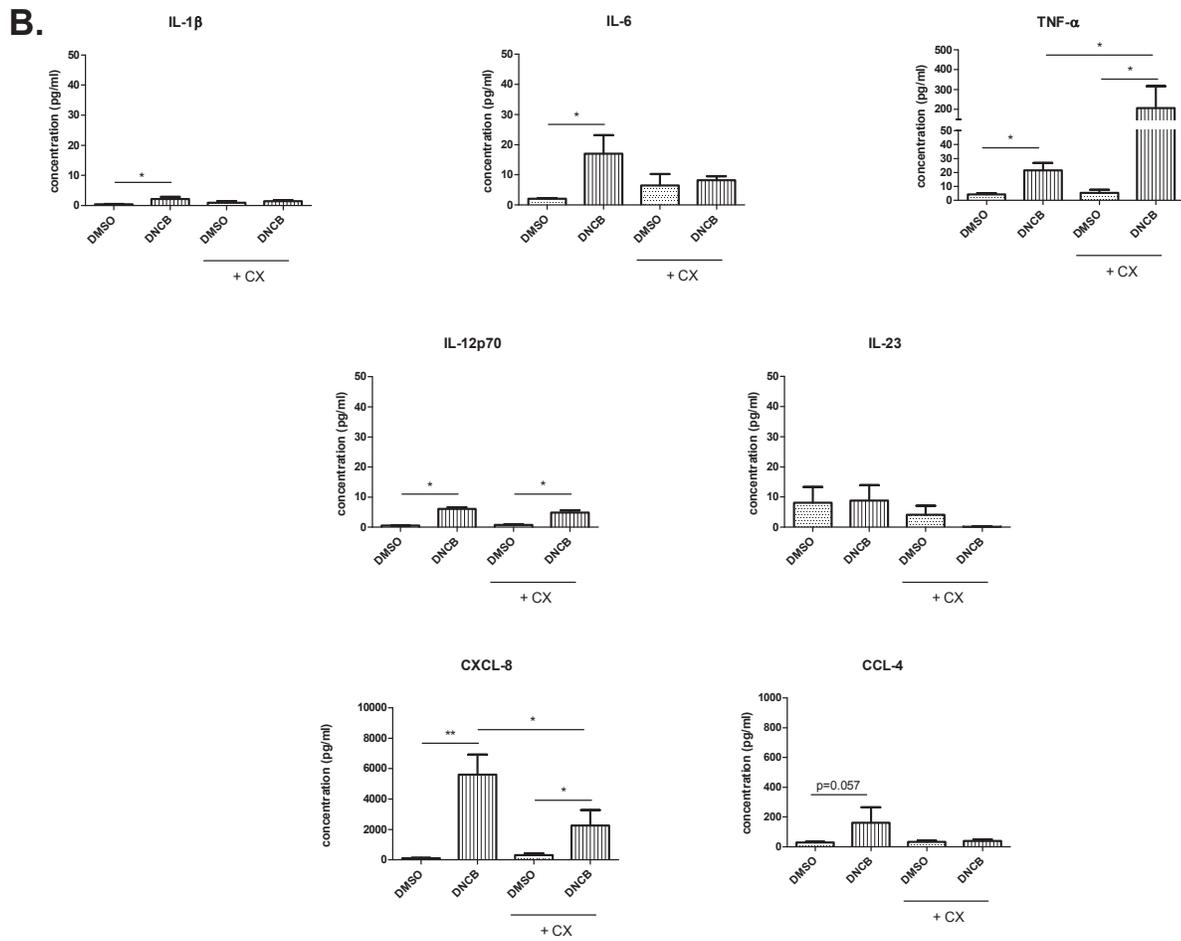
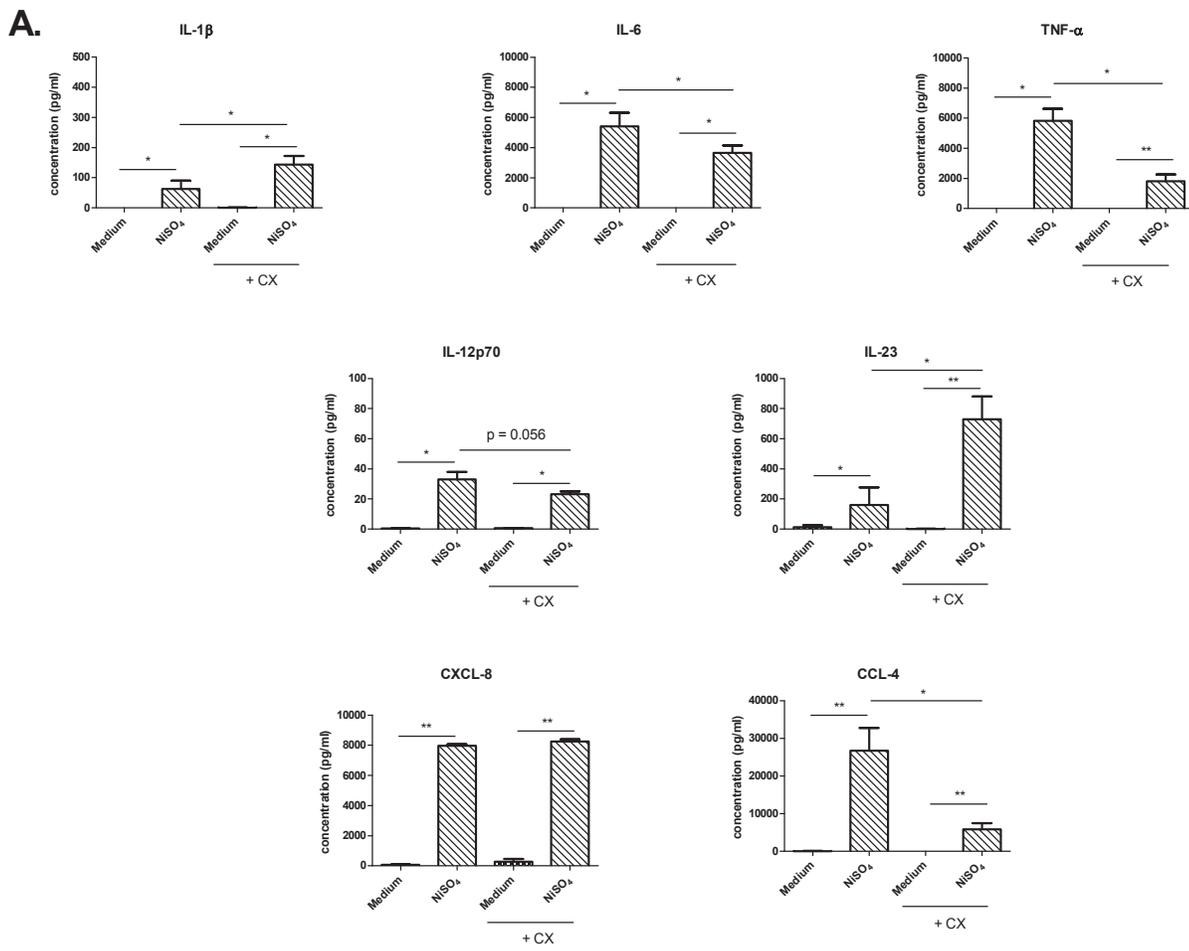


Figure 4

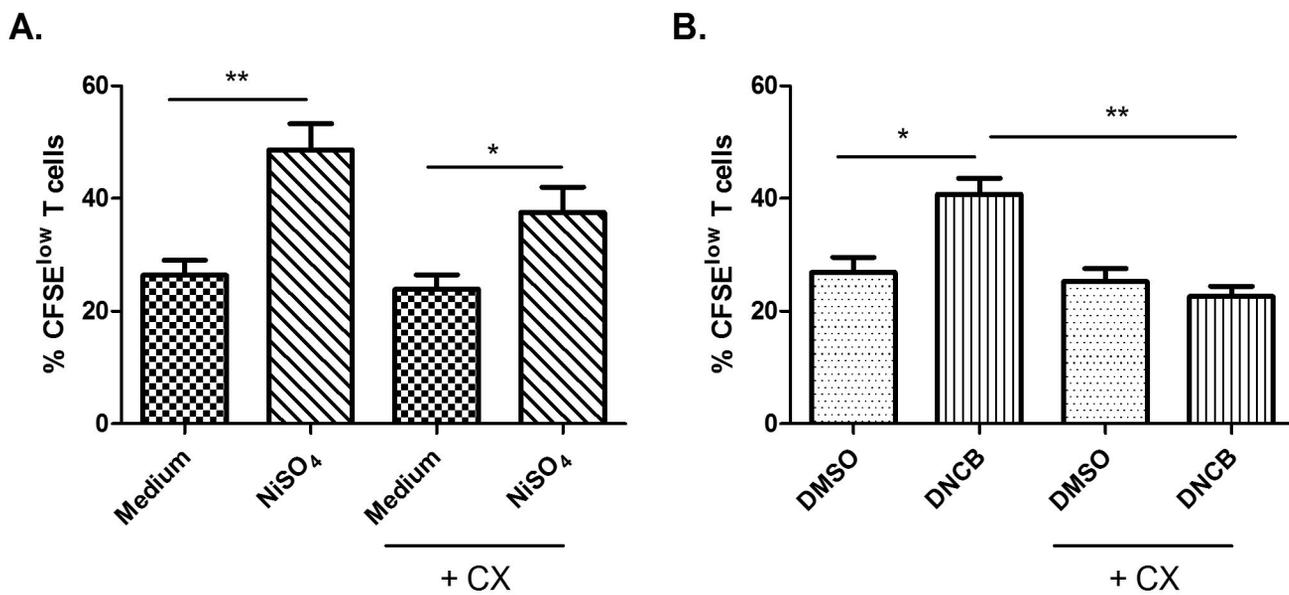


Figure 5

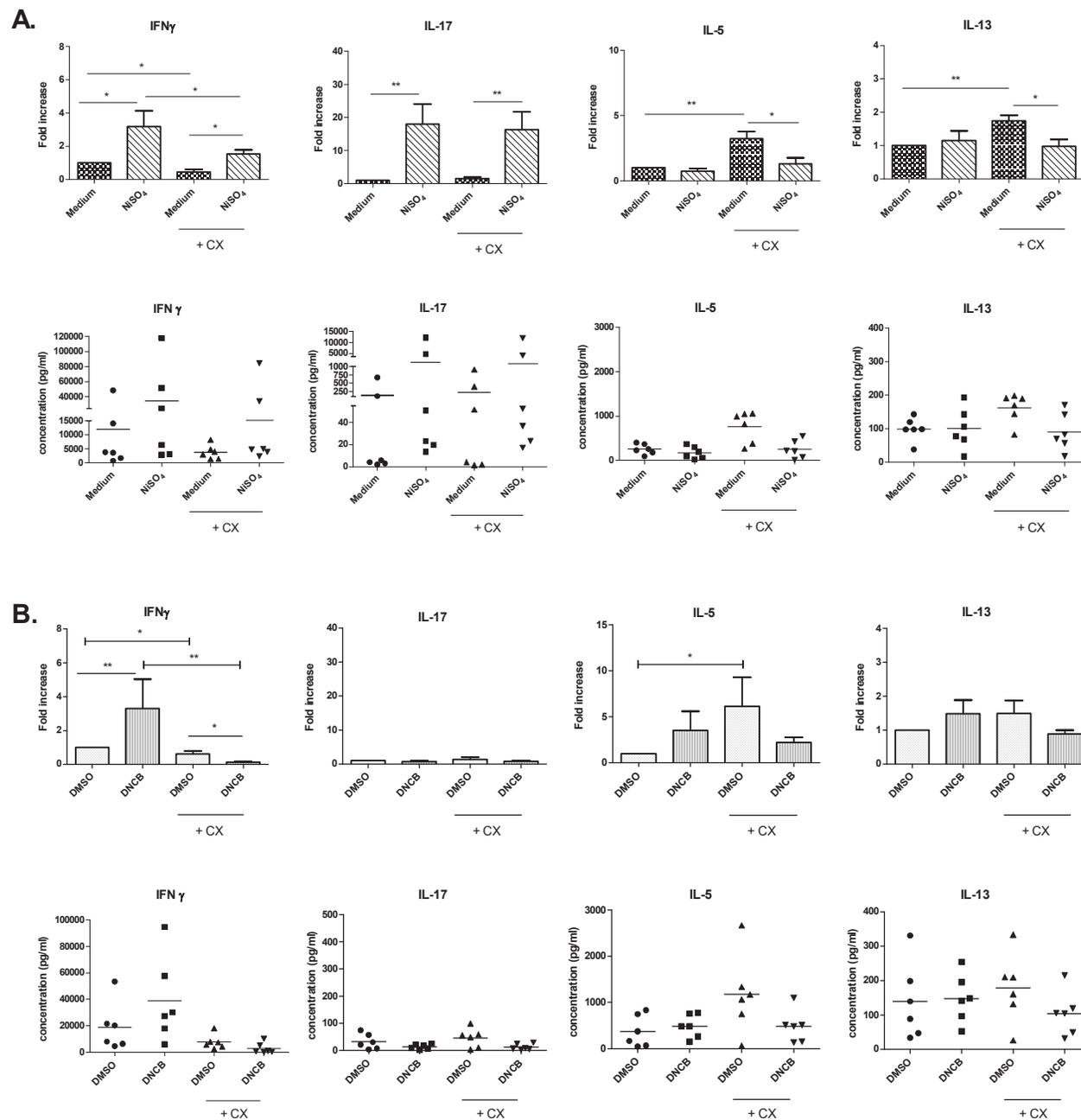


Figure 6

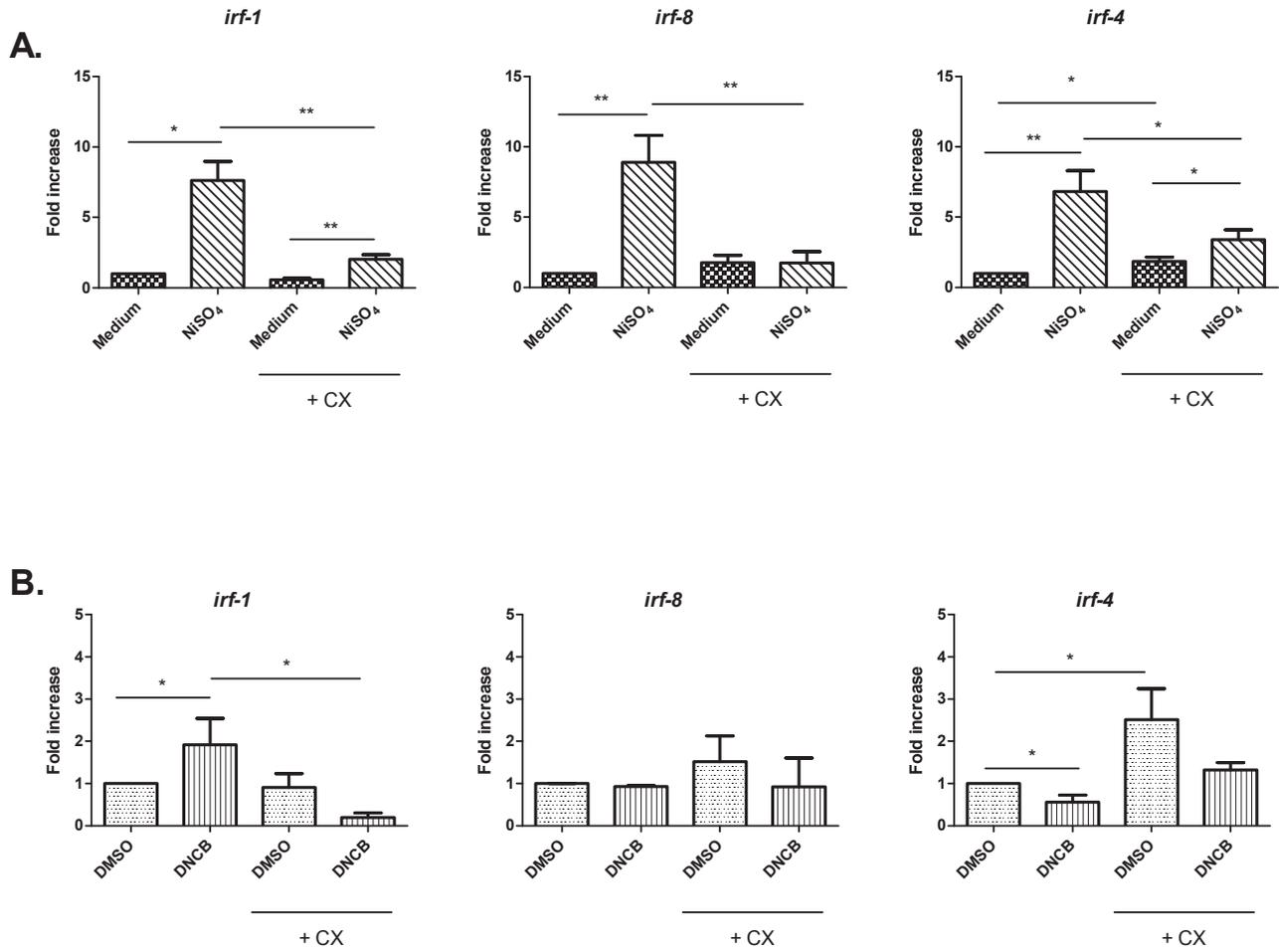


Figure 7

Annexe 3: Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization

Turbica, I. **Gallais Y.**, Gueguen C., Tharinger H., Al Sabbagh C., Gorges R., Gary-Gouy H., Kerdine-Römer S., Pallardy M., Mascarell L., Gleizes A., Chollet-Martin S.

Journal of Leukocyte Biology, 2015 Apr; 97(4):737-4

Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization

Isabelle Turbica,^{*,†} Yann Gallais,^{*,†} Claire Gueguen,[‡] Hugo Tharinger,[§] Chantal Al Sabbagh,^{†,¶} Roseline Gorges,^{*,†} Hélène Gary-Gouy,[§] Saadia Kerdine-Römer,^{*,†} Marc Pallardy,^{*,†} Laurent Mascarell,[‡] Aude Gleizes,^{*,†,1} and Sylvie Chollet-Martin^{*,†,||,1,2}

^{*}INSERM, UMR 996, Faculté de Pharmacie, Univ. Paris-Sud, Chatenay-Malabry, France; [§]Institut Paris-Sud d'innovation thérapeutique (IPSIT), Univ. Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France; [†]UniverSud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France; [‡]Stallergenes, Antony cedex, France; [¶]CNRS UMR, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France; and ^{||}AP-HP, Groupe Hospitalier Paris Nord Val de Seine, Hôpital Bichat, Unité d'Immunologie "Auto-immunité et Hypersensibilités," Paris, France

RECEIVED MARCH 4, 2014; REVISED JANUARY 5, 2015; ACCEPTED JANUARY 6, 2015. DOI: 10.1189/jlb.3A0314-132RR

ABSTRACT

DCs are the first immune cells to be exposed to allergens, including chemical sensitizers, such as nickel, a human TLR4 agonist that induces DC maturation. In ACD, DCs can interact with PMNs that are recruited and activated, leading, in particular, to ectosome release. The objective of this work was to characterize the effects of PMN-Ect on DC functions in an ACD context. We first developed a standardized protocol to produce, characterize, and quantify ectosomes by use of human PLB-985 cells, differentiated into mature PMN (PLB-Ect). We then studied the *in vitro* effects of these purified ectosomes on human moDC functions in response to NiSO₄ and to LPS, another TLR4 agonist. Confocal fluorescence microscopy showed that PLB-Ect was internalized by moDCs and localized in the lysosomal compartment. We then showed that PLB-Ect down-regulated NiSO₄-induced moDC maturation, as witnessed by decreased expression of CD40, CD80, CD83, CD86, PDL-1, and HLA-DR and by decreased levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, and IL-12p40 mRNAs. These effects were related to p38MAPK and NF-κB down-regulation. However, no increase in pan-regulatory DC marker genes (GILZ, CATC, C1QA) was observed; rather, levels of effector DC markers (Mx1, NMES1) were increased. Finally, when these PLB-Ect + NiSO₄-treated moDCs were cocultured with CD4⁺ T cells, a Th2 cytokine profile seemed to be induced, as shown, in particular, by enhanced IL-13 production. Together, these results suggest that the PMN-Ect can modulate DC maturation in response to nickel, a common chemical

sensitizer responsible for ACD. *J. Leukoc. Biol.* **97**: 000-000; 2015.

Introduction

ACD is one of the most prevalent occupational cutaneous disorders, occurring after repeated contact with low molecular-weight chemicals, such as nickel. The sensitizing phase can take weeks to months of exposure before the onset of dermatitis (elicitation phase) [1, 2]. Nickel is a common metal sensitizer that can be sensed by DCs. Recently, the TLR4 was shown to be the key receptor for nickel-mediated inflammation in humans, independently of its coreceptor myeloid differentiation factor 2 [3, 4]. Indeed, nickel directly induces TLR4 dimerization, an event that requires the presence of 2 nonconserved histidine residues (H456 and H458). During this sensitization phase, previous *in vitro* studies from our group suggest that NF-κB, IRF1, and p38MAPK are activated in DCs, leading to phenotypic modifications, cytokine production, migration to draining lymph nodes, and finally, allergen presentation to naïve T lymphocytes [5, 6]. This leads to the generation of skin-homing CD8⁺ Tc1/Tc17 and CD4⁺ Th1/Th17 effector cells that enter the blood circulation. Upon re-exposure, the contact allergen triggers a cascade of events, resulting in the recruitment of monocytes, T cells, NK cells, and PMNs, which can thus interact with skin DCs [7–10].

PMNs have a major role in innate immunity, through functions, such as migration, phagocytosis, degranulation of preformed mediators, oxidative burst activity, cytokine production, and NET or ectosome release [11–13]. However, PMN can also regulate adaptive immunity, notably through interactions with APCs, such as DCs [14]. Indeed, PMN-derived elastase,

Abbreviations: ACD = allergic contact dermatitis, AMV = avian myeloblastosis virus, C1QA = complement component 1A, CATC = human dipeptidyl peptidase 1, CHOL = cholesterol, cMFI = corrected mean fluorescence intensity, Ct = comparative threshold, DC = dendritic cell, DEX = dexamethasone, DLS = dynamic light-scattering, DOPC = 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, FSC = forward-scatter, GILZ = glucocorticoid-induced

(continued on next page)

1. These authors contributed equally to the work.
2. Correspondence: INSERM, UMR 996, UFR de Pharmacie, Université Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail: sylvie.chollet-martin@u-psud.fr

lactoferrin, TNF- α , and IL-8 can modulate DC activation, and PMN can also bind directly to DCs via $\beta 2$ integrin [14–17]. Recently, our group reported that NETs are able to down-regulate DC activation [18]. Finally, it was shown that PMN-Ect down-regulate LPS-induced maturation of DCs and their capacity to induce T cell proliferation [19]. Thus, during nickel-related ACD, PMN-Ect might interact directly with skin DCs and modulate their function.

Long considered to be cellular debris or confused with exosomes and apoptotic bodies, ectosomes (also called microparticles) are now clearly identified as regulatory vectors of intercellular cross-talk [20–23]. They are released by budding from the cell membrane, spontaneously or in response to various stimuli, and are characterized by their size (diameter 0.1–1 μm) and composition, pointing to their cellular origin [24–26]. Ectosomes contain a wide array of surface, cytoplasmic, and nuclear molecules that are incorporated into a membrane-bound structure, as particles leave the cell and are shed into extracellular space. They mediate cell–cell communication by transferring a cargo of components from the cell of origin to the target cell. Ectosomes may fuse with the target-cell plasma membrane or be engulfed. Activation of ectosome-producing cells is characterized by specific membrane changes, such as PS externalization, but also by cytoskeleton disruption and changes in the local concentrations of specific intracellular molecules [27]. Circulating ectosomes can originate from RBCs, leukocytes, platelets, and endothelial cells, among others. Their levels increase during various diseases, including cancer, heat stroke, cardiovascular disorders, and rheumatic diseases, suggesting that they may serve as biomarkers and disease mediators [25, 28–32]. Indeed, growing evidence suggests that ectosomes induce inflammation, stimulate coagulation, affect vascular functions, play a role in cell proliferation and differentiation, and even restrict bacterial growth and dissemination [33–36]. Interestingly, whereas ectosomes were initially considered to be a major source of proinflammatory effectors, it is now suggested that they might have anti-inflammatory and immunosuppressive properties, potentially helping to resolve local inflammation [26, 37–39]. Indeed, besides their down-regulating effect on some DC functions [19], PMN-Ect can also block endothelial cell activation via PS or Annexin-A1 binding [40] and also macrophage activation via several mechanisms (TGF- β induction, Ca^{++} influx, NF- κB inhibition, and MER proto-oncogene tyrosine kinase and PI3K/AKT activation) [41–43].

These newly described regulatory roles of PMN-Ect during inflammation prompted us to hypothesize an effect of ectosomes on DCs that could play a role in ACD. We addressed this question

(continued from previous page)

leucine zipper, IRF1 = IFN regulatory factor 1, MFI = mean fluorescence intensity, moDC = monocyte-derived dendritic cell, Mx1 = myxovirus resistance 1, NET = neutrophil extracellular trap, NMES1 = normal mucosa of esophagus-specific gene 1, NP-40 = Nonidet P-40, PDL-1 = programmed death-ligand 1, PLB-985 = human acute myeloid leukemia cell line, PLB-Ect = PLB-985-derived ectosomes, PMN = polymorphonuclear neutrophil, PMN-Ect = polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes, PMT = photomultiplier tube, PS = phosphatidylserine, PVDF = polyvinylidene difluoride, RFI = relative fluorescence intensity, SSC = side-scatter, TBP = TATA box binding protein

by use of moDCs and NiSO₄, one of the most prevalent contact sensitizers. We first developed a standardized model of ectosome production by PLB-985 cells differentiated into mature, neutrophil-like cells (PLB-Ect). These PLB-Ect were able to modulate NiSO₄-induced moDC maturation, as witnessed by phenotypic changes and modulation of cytokine production, in a mechanism involving MAPK and NF- κB regulation. moDCs were also reprogrammed toward an effector phenotype that enhanced Th2 responses.

MATERIALS AND METHODS

PLB-985 culture and differentiation

The human myeloid leukemia cell line PLB-985 (ACC 139; DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) was cultured in RPMI-1640 medium containing 25 mM HEPES GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) and supplemented with 10% FCS (Biowest, AbCys, Courtaboeuf, France), antibiotics [100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Gibco, Invitrogen)], and 1% pyruvate (Gibco, Invitrogen) at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. To induce PLB-985 cell granulocytic differentiation, exponentially growing cells at a starting density of $2 \times 10^5/\text{ml}$ were cultured in RPMI medium, supplemented with 1% pyruvate, 0.5% dimethyl formamide (Carlo Erba, Rodano, Italy), and 5% FCS. On day 6, granulocytic differentiation was verified, as described previously [44].

Isolation of human blood PMNs

PMNs were separated from fresh buffy coats prepared from healthy donor blood obtained from Etablissement Français du Sang (Rungis, France). After density centrifugation on a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France), PMNs were separated from erythrocytes by sedimentation on a separating medium containing 5% Dextran T500 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in 0.9% NaCl. Contaminating erythrocytes were then removed by hypotonic lysis, and PMNs were resuspended in RPMI 1640, 25 mM HEPES GlutaMAX.

Production and characterization of ectosomes (PLB-Ect and PMN-Ect)

Differentiated PLB-985 cells or PMNs (10^7 cells/ml) were incubated for 30 min at 37°C in RPMI 1640, 25 mM HEPES GlutaMAX with 10 nM PMA (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Intact cells were removed by centrifugation (15 min, 4000 g at 4°C), and the ectosome-rich supernatants were concentrated with Centriprep centrifugal filter devices (10 kDa MW cutoff; Millipore, Molsheim, France). Ectosomes were then pelleted by ultracentrifugation (40 min, 160,000 g at 4°C), washed in 0.9% NaCl, and stored in aliquots at -80°C until use. Endotoxin was quantified in the preparations by use of a colorimetric assay (ToxinSensor; Genscript, Paris, France), according to the manufacturer's instructions.

An amphiphilic cell linker dye kit (PKH67; Sigma-Aldrich) was used for membrane labeling of PLB-Ect and PMN-Ect. Ectosome preparation (10 μl) was diluted in 400 μl diluent C/dye solution and incubated with gentle shaking for 30 s at room temperature. Labeled ectosomes were separated from the remaining unbound dye by ultracentrifugation (40 min, 160,000 g at 4°C) and washed with 0.9% NaCl. Additional membrane labeling of ectosomes was then performed with Annexin V-PE (BD Biosciences, Le pont de Claix, France), which binds PS. Labeled PLB-Ect and PMN-Ect were observed with an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences), equipped with a FSC-PMT to increase sensitivity in size detection. Data were acquired with DIVA software and analyzed with FlowJo software. PLB-Ect and PMN-Ect were identified by their size, as assessed by the use of calibrated beads (0.5, 0.9, and 3 μm diameter; Megamix; Biotex, Marseille, France), amplification of their FSC and SSC signals, and PKH67 and PS staining. The absolute concentration of PLB-Ect and PMN-Ect/ μl ectosome preparation was quantified by use of tubes preloaded with fluorescent TrueCount beads (BD Biosciences).

Finally, the size distribution of the ectosomes thus obtained was analyzed with the DLS method on a Zetasizer Nano analyzer (He-Ne laser 633 nm; Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). Measurements were carried out at 25°C, and intensity correlation functions were measured at a scattering angle of 173°. Ectosome size was obtained from the Stokes-Einstein relation. Before measurements, ectosome preparations were diluted 2-fold with 0.9% NaCl.

Liposome preparation

Liposomes were prepared from DOPC (Sigma-Aldrich), CHOL (Sigma-Aldrich), and L- α -PS (Brain PS; Avanti Polar Lipid, Alabaster, AL, USA). The liposomal formulation DOPC/CHOL/PS (50:20:30 mol%) was prepared by the lipid hydration method, followed by extrusion [45]. The molar percentages of lipid components were chosen to resemble the cytoplasmic membrane composition [46]. In briefly, a lipid mixture containing 0.2 mmol total lipids was dissolved in 5 ml chloroform in a 100-ml round-bottomed flask. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure for 40 min at 45°C to form a thin lipid film. Multilamellar liposomes were formed by hydration of the lipid film at 36°C, under nitrogen, with 2.5 ml HEPES Buffer, pH 7.4 (10 mM HEPES, 145 mM NaCl; Sigma-Aldrich), filtered on a 0.22 μ m PVDF syringe filter (Millex-GV; Millipore), to yield a final lipid concentration of 80 mM. The resulting mixture was stirred vigorously, followed by extrusion 10 times. Extrusion was performed at 36°C, above the transition temperature of the lipid mixture [47], under nitrogen pressure, at 10 pounds per square inch, through a stack of 2, 400 nm polycarbonate filters (Isopore; Millipore). Liposomes were collected in sterilized flasks, flushed with nitrogen, and stored at 4°C.

The mean hydrodynamic diameter of the freshly prepared liposomes was determined by the DLS technique. Before measurements, liposomes were diluted in HBSS. They were quantified by flow cytometry after staining by use of the same protocol as described for ectosome preparations.

Generation of human moDCs

PBMCs were purified from buffy coats obtained from Etablissement Français du Sang by centrifugation on a Ficoll density gradient. As described previously [5], monocytes were isolated from the mononuclear fraction by magnetic-positive selection with MiniMACS separation columns and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes were cultured at 1×10^6 cells/ml in the presence of GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml; Miltenyi Biotec) in RPMI 1640, 25 mM HEPES GlutaMAX, supplemented with 10% FCS, antibiotics, and 1% pyruvate at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Within 5 days, monocytes differentiated into moDCs with an immature phenotype.

moDC maturation and pretreatment with ectosomes or liposomes

On day 5, immature moDCs were harvested and washed in RPMI 1640, 25 mM HEPES GlutaMAX, supplemented with 10% FCS, antibiotics, and 1% pyruvate. PLB-Ect were then added at a proportion of 10 PLB-Ect for 1 moDC. Preliminary experiments showed that a ratio of 20:1 gave similar results (data not shown). In some experiments, instead of ectosomes, liposomes were added to cells at the same ratio. After 30 min of preincubation at 37°C, moDCs were treated with the chemical hapten NiSO₄ (500 μ M; Sigma-Aldrich), LPS (from *Escherichia coli* 055:B5 strain 20 ng/ml; Sigma-Aldrich) used as a positive control, or DEX (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) used as a tolerogenic DC inducer. The stimulation time at 37°C ranged from 30 min to 18 h, depending on the experiment.

Confocal microscopic analysis of ectosome endocytosis by moDCs

PLB-Ect were stained with the amphiphilic cell linker dye PKH67, as described above, and resuspended in RPMI 1640. Ten labeled PLB-Ect per moDC were then incubated for 4 h at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. After

centrifugation, cells were incubated for 15 min at room temperature with a lysosomal compartment dye (50 nM; LysoTracker Red DND-99; Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Cell preparations were then analyzed by confocal microscopy (Laser Scanning Microscope 510 META; Zeiss, Le Pecq, France).

Flow cytometric analysis of moDC maturation

After PLB-Ect pretreatment and 18 h of exposure to maturation agents (NiSO₄ or LPS), the moDC phenotype was analyzed by flow cytometry. The labeling procedure was as follows: 2×10^5 cells/ml were washed in cold PBS, supplemented with 0.5% BSA, and stained with mAb in the dark on ice for 20 min. After washing with cold PBS, cells were fixed in 1% paraformaldehyde, diluted in PBS. The following mAb were used: PE-labeled mouse anti-human CD86 [2331 (FUN-1); BD Biosciences], PE-labeled mouse anti-human CD40 (MAB89; Beckman Coulter, Marseille, France), allophycocyanin-conjugated mouse anti-human CD83 (HB15e; BD Biosciences), FITC-labeled mouse anti-human CD80 (L307.4; Beckman Coulter), FITC-labeled mouse anti-human HLA-DR mAb (Immu-357; Beckman Coulter), and FITC-labeled mouse anti-human PDL-1 (CD274; MIH1; BD Biosciences). Appropriate isotype controls (mouse IgG1k; BD Biosciences) were used at the same concentration to determine nonspecific staining. A minimum of 10,000 cells was analyzed on a FACSCalibur cell analyzer by use of CellQuest software (Becton Dickinson). Living cells were identified on the basis of their physical characteristics (FSC and SSC). Results were expressed as the RFI by use of the cMFI, as follows: cMFI = MFI of cells/MFI of isotype control; RFI = cMFI of treated cells/cMFI of untreated cells.

Cytokine quantification in moDC supernatants

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12p70 were quantified in supernatants, collected 18 h after moDC activation by NiSO₄ or LPS, in the presence or absence of PLB-Ect by use of the BD Cytometric Bead Array system and a FACSCalibur cell analyzer (BD Biosciences). Data were analyzed with Flow Cytometry Data Analysis and Processing (FCAP) Array software.

Quantitative real-time RT-PCR assay of cytokines in moDCs

Total RNA was extracted after lysis of 4 h-treated moDCs [10^6 cells/ml, pretreated or not with PLB-Ect or liposomes in TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies)]. Total RNA pellets were resuspended in RNase-free water and quantified by spectrophotometry.

First-strand cDNA was synthesized from total RNA by use of a thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). The reaction used 1 μ g total RNA, a deoxynucleotide triphosphate mixture (containing 25 mM deoxy-adenosine triphosphate, deoxy-guanosine triphosphate, deoxy-cytidine triphosphate, and deoxy-thymidine triphosphate), and 50 μ M oligo (dT) primers (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Reverse transcription was carried out in 1 \times AMV RT reaction buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with RNase inhibitor (RNasine; Promega) at 40 U/ μ l, AMV RT (Promega) at 10 U/ μ l, and RNase-free water to a final volume of 10 μ l. A control without RT was used to confirm the absence of DNA contamination.

Real-time PCR was performed by use of the SYBR Green technology on a CFX96 system (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France). Each reaction mix consisted of 1:50 diluted cDNA in 4 μ l final of nuclease-free water; 0.5 μ M each forward and reverse primer for *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p40*, *TNF- α* , *TGF- β* , *GAPDH*, *TBP*, and 18S rRNA; and SsoAdvanced Supermix (Bio-Rad Laboratories) in a total reaction volume of 10 μ l. The following specific primers were used (forward and reverse, respectively): *IL-1 β* : 5'-ACA GAC CTT CCA GGA GAA TG-3' and 5'-GCA GTT CAG TGA TCG TAC AG-3'; *IL-6*: 5'-TCA ATG AGG AGA CTT GCC TG-3' and 5'-GAT GAG TTG TCA TGT CCT GC-3'; *IL-8*: 5'-TCT CTT GGC AGC CTT CCA TGA-3' and 5'-TGG GGT GGA AAG GTT TGG AG-3'; *IL-10*: 5'-GTG ATG CCC CAA GCT GAC A-3' and 5'-CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT-3'; *IL-12p40*: 5'-TGG AGT GCC AGG AGG ACA GT-3' and 5'-TCT TGG GTG GGT CAG GTT TG-3'; *TNF- α* : 5'-TCT TCT CGA ACC CCG AGT GA-3' and 5'-CCT CTG ATG

GCA CCA CCA G-3'; *TGFβ*: 5'-CAG CAA CAA TTC CTG CGC ATA-3' and 5'-AAG GCG AAA GCC CTC AAT TT-3'; *GAPDH*: 5'-CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA-3' and 5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3'; *TBP*: 5'-GAG AGC CAC GAA CCA CGG-3' and 5'-ACA TCA CAG CTC CCC ACC AT-3'; and *18S rRNA*: 5'-TAG GAA ACG GCT ACC ACA TC-3' and 5'-TAA CAG GGC CTC GAA AGA GT-3'. After 30 s at 95°C for Sso7d-fusion polymerase activation, amplification was allowed to proceed for 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 62°C for 5 s. Sevenfold serial dilutions of mixed cDNA (from different samples) were analyzed for each target gene, allowing us to construct linear standard curves from which the efficiency of each PCR run was evaluated. SYBR Green fluorescence was detected at the end of each elongation cycle, after which, a melting curve was constructed to confirm the specificity of the PCR products. Quantification was performed with Bio-Rad Laboratories CFX Manager software, and data were analyzed with the $\Delta\Delta Ct$ method. Ratios were calculated as the geometrical mean of $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ values, where E is the efficiency, and $\Delta\Delta Ct$ is the target gene expression of treated cells compared with normal levels in untreated cells, with correction for the expression of the reference genes *TBP*, *GAPDH*, and *18S rRNA*. Results were expressed as the fold-factor induction [i.e., ratio of $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of treated cells / $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of untreated cells].

Quantification of effector and tolerogenic moDC gene expression

Total RNA was extracted from 24 h-treated moDCs by use of RNeasy mini kits and the QIAcube robot (Qiagen, Courtaboeuf, France); cDNAs were obtained by use of TaqMan RT reagents (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). mRNA expression was evaluated by quantitative PCR on a 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystems) with predesigned TaqMan gene expression assays and reagents, according to the manufacturer's instructions. The expression of the following genes was assessed in moDCs, as described previously [48]: *GILZ* (Hs00608272_m1), *C1QA* (Hs00381122_m1), *CATC* (Hs00175188_m1), *Mx1* (Hs00895608_m1), and *NMES1* (Hs00260902_m1).

Data were interpreted for each target gene by comparison with endogenous β -actin (Hs99999903_m1) as a control. The relative amount of each target gene in each sample was calculated by comparison with the calibrator sample (untreated sample) by use of the $\Delta\Delta Ct$ method. The magnitude of gene induction was calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ for stimulated cells} - \Delta Ct \text{ for unstimulated cells})}$.

Immunoblot analysis of signaling pathways in moDCs

After PLB-Ect pretreatment and 30 min incubation with NiSO₄, moDCs (10⁶ cells/ml) were harvested and washed in cold PBS before lysis in 40 μ l lysis buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 7.4), 2 mM sodium pyrophosphate, 1% Triton, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM β -glycerophosphate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 100 μ g/ml pepstatin]. After centrifugation at 15,000 g for 20 min at 4°C, 50 μ g denatured protein was loaded onto 12.5% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes, which were successively incubated with antibodies directed against the phosphorylated forms of p38MAPK (Thr180/Tyr182) and the NF- κ B p65 subunit (Ser536) and an antibody against total p38MAPK as a loading control [all antibodies were from Cell Signaling Technology (Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France)]. Immunoreactive bands were detected by their chemiluminescence by use of the ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories). Bands were quantified with Image Lab software.

In some experiments, NF- κ B activation was also evaluated by a pull-down assay, as described previously [49]. In brief, after PLB-Ect pretreatment and 30 min incubation with NiSO₄, moDCs (10⁶ cells/ml) were lysed in NP-40 lysis hypertonic buffer (0.2% NP-40, 20% glycerol, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium pyrophosphate, 0.125 μ M okadaic acid, 62.5 mM EDTA, 40 μ M EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml pepstatin) and incubated with gentle agitation at 4°C for 30 min. Cell debris was removed by centrifugation at 4°C at 15,000 rpm for 20 min. The following 5'-biotin-labeled oligonucleotides (MWG Biotech) were hybridized: 5'-TTG AGG GGA

CTT TCC CAG G-3' and 5'-CCT GGG AAA GTC CCC TCA A-3', according to the human NF- κ B promoter sequence. Mutated oligonucleotides were used as control for nonspecific binding (5'-TTG AGG CGA CTT TCC CAG G-3' and 5'-CCT GGG AAA GTC GCC TCA A-3'). Whole-cell extracts (150 μ g) were incubated at 4°C for 90 min with 2 μ g double-stranded 5'-biotinylated oligonucleotide coupled to 30 μ l streptavidin-agarose beads (Sigma-Aldrich). Complexes were washed in binding buffer and eluted by boiling in reducing sample buffer before protein separation by SDS-PAGE gel, followed by Western blot analysis of the NF- κ B p65 subunit, as described above.

Fluorescence analysis of NF- κ B p65 subunit nuclear translocation in moDCs

moDCs (3 \times 10⁶ cells), treated with PLB-Ect, were stimulated with NiSO₄ or LPS for 45 min at 37°C, then permeabilized with 0.1% Triton X-100, and then incubated with an anti-NF- κ B p65 antibody (sc-109; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and then with a goat anti-rabbit antibody (Alexa 546). The cells were observed by fluorescence microscopy (Aristoplan; Zeiss).

moDC/T cell coculture

To assess T cell polarization, PLB-Ect-pretreated moDCs were cocultured with allogeneic, naive CD4⁺ T cells at a 1:10 DC/T cell ratio for 5 days, as described previously [48]. In brief, naive CD4⁺ T cells were isolated from PBMC by negative selection with the MACS Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). These naive T cells were confirmed to have purity >95%, based on CD4 and CD45RA expression evaluated by flow cytometry. Supernatants were analyzed for their cytokine content: IFN- γ , IL-13, IL-5, IL-4, and IL-9 production was quantified by use of a human cytokine bead kit (quantification range: 3.2–10,000 pg/ml; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and the Magpix system (Luminex, Austin, TX, USA). The results were analyzed according to the manufacturers' instructions.

Statistical analysis

Nonparametric analysis (Wilcoxon test for paired data) was performed by use of GraphPad Prism software. Data are expressed as means \pm SEM. $P < 0.05$ was considered to denote statistical significance.

RESULTS

Characterization of ectosome (PLB-Ect and PMN-Ect) and liposome preparations

Ectosomes were prepared from differentiated PLB-985 cultures (PLB-Ect) and from fresh human blood neutrophils (PMN-Ect). They were first identified by their size, as assessed by FSC and SSC signals (Fig. 1A). The FSC-SSC gate lower limit was set just above the background noise of the instrument. Then, we used Megamix submicrometer beads to adjust the upper side of the gate below the 0.9 μ m bead position; thus, the gate was set to detect particles below 900 nm. Finally, ectosomes were detected and discriminated from other particles though PKH67 dye and PS labeling with Annexin V-PE. Figure 1B shows that PLB-Ect were homogeneously double stained, although a small fraction of the population did not express PS. PMN-Ect were more heterogeneous, with far more unstained events and more ectosomes that did not express PS (Fig. 1C).

The size distribution of PLB-Ect was also analyzed by the DLS method, the results expressed as the intensity of scattered light, according to the particle diameter. This representation showed the presence of a moderate polydisperse ectosome population (polydispersity index = 0.33). However, most ectosomes had a diameter of \sim 200 nm (Fig. 1E).

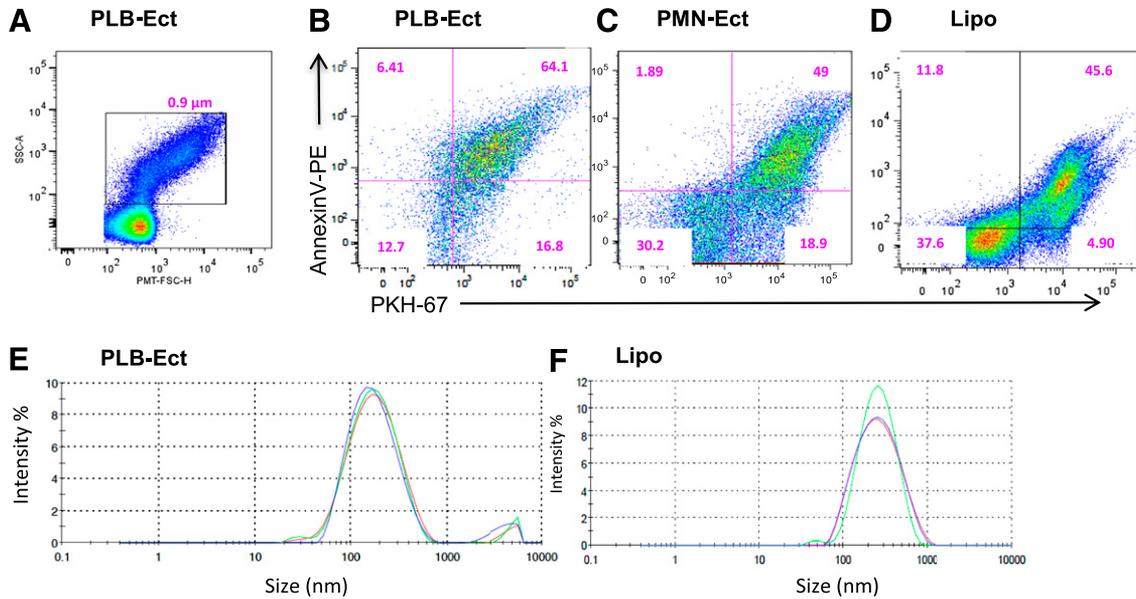


Figure 1. Characterization of ectosome and liposome preparations. Ectosomes prepared from PLB-985-differentiated cells (PLB-Ect) and fresh blood PMN (PMN-Ect), as well as liposomes were analyzed by flow cytometry with an LSR-Fortessa device (BD Biosciences). (A) Representative dot plots of PLB-Ect. SSC-A, SSC-area; PMT-FSC-H, PMT-FSC-height. (B) PLB-Ect staining with PKH67 and AnnexinV-PE. (C) PMN-Ect staining with PKH67 and AnnexinV-PE. (D) Liposome (Lipo) staining with PKH67 and AnnexinV-PE. (E and F) Evaluation of the size distribution of PLB-Ect and liposomes by DLS, showing diameter of ~200 nm. This figure is representative of at least 3 independent experiments.

Together, these results showed that PLB-985 cells were a suitable model for producing homogenous ectosomes. Thus, PLB-Ect were used for subsequent experiments.

As a control, liposomes of similar sizes were also prepared. As shown in Fig 1D and F, they also had a diameter of ~200 nm with moderate polydispersion.

PLB-Ect are internalized by immature moDCs

We first examined whether PLB-Ect interacted with immature moDCs. Thus, these cells were incubated for 4 h in the presence of PKH67-labeled PLB-Ect and then with LysoTracker Red, a lysosomal dye. Confocal microscopy showed green intracytoplasmic staining of all moDCs, suggesting ectosome internalization (Fig. 2A). Moreover, superposition of the 2 markers in immature moDCs (Fig. 2A and B) revealed their colocalization in ~50% of cells, suggesting that after internalization, ectosomes could be routed to the lysosomal compartment.

PLB-Ect prevent NiSO₄-induced moDC maturation

In the next step, we evaluated the potential modulation of moDC maturation by PLB-Ect. After incubation with PLB-Ect, moDCs were treated for 18 h with NiSO₄ or with LPS (positive control). Figure 3A shows representative histograms. In resting cells, PLB-Ect induced a small, nonsignificant increase in the expression of the studied surface markers (CD40, CD80, CD83, CD86, PDL-1, and HLA-DR; Fig. 3B). This was not a result of PLB-Ect endotoxin contamination, as levels were always <0.25 IU/ml. As expected, LPS alone induced moDC maturation, as shown by increased expression of all markers (Fig. 3B). Preincubation with PLB-Ect significantly decreased LPS-induced up-regulation of all

surface markers, with the following percentage reductions: CD40 (27 ± 5%), CD80 (12 ± 2%), CD83 (19 ± 2%), CD86 (20 ± 5%), and PDL-1 (19 ± 7%); HLA-DR expression was also reduced by 10 ± 3% (Fig. 3B). Up-regulation of all of the markers was also observed when NiSO₄ was used to induce moDC maturation, confirming the capacity of this chemical hapten to induce moDC maturation directly (Fig. 3B). Interestingly, PLB-Ect preincubation also significantly down-regulated this maturation-inducing effect, with the following percentage reductions: CD40 (24 ± 5%), CD80 (22 ± 6%), CD86 (26 ± 9%), HLA-DR (18 ± 5%), PDL-1 (22 ± 5%), and to a lesser extent, CD83 (5 ± 1%; Fig. 3B). Cell viability was determined by use of propidium iodide staining after 18 h and did not show any alteration in the presence of PLB-Ect (data not shown).

Together, these results suggested that based on membrane marker expression, PLB-Ect were able to prevent NiSO₄-induced moDC maturation as efficiently as they prevented LPS-induced maturation.

PLB-Ect reduce NiSO₄-induced cytokine production by moDCs

To document further the inhibitory effect of PLB-Ect on NiSO₄-induced moDC maturation, we first quantified the mRNA levels of several cytokines in moDCs by use of quantitative real-time PCR.

As shown in Fig. 4A, when PLB-Ect alone were incubated with moDCs in the absence of stimulus, no change was observed in any mRNA level. As expected, in the presence of NiSO₄ or LPS (control), the mRNA levels of proinflammatory cytokines were up-regulated. Interestingly, when PLB-Ect were added, the

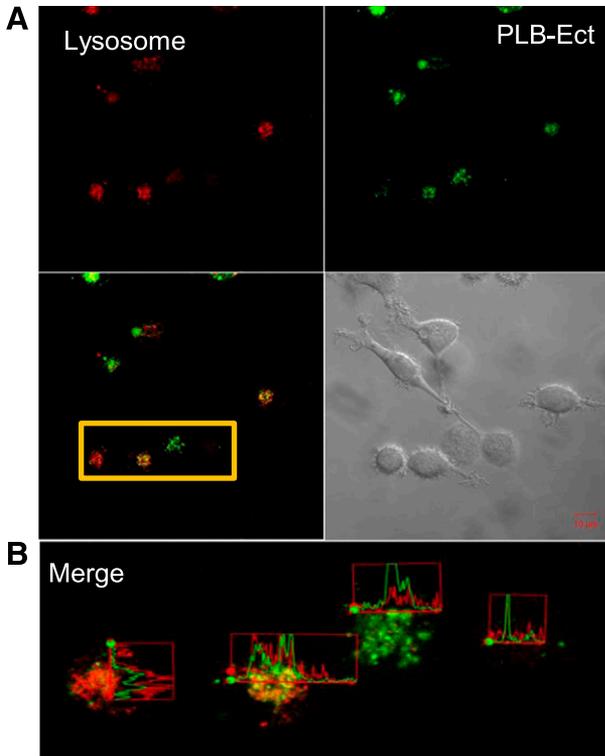


Figure 2. PLB-Ect are internalized by immature human moDCs and can be targeted to the lysosomal compartment. (A) moDCs were incubated with PLB-Ect labeled with PKH67 (green) for 4 h; then, DC lysosomes were stained with LysoTracker Red and analyzed by confocal microscopy. (B) Histograms of fluorescence intensity. Superposition of the 2 fluorescence signals in ~50% of the cells suggests that PLB-Ect can be routed to lysosomes. This figure is representative of 4 distinct experiments.

mRNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-12p40 fell significantly whether LPS or NiSO₄ was used as stimulus, with the following percentage reductions: with LPS as stimulus, IL-1 β (27 \pm 2%), IL-6 (55 \pm 12%), TNF- α (63 \pm 5%), and IL-12p40 (68 \pm 7%); with NiSO₄ as stimulus, IL-1 β (33 \pm 6%), IL-6 (42 \pm 7%), and TNF- α (40 \pm 9%). No significant change in the IL-8 mRNA level was observed (data not shown). NiSO₄ and LPS slightly reduced the mRNA levels of the regulatory mediators IL-10 and TGF- β , neither of which was modified significantly in the presence of ectosomes (data not shown).

To test whether the effect of PLB-Ect was persistent or transient, moDC were preincubated for 30 min with PLB-Ect and then washed before adding NiSO₄ or LPS. We found that IL-6 and IL-12p40 mRNA levels were still down-regulated after cell washing, suggesting that the response was rapidly induced and persisted even when PLB-Ect were removed from the culture medium (data not shown).

To test whether ectosome effects were related to their internalization, we preincubated moDCs with cytochalasin D (0.5 μ g/ml) for 30 min before washing. PLB-Ect were then added for 30 min before LPS or NiSO₄ stimulation. We found that CytoD preincubation had no effect on PLB-Ect-induced down-regulation of IL-6 and IL-12 mRNA levels in moDCs, suggesting

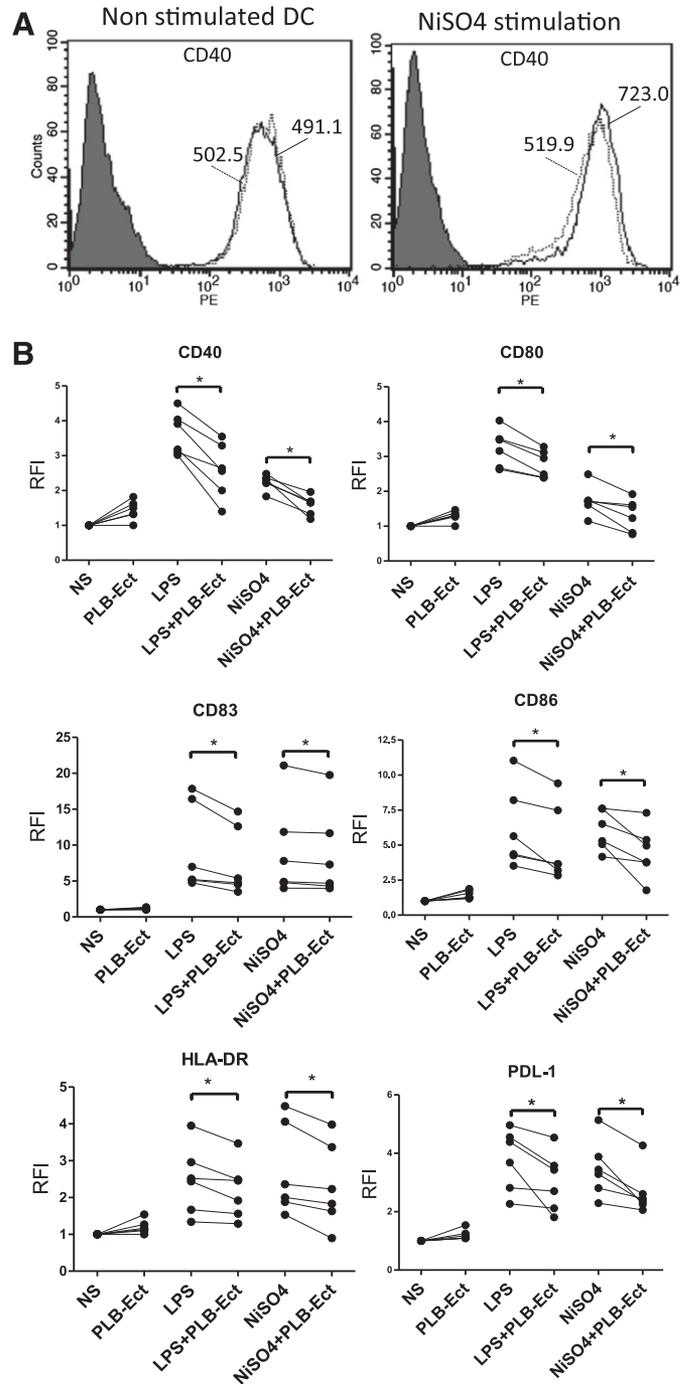


Figure 3. PLB-Ect modulate the expression of key surface markers of moDC maturation. moDCs were preincubated for 30 min with PLB-Ect or medium alone and then for 18 h with medium alone [nonstimulated (NS)], LPS (control stimulus), or NiSO₄. moDCs were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for membrane expression of CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, and PDL-1. (A) Representative histograms of CD40 expression on nonstimulated DCs (left) and NiSO₄-induced, stimulated DCs (right), without PLB-Ect (solid lines) or with PLB-Ect (dotted lines). Mean of fluorescence is indicated for each histogram. Isotype controls are in gray. (B) The results of 6 independent experiments are shown and expressed as the fold increase over nonstimulated. **P* < 0.05.

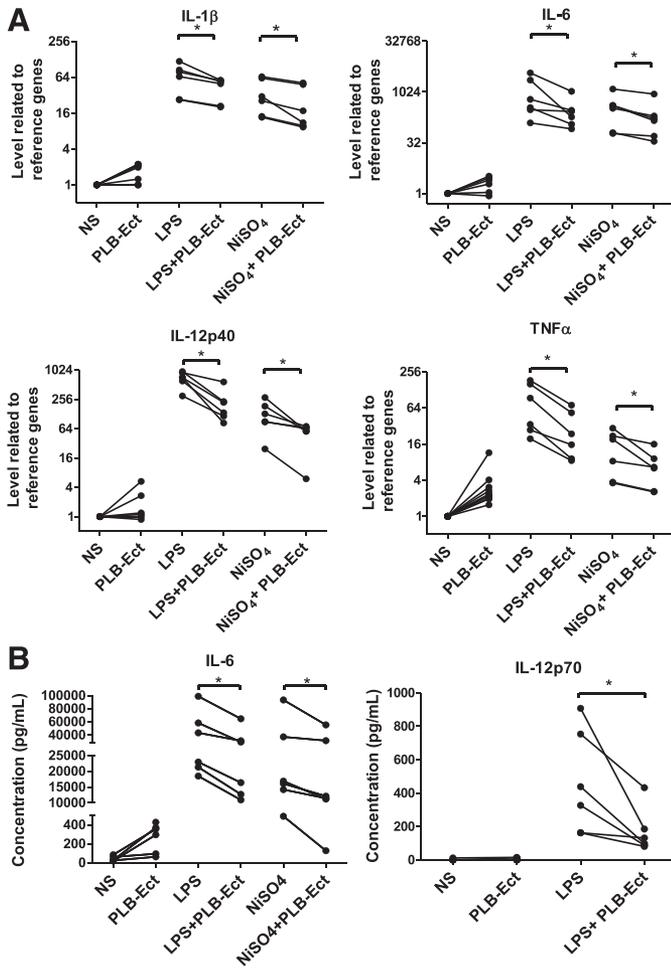


Figure 4. PLB-Ect modulate NiSO₄-induced proinflammatory cytokine production by moDCs at the mRNA and protein levels. (A) Expression of cytokine mRNA. Immature moDCs were preincubated for 30 min with PLB-Ect or medium alone and then for 4 h with medium alone, LPS (control stimulus), or NiSO₄. IL-1β, IL-6, IL-12p40, and TNF-α mRNAs were quantified by real-time RT-PCR. Results were normalized to nonstimulated. The results of 6 independent experiments are shown. *P < 0.05. (B) Cytokine release in moDC supernatants. Immature moDCs were preincubated for 30 min with PLB-Ect or medium alone and then for 18 h with medium alone, LPS (control stimulus), or NiSO₄. IL-6 and IL-12p70 levels are expressed in pg/ml. The results of 6 independent experiments are shown. *P < 0.05.

that external contact with cells was sufficient to induce the regulatory effect (data not shown).

Finally, to assess the proper effects of ectosomes, we also evaluated the effects of liposomes containing DOPC, CHOL, and PS on stimulated moDCs. As shown in Fig. 5, liposomes alone had no effect on moDC mRNA IL-6 and IL-12p40 levels. When preincubated before NiSO₄ or LPS activation, a decrease in IL-6 mRNA levels was observed, albeit significantly less marked than PLB-Ect-induced down-regulation. Similar but nonsignificant effects on IL-12 p40 mRNA levels were observed. These results suggest that ectosome lipids participate in the down-regulating effect but that other ectosome components are also involved.

We then examined whether these changes in gene expression could be observed at the protein level. Proinflammatory cytokine

levels were low or undetectable in the culture supernatants of moDCs, incubated or not incubated with PLB-Ect alone (Fig. 4B). As expected, NiSO₄ and LPS (control) both induced proinflammatory cytokine production (IL-6, IL-1β, IL-8, and TNF-α; data not shown). This production was down-regulated by PLB-Ect preincubation, but the effect was only significant for IL-6 (37 ± 3% and 34 ± 9% with LPS and NiSO₄, respectively; Fig. 4B). IL-12p70 release upon LPS activation was also strongly and significantly reduced in the presence of PLB-Ect (57 ± 9%; Fig. 4B), but as expected, IL-12p70 was not released upon NiSO₄ activation [6]. These results confirmed that PLB-Ect modulated NiSO₄-induced moDC maturation, as several proinflammatory cytokine genes were down-regulated, and IL-6 production was reduced.

The NF-κB and MAPK signaling pathways are involved in the inhibitory effects of PLB-Ect on NiSO₄-induced moDC maturation

The next step was to identify the intracellular signaling pathways that were modulated in the presence of PLB-Ect. As NiSO₄ and LPS are TLR4 ligands, they can induce NF-κB and p38MAPK

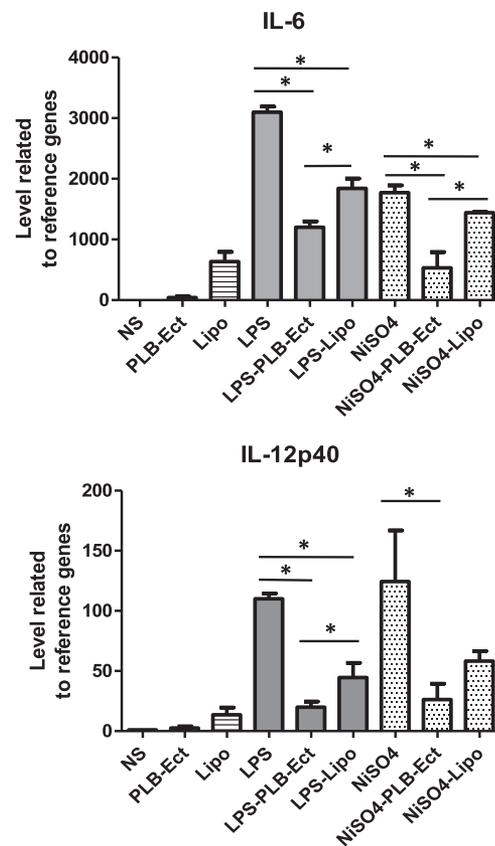


Figure 5. Comparison of PLB-Ect and liposome preincubation on IL-6 and IL-12p40 mRNA levels in stimulated moDCs. Immature moDCs were preincubated with PLB-Ect, liposomes, or medium alone for 30 min and then for 4 h with medium alone, LPS (control stimulus), or NiSO₄. IL-6 and IL-12p40 mRNAs were quantified by real-time RT-PCR. Results were normalized to nonstimulated. The results of 3 independent experiments are shown. *P < 0.05 compared with LPS or NiSO₄ alone.

activation in moDCs [6], in turn, modulating the expression of many proinflammatory genes. Thus, we investigated the impact of PLB-Ect on NiSO₄- and LPS-induced phosphorylation of the NF-κB p65 subunit and p38MAPK. As shown in **Fig. 6A**, PLB-Ect alone had little or no effect on either phosphorylation, whereas NiSO₄ alone induced NF-κB p65 and p38MAPK phosphorylation.

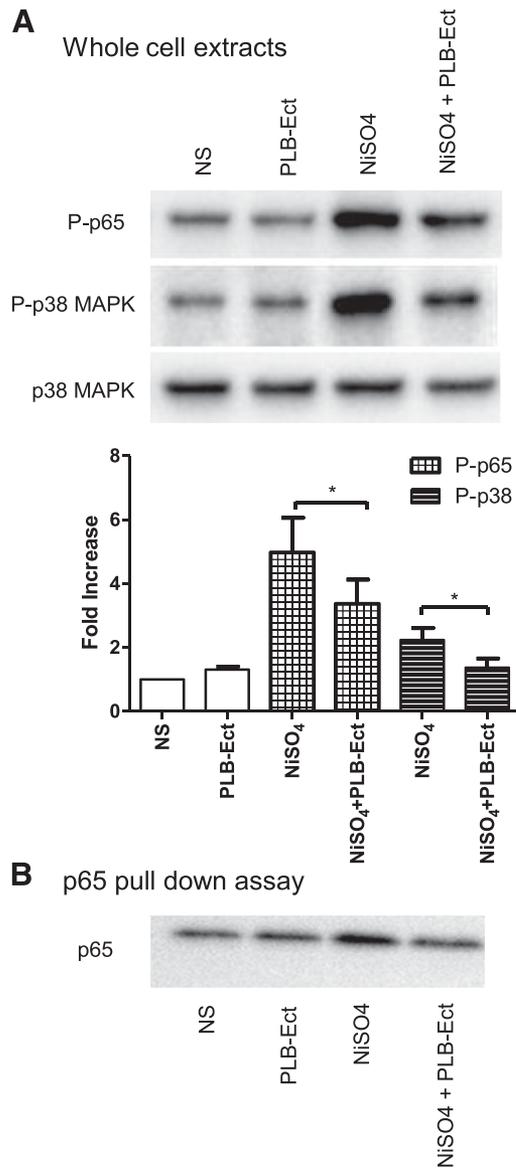


Figure 6. PLB-Ect reduce NiSO₄-induced phosphorylation of NF-κB p65 and p38MAPK in moDCs. moDCs were preincubated with PLB-Ect or medium alone for 30 min and then for an additional 30 min with medium alone (NS) or NiSO₄. (A) Immunoblotting of whole-cell extracts was used to quantify the phosphorylated forms of NF-κB p65 (P-p65) and p38MAPK (P-p38 MAPK). Bands were quantified by use of Image Lab software. Results are expressed as the fold induction, representing the normalized intensity of specific bands divided by the normalized intensity of untreated control cells. The results of 3 independent experiments are shown. **P* < 0.05. (B) p65 DNA-binding activity was evaluated by use of an oligonucleotide pull-down assay. This figure is representative of 3 independent experiments.

Interestingly, both phosphorylations were decreased significantly in the presence of PLB-Ect. Reduction percentages were 32.6 ± 4.3% for NF-κB p65 and 39.7 ± 2.7% for p38MAPK. Moreover, with the use of a pull-down assay, we confirmed that ectosomes reduced NF-κB p65 DNA-binding activity in NiSO₄-stimulated DCs (Fig. 6B).

We used immunofluorescence microscopy to investigate whether the decrease in the level of NF-κB phosphorylated p65 was related to dysregulation of NF-κB translocation to the nucleus. As shown in **Fig. 7**, NF-κB was cytoplasmic in most resting moDCs (90 ± 5% of cells; Fig. 7A) and in most moDCs incubated with PLB-Ect alone (86 ± 6% of cells; Fig. 7B). When moDCs were stimulated with NiSO₄, NF-κB p65 translocated to the nucleus in 65 ± 6% of cells (Fig. 7C). However, when PLB-Ect was added, this translocation was strongly and significantly inhibited, as only 7 ± 3% of the cells exhibited nuclear staining (Fig. 7D).

These results showed that the NF-κB and p38MAPK signaling pathways were modulated by PLB-Ect, leading to down-regulation of proinflammatory cytokine production in response to NiSO₄.

PLB-Ect drive NiSO₄-matured moDCs toward an effector phenotype

To understand better the functional consequences of DC modulation by ectosomes, we examined whether PLB-Ect were able to drive NiSO₄-activated moDCs toward a tolerogenic or an effector phenotype. Thus, we quantified the expression of the NMES1 and Mx1 genes (associated with effector DCs) or the CIQA, CATC, and GILZ genes [associated with tolerogenic DCs (regulatory DCs)], as recently described by Zimmer et al. [48]. We found that PLB-Ect did not significantly modify the NiSO₄-induced moDC effector phenotype, as shown by a trend toward an increase in NMES1 and Mx1 gene expression (**Fig. 8**). Similar effects were observed when cells were treated with LPS as a control. In contrast, a decrease in pan-regulatory DC markers (CIQA, CATC, and GILZ) was observed [48], whereas DEX (control) treatment of moDCs significantly up-regulated these genes (Fig. 8). Together, these data highlighted the capacity of PLB-Ect to drive effector rather than tolerogenic moDCs in the NiSO₄ and LPS maturation models.

PLB-Ect drive NiSO₄-matured moDCs to promote IL-13-producing CD4⁺ T cells

To identify the type of effector DCs (i.e., DC1, DC2) induced by PLB-Ect, we analyzed the polarization of naïve, allogeneic CD4⁺ T cells after coculture with treated moDCs, which were first incubated for 24 h with medium alone, PLB-Ect, LPS, LPS + PLB-Ect, NiSO₄, or NiSO₄ + PLB-Ect and then washed and cocultured with CD4⁺ T cells. Th polarization was analyzed after 5 days by evaluating cytokine levels in the culture supernatants (**Fig. 9**). PLB-Ect alone did not modify the CD4⁺ T cell cytokine pattern compared with unstimulated moDCs. As expected, LPS-treated moDCs induced strong IFN-γ secretion by T cells and a small IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 release. PLB-Ect + LPS-treated moDCs significantly reduced T cell production of IFN-γ, whereas up-regulating IL-5, IL-9, and IL-13 production compared with CD4⁺ T cells cocultured with LPS-treated moDCs in the absence of

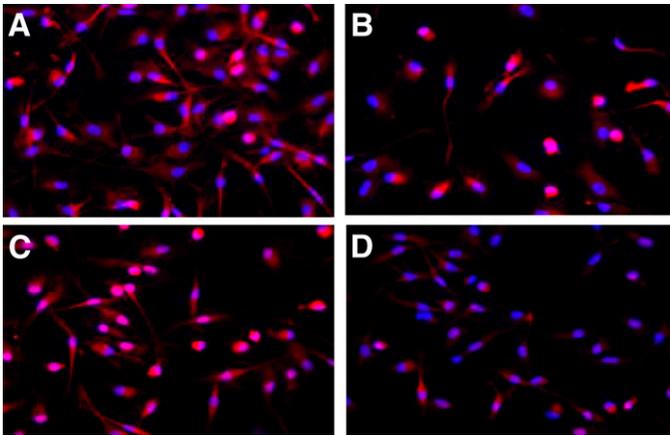


Figure 7. PLB-Ect reduce NF- κ B p65 nuclear translocation in NiSO₄-treated moDCs. moDCs were preincubated with PLB-Ect for 30 min or medium alone and then for 45 min with medium alone (A), medium + PLB-Ect (B), NiSO₄ alone (C), or NiSO₄ + PLB-Ect (D). Cells were then fixed, and their nuclei were stained with DAPI (blue), whereas NF- κ B p65 was stained with an anti-p65 rabbit antibody, followed by an Alexa 546-labeled anti-rabbit antibody (red), with analysis by immunofluorescence microscopy. The figure is representative of 3 independent experiments.

PLB-Ect. Interestingly, NiSO₄-treated moDCs decreased IFN- γ production by T cells, while inducing moderate IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 production by comparison with nonstimulated moDCs. Moreover, a significant increase in IL-13 release was induced by PLB-Ect in the NiSO₄ model. No effect of PLB-Ect could be evidenced on Th17 polarization (data not shown).

This confirms the impact of PLB-Ect on LPS- or NiSO₄-activated DCs and suggests that PLB-Ect might be critical for the induction of effector Th2 responses.

DISCUSSION

The role of neutrophils in the control of DC activation is of growing interest. In particular, ectosomes have been shown to regulate DC functions in response to microbial products, such as LPS. In this study, we examined the offset of nickel, known to bind TLR4 and to cause ACD, a common skin disease. We first developed a model to produce, characterize, and quantify ectosomes by use of human PLB-985 cells differentiated into fully mature neutrophils. Then, with the use of this new biologic tool, we showed that ectosomes modulated nickel-induced moDC maturation in vitro through a mechanism involving MAPK and NF- κ B regulation. These DCs exhibited an effector phenotype and promoted Th2 polarization.

The first step of this work was to develop a standardized method for ectosome production. We used the PLB-985 cell line, which can differentiate into fully mature, neutrophil-like cells. We and others [43, 45–47] have previously reported the ability of these differentiated PLB-985 cells to exhibit normal PMN functions, such as the oxidative burst, apoptosis, and netosis. Several authors have emphasized the importance of the preanalytic protocol for ex vivo ectosome production from fresh blood PMN: venopuncture, the time between blood collection and handling, as well as the conservation, centrifugation, and

washing steps are known to affect ectosome quality, whereas blood-derived preparations can contain contaminating micro-particles derived from other cell types [50–52]. Thus, we performed several experiments with the use of freshly isolated blood neutrophils from healthy volunteers in parallel to check the suitability of the PLB-985 model for ectosome production.

PLB-Ect were produced by use of a single, 40 min ultracentrifugation step to separate ectosomes from smaller vesicles, such as exosomes [53] [54]. These PLB-Ect were then characterized by use of 2 complementary methods: flow cytometry and DLS. Two markers were used for flow cytometric analysis, namely PKH67, an amphiphilic cell linker dye, and Annexin V, which binds to PS, highly expressed on ectosomes but not on exosomes

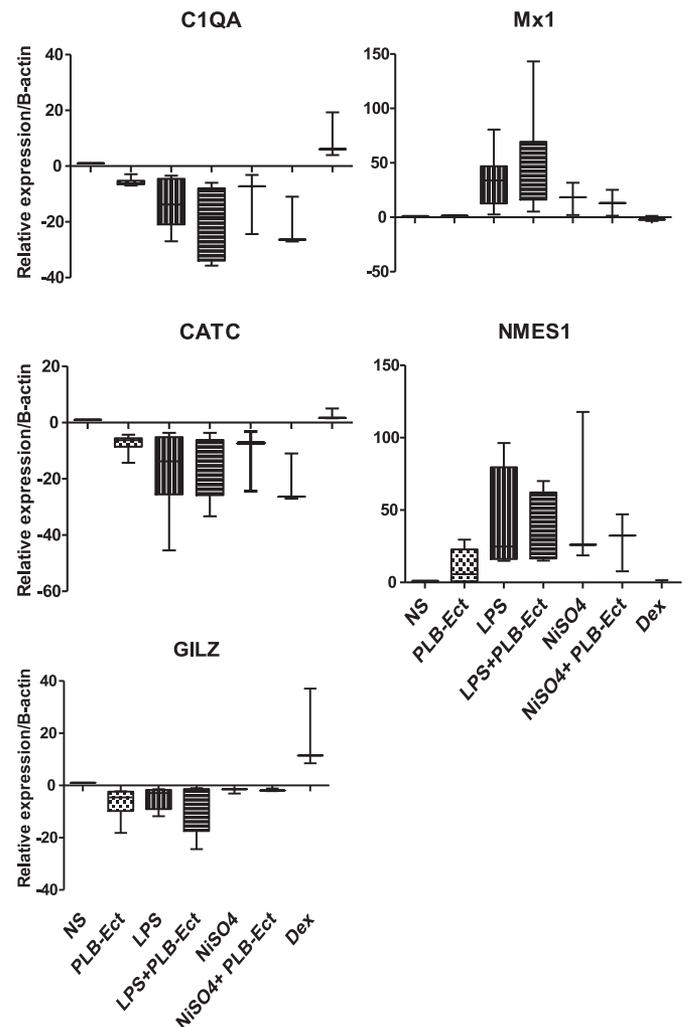


Figure 8. PLB-Ect affect NiSO₄-induced modulation of effector and tolerogenic gene expression in moDCs. moDCs obtained from 4 healthy donors were preincubated with PLB-Ect or medium alone and then cultured with medium (NS), LPS, or NiSO₄ for 24 h. Total RNA was isolated, and *CIQA*, *CATC*, *GILZ*, *Mx1*, and *NMES1* gene expression was evaluated by real-time PCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in treated moDCs compared with moDCs incubated in medium alone. Data are normalized to the amount of β -actin. Box plots indicate data distribution: horizontal lines in the boxes show the minimum value, 25th percentile, median, 75th percentile, and maximum value.

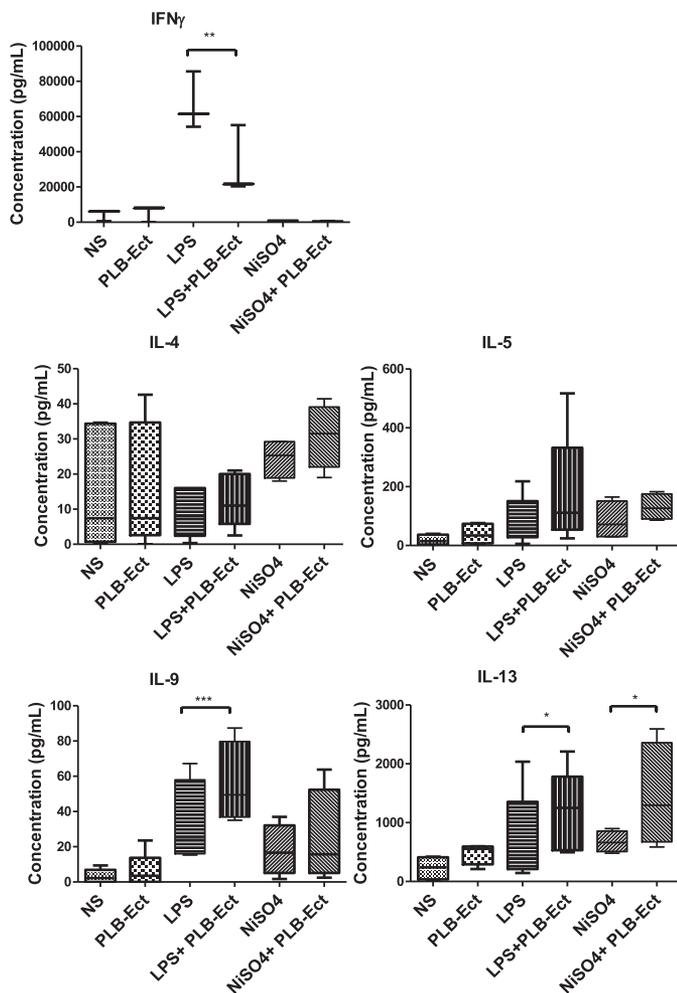


Figure 9. CD4⁺ T cells cocultured with PLB-Ect + NiSO₄-treated moDCs exhibit Th2-type polarization. moDCs left unstimulated (NS) or treated with PLB-Ect, LPS, LPS + PLB-Ect, NiSO₄, or NiSO₄ + PLB-Ect were washed and incubated with purified, allogeneic, naive CD4⁺ T cells for 5 days before cytokine measurement. Cytokine levels in supernatants were analyzed by use of a human cytokine bead kit. Box plots indicate data distribution: horizontal lines in the boxes show the minimum value, 25th percentile, median, 75th percentile, and maximum value (4 independent experiments). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

[20]. The use of the PLB-985 cell line avoided the need for neutrophil-specific labeling. PLB-Ect were also identified by their size with the use of calibrated beads ranging from 0.5 to 3 μm, as described previously [19, 55–57]. However, whereas most PLB-Ect were PKH67/Annexin V positive, some were Annexin V negative, suggesting the absence of PS on their surface. This was consistent with previous data showing that PS exposure on the outer membrane may be incomplete in some ectosomes, owing, in particular, to scramblase activity [58, 59]. Flow cytometry was also used to quantify PLB-Ect by use of a bead-based strategy, as recommended recently by the International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee [56]. Indeed, flow cytometry can detect not only single ectosomes but also swarms, potentially underestimating actual concentrations [60, 61], and the detection of 100–400 nm

particles can sometimes be imperfect. In addition to flow cytometry, we determined the relative size distribution of PLB-Ect by use of DLS analysis, a method for analyzing particles ranging in size between 1 nm and 6 μm [50]. We found that PLB-Ect exhibited a moderately polydisperse size distribution with a diameter of ~200 nm, in accordance with previous studies, thus excluding significant contamination by exosomes [29]. Thus, we show for the first time that differentiated PLB-985 cells are suitable for the production of large quantities of ectosomes with size and other characteristics similar to those derived from freshly isolated blood neutrophils. Moreover, control liposomes of similar size were specifically produced for the present study, with a lipid composition close to that of the plasmic membrane.

We then assessed the ability of PLB-Ect to modulate nickel-induced moDC maturation and function to better understand one of the mechanisms potentially involved in the interactions between PMN and DCs during the elicitation phase of ACD. We first examined the intracellular localization of PLB-Ect internalized by moDCs and found that most of them localized within the lysosomal compartment. This suggested that ectosomes were mainly internalized by endocytosis. This is in keeping with data from Gasser and Schifferli [62], who found that PMN-Ect internalization by macrophages was blocked by cytochalasin D, a phagocytosis inhibitor. Similar observations have been reported for platelet-derived microparticle uptake by endothelial cells [63]. PLB-Ect, routing to DC lysosomes, might be related to PS exposure, as PS is recognized by many receptors, including scavenger receptors expressed by phagocytic cells.

The next step was to document the effect of PLB-Ect on moDC maturation in response to nickel. In vivo, resident DCs are the first immune cells to be exposed to chemical sensitizers. We have shown previously that in vitro, a metallic compound, such as NiSO₄, acts as danger signals, inducing DC maturation by activating the MAPK, NF-κB, and IRF1 pathways [5, 6, 64, 65]. More recently, it was shown that nickel and cobalt bind to TLR4 via 2 nonconserved histidine residues, leading to signal transduction and the production of proinflammatory cytokines [3, 4]. Thus, we used LPS, a major TLR4 ligand, as a positive control, comparing the effects of LPS and NiSO₄ on moDC maturation in the presence and absence of PLB-Ect. We confirmed that in response to NiSO₄ or LPS, moDCs undergo a maturation process, leading to up-regulation of costimulatory molecules (CD40, CD80, CD86), MHC class II molecules, and CD83. PLB-Ect alone did not modulate the expression of these molecules but down-regulated their NiSO₄- and LPS-induced up-regulation. These results are in keeping with those of Eken et al. [19], who showed that blood PMN-Ect down-regulate LPS-induced moDC maturation. Similar changes in the moDC phenotype have been observed in the presence of ectosomes released by stored platelet concentrates [66]. We further analyzed DC phenotypic changes by studying PDL-1 expression. We evidenced LPS- and NiSO₄-induced PDL-1 up-regulation at the moDC surface, confirming data from a recent study of Langerhans cells [67]. These findings are consistent with other works, showing that some chemical sensitizers, such as cinnamaldehyde, eugenol, and isogenol, can also induce PDL-1 up-regulation at the DC surface [68]. Moreover, we found, for

the first time, that PLB-Ect can decrease LPS- and NiSO₄-induced PDL-1 up-regulation, suggesting that ectosomes might influence T cell activation and polarization during ACD.

Another major consequence of DC maturation is cytokine production. We have reported previously NiSO₄-induced production of IL-6, IL-8, and IL-12p40 by moDCs [5, 65]. Here, we found that PLB-Ect alone did not induce cytokine production. In contrast, PLB-Ect down-regulated NiSO₄-induced IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-12p40 mRNA and IL-6 protein production in moDCs. These results are in agreement with previous studies showing that neutrophil-derived ectosomes can hinder the release of some proinflammatory cytokines by zymosan A-stimulated macrophages [62] and by LPS-stimulated moDCs [19]. Platelet-derived ectosomes can also reduce TNF- α and IL-10 release by macrophages and inhibit LPS-induced maturation of moDCs [37]. Interestingly, we observed a decrease in IL-6 and IL-12p40 mRNA levels in the presence of liposomes, suggesting that lipids from ectosomes participate in the regulatory effect but that other ectosome components are also involved. These results are in accordance with those of Chen and coworkers [69, 70], who described PS-mediated IL-12 down-regulation in DCs.

We then examined the intracellular signaling pathways potentially modulated by PLB-Ect and resulting in cytokine down-regulation. We have shown previously that nickel can induce MAPK and NF- κ B protein phosphorylation [5, 64, 65]. Here, we found that PLB-Ect reduced NF- κ B p65 and p38MAPK phosphorylation and NF- κ B p65 nuclear translocation in nickel-stimulated moDCs. These actions could explain the observed cytokine down-regulation, as both signaling pathways are strongly involved in TLR4 agonist-related cytokine release.

To understand better the functional consequences of the down-regulating effect of PLB-Ect on moDC maturation, we studied their ability to drive moDC and T cell polarization. Zimmer et al. [48] recently defined molecular signatures of effector and regulatory DCs, and we took advantage of this finding to study the impact of PLB-Ect on LPS- and NiSO₄-activated moDCs. Although PLB-Ect down-regulated moDC maturation in response to both stimuli, the resulting DCs exhibited no increase in pan-regulatory DC markers (GILZ, CATC, and C1QA) but rather, expressed higher levels of DC effector markers (Mx1 and NMES1). To investigate whether these NiSO₄-induced effector moDCs would affect T cell polarization, cocultures were performed by use of moDCs, treated or not with PLB-Ect. We report for the first time that in the absence of PLB-Ect, NiSO₄-treated moDCs cannot trigger high IFN- γ production by T cells, as can LPS-treated moDCs; conversely, Th2 cytokines and IL-9 are similarly produced by use of both DC stimuli. These new findings are in keeping with some clinical studies that documented the ex vivo production of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) by CD4⁺ T cells from nickel-allergic patients [71–73]. In the presence of PLB-Ect, this Th2 response was maintained or even enhanced in our cocultures, depending on the cytokine; in particular, the IL-13 up-regulation was observed when moDCs were exposed to NiSO₄ but also to LPS. In addition, PLB-Ect decreased the IFN- γ production in the LPS model, suggesting Th1 modulation too. Together, these

results highlight the modulatory function of ectosomes that could contribute to Th polarization driving, specifically in this in vitro model of ACD.

Therefore, we describe a new mechanism of DC modulation by neutrophils that may be involved in nickel-related ACD, a disorder in which both cell types are present in the skin. Indeed, in vitro, PLB-Ect (a model of neutrophil ectosomes) modulated nickel-induced moDC maturation and promoted a Th2 response. These observations further highlight the role of neutrophils in the regulation of DC activation, notably in response to NiSO₄, a common danger signal.

AUTHORSHIP

I.T., Y.G., A.G., and S.C.-M. conceived of and designed the experiments. I.T., Y.G., C.G., H.T., C.A.S., R.G., and H.G.-G. performed the experiments. I.T., Y.G., A.G., S.K.-R., M.P., L.M., and S.C.-M. analyzed the results. I.T., A.G., and S.C.-M. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Laurence Delbos from the IPSIT Immunomonitoring Platform (PLAIMMO) for help with flow cytometric analysis of ectosomes, Claudine Deloménie from the IPSIT Transcriptomic and Proteomic Platform (TRANSPROT) for quantitative real-time PCR, and Valérie Nicolas from the IPSIT Cellular Imaging Platform (MIPSIT) for confocal analysis of DCs. The authors also thank Dr. Marie-Geneviève Huisse from the Hematology Department of Hospital Bichat, Paris, for helpful discussions on microparticles and Armelle Biola-Vidamment from INSERM UMR 996 for her help with pull-down assays.

DISCLOSURES

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., Gaspari, A. A. (2012) Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 114–124.
- Martin, S. F. (2012) Allergic contact dermatitis: xenoinflammation of the skin. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 720–729.
- Raghavan, B., Martin, S. F., Esser, P. R., Goebeler, M., Schmidt, M. (2012) Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep.* **13**, 1109–1115.
- Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P. J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S. F., Freudenberg, M. A., Goebeler, M. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* **11**, 814–819.
- Antonios, D., Ade, N., Kerdine-Römer, S., Assaf-Vandecasteele, H., Larangé, A., Azouri, H., Pallardy, M. (2009) Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. *Toxicol. In Vitro* **23**, 227–234.
- Antonios, D., Rousseau, P., Larangé, A., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M. (2010) Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO₄. *J. Immunol.* **185**, 89–98.
- Engeman, T., Gorbachev, A. V., Kish, D. D., Fairchild, R. L. (2004) The intensity of neutrophil infiltration controls the number of

- antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 941–949.
8. Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G., Nicolas, J. F. (2009) Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* **64**, 1699–1714.
 9. Martin, S. F. (2012) Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Exp. Dermatol.* **21**, 382–389.
 10. Martin, S. F., Esser, P. R., Weber, F. C., Jakob, T., Freudenberg, M. A., Schmidt, M., Goebeler, M. (2011) Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* **66**, 1152–1163.
 11. Nauseef, W. M., Borregaard, N. (2014) Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* **15**, 602–611.
 12. Jönsson, F., Mancardi, D. A., Albanesi, M., Bruhns, P. (2013) Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 643–656.
 13. Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175.
 14. Schuster, S., Hurrell, B., Tacchini-Cottier, F. (2013) Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 671–675.
 15. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531.
 16. Van Gisbergen, K. P., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y. (2005) Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* **26**, 626–631.
 17. Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P., Oppenheim, J. J. (2009) Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* **30**, 531–537.
 18. Barrientos, L., Bignon, A., Gueguen, C., de Chaisemartin, L., Gorges, R., Sandré, C., Mascarell, L., Balabanian, K., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., Marin-Esteban, V., Chollet-Martin, S. (2014) Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **193**, 5689–5698.
 19. Eken, C., Gasser, O., Zenhausem, G., Oehri, I., Hess, C., Schifferli, J. A. (2008) Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **180**, 817–824.
 20. Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* **19**, 43–51.
 21. Mause, S. F., Weber, C. (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* **107**, 1047–1057.
 22. Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593.
 23. Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R. (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* **64**, 676–705.
 24. Angelillo-Scherrer, A. (2012) Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ. Res.* **110**, 356–369.
 25. Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., Touyz, R. M. (2013) Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci.* **124**, 423–441.
 26. Morel, O., Morel, N., Jesel, L., Freyssinet, J. M., Toti, F. (2011) Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin. Immunopathol.* **33**, 469–486.
 27. Montoro-García, S., Shantsila, E., Marín, F., Blann, A., Lip, G. Y. (2011) Circulating microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 911–923.
 28. Beyer, C., Pisetsky, D. S. (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 21–29.
 29. György, B., Szabó, T. G., Turiák, L., Wright, M., Herczeg, P., Lédeczi, Z., Kittel, A., Polgár, A., Tóth, K., Dérfalvi, B., Zelenák, G., Böröcz, I., Carr, B., Nagy, G., Vékey, K., Gay, S., Falus, A., Buzás, E. I. (2012) Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS ONE* **7**, e49726.
 30. Huisse, M. G., Pease, S., Hurtado-Nedelec, M., Arnaud, B., Malaquin, C., Wolff, M., Gougerot-Pocidallo, M. A., Kermarrec, N., Bezeaud, A., Guillin, M. C., Paoletti, X., Chollet-Martin, S. (2008) Leukocyte activation: the link between inflammation and coagulation during heatstroke. A study of patients during the 2003 heat wave in Paris. *Crit. Care Med.* **36**, 2288–2295.
 31. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C. (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* **123**, 1603–1611.
 32. Pisetsky, D. S., Gauley, J., Ullal, A. J. (2011) Microparticles as a source of extracellular DNA. *Immunol. Res.* **49**, 227–234.
 33. Ardoin, S. P., Shanahan, J. C., Pisetsky, D. S. (2007) The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand. J. Immunol.* **66**, 159–165.
 34. Kornek, M., Lynch, M., Mehta, S. H., Lai, M., Exley, M., Afdhal, N. H., Schuppan, D. (2012) Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **143**, 448–458.
 35. Reid, V. L., Webster, N. R. (2012) Role of microparticles in sepsis. *Br. J. Anaesth.* **109**, 503–513.
 36. Timár, C. I., Lorincz, A. M., Csépanyi-Kömi, R., Vályi-Nagy, A., Nagy, G., Buzás, E. I., Iványi, Z., Kittel, A., Powell, D. W., McLeish, K. R., Ligeti, E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood* **121**, 510–518.
 37. Sadallah, S., Eken, C., Schifferli, J. A. (2011) Ectosomes as immunomodulators. *Semin. Immunopathol.* **33**, 487–495.
 38. Sadallah, S., Eken, C., Schifferli, J. A. (2011) Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **163**, 26–32.
 39. Pliyev, B. K., Kalintseva, M. V., Abdulaeva, S. V., Yarygin, K. N., Savchenko, V. G. (2014) Neutrophil microparticles modulate cytokine production by natural killer cells. *Cytokine* **65**, 126–129.
 40. Dalli, J., Norling, L. V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K. Y., Perretti, M. (2008) Annexin I mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* **112**, 2512–2519.
 41. Eken, C., Martin, P. J., Sadallah, S., Treves, S., Schaller, M., Schifferli, J. A. (2010) Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *J. Biol. Chem.* **285**, 39914–39921.
 42. Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S., Schifferli, J. A. (2013) Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology* **218**, 382–392.
 43. Duarte, T. A., Noronha-Dutra, A. A., Nery, J. S., Ribeiro, S. B., Pitanga, T. N., Lapa E Silva, J. R., Arruda, S., Boéchat, N. (2012) *Mycobacterium tuberculosis*-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. *Tuberculosis (Edinb.)* **92**, 218–225.
 44. Sémiramoth, N., Gleizes, A., Turbica, I., Sandré, C., Gorges, R., Kansau, I., Servin, A., Chollet-Martin, S. (2009) *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 310–321.
 45. Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–252.
 46. Frey, B., Gaipal, U. S. (2011) The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Semin. Immunopathol.* **33**, 497–516.
 47. Lygre, H., Moe, G., Skålevik, R., Holmsen, H. (2003) Interaction of triclosan with eukaryotic membrane lipids. *Eur. J. Oral Sci.* **111**, 216–222.
 48. Zimmer, A., Bouley, J., Le Mignon, M., Pliquet, E., Horiot, S., Turfkruyer, M., Baron-Bodo, V., Horak, F., Nony, E., Louise, A., Moussu, H., Mascarell, L., Moingeon, P. (2012) A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1020–1030.
 49. Larangé, A., Antonios, D., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S. (2009) TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 673–683.
 50. Van der Pol, E., Hoekstra, A. G., Sturk, A., Otto, C., van Leeuwen, T. G., Nieuwland, R. (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2596–2607.
 51. Van Ierssel, S. H., Van Craenenbroeck, E. M., Conraads, V. M., Van Tendeloo, V. F., Vrints, C. J., Jorens, P. G., Hoymans, V. Y. (2010) Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb. Res.* **125**, 332–339.
 52. Ayers, L., Kohler, M., Harrison, P., Sargent, I., Dragovic, R., Schaap, M., Nieuwland, R., Brooks, S. A., Ferry, B. (2011) Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb. Res.* **127**, 370–377.
 53. Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3, Unit 3 22.
 54. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., Sixma, J. J. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**, 3791–3799.
 55. Jy, W., Minagar, A., Jimenez, J. J., Sheremata, W. A., Mauro, L. M., Horstman, L. L., Bidot, C., Ahn, Y. S. (2004) Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front. Biosci.* **9**, 3137–3144.
 56. Van der Pol, E., van Gemert, M. J., Sturk, A., Nieuwland, R., van Leeuwen, T. G. (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 919–930.
 57. Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J. C., Schifferli, J. A. (2003) Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Cell Res.* **285**, 243–257.
 58. Shet, A. S. (2008) Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc. Health Risk Manag.* **4**, 769–774.
 59. Larson, M. C., Woodliff, J. E., Hillery, C. A., Kearn, T. J., Zhao, M. (2012) Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1501–1507.
 60. Yuana, Y., Oosterkamp, T. H., Bahatyrova, S., Ashcroft, B., Garcia Rodriguez, P., Bertina, R. M., Osanto, S. (2010) Atomic force microscopy:

- a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 315–323.
61. Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P., Kasthuri, R. S., Key, N. S., Dignat-George, F.; ISTH SSC Workshop. (2010) Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2571–2574.
 62. Gasser, O., Schifferli, J. A. (2004) Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* **104**, 2543–2548.
 63. Faille, D., El-Assaad, F., Mitchell, A. J., Alessi, M. C., Chimini, G., Fusai, T., Grau, G. E., Combes, V. (2012) Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 1731–1738.
 64. Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 390–399.
 65. Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boisleve, F., Rousset, F., Pallardy, M. (2007) NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO₄ but not by DNCB. *Toxicol. Sci.* **99**, 488–501.
 66. Sadallah, S., Eken, C., Martin, P. J., Schifferli, J. A. (2011) Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *J. Immunol.* **186**, 6543–6552.
 67. Hitzler, M., Majdic, O., Heine, G., Worm, M., Ebert, G., Luch, A., Peiser, M. (2012) Human Langerhans cells control Th cells via programmed death-ligand 1 in response to bacterial stimuli and nickel-induced contact allergy. *PLoS ONE* **7**, e46776.
 68. Williams, E. H., Williams, C. A., McLeod, J. D. (2010) Identification of PDL-1 as a novel biomarker of sensitizer exposure in dendritic-like cells. *Toxicol. In Vitro* **24**, 1727–1735.
 69. Chen, X., Doffek, K., Sugg, S. L., Shilyansky, J. (2004) Phosphatidylserine regulates the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 2985–2994.
 70. Doffek, K., Chen, X., Sugg, S. L., Shilyansky, J. (2011) Phosphatidylserine inhibits NFkB and p38 MAPK activation in human monocyte derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* **48**, 1771–1777.
 71. Moed, H., Boorsma, D. M., Stoof, T. J., von Blomberg, B. M., Bruynzeel, D. P., Scheper, R. J., Gibbs, S., Rustemeyer, T. (2004) Nickel-responding T cells are CD4+ CLA+ CD45RO+ and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. *Br. J. Dermatol.* **151**, 32–41.
 72. Jakobson, E., Masjedi, K., Ahlberg, N., Lundeberg, L., Karlberg, A. T., Scheynius, A. (2002) Cytokine production in nickel-sensitized individuals analysed with enzyme-linked immunospot assay: possible implication for diagnosis. *Br. J. Dermatol.* **147**, 442–449.
 73. Minang, J. T., Troye-Blomberg, M., Lundeberg, L., Ahlberg, N. (2005) Nickel elicits concomitant and correlated in vitro production of Th1-, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. *Scand. J. Immunol.* **62**, 289–296.

KEY WORDS:

chemical sensitizer · contact dermatitis · inflammation regulation · microparticles

Titre : Effet des agrégats de protéines sur la maturation des cellules dendritiques. Implication dans l'immunogénicité des protéines thérapeutiques

Mots clés : Cellule dendritique, agrégats, protéines thérapeutiques, signaux de danger

Résumé : Un inconvénient majeur de l'utilisation des protéines thérapeutiques est leur immunogénicité, c'est-à-dire le déclenchement chez les patients d'une réponse immunitaire, avec production d'anticorps (anti-drug antibodies, ADA). Parmi les facteurs contributifs, les agrégats de protéines dans les spécialités administrées pourraient jouer un rôle majeur dans l'immunogénicité. Par ailleurs, la présence d'ADA de haute affinité et de divers isotypes suggère la mise en place d'une réponse immunitaire classique, faisant intervenir les cellules présentatrices d'antigènes et plus particulièrement les cellules dendritiques.

Nous avons développé un modèle d'étude de l'impact d'agrégats de protéines sur la maturation de cellules dendritiques, dérivées de monocytes isolés du sang (moDC). Dans ce but, des agrégats d'hormone de croissance (GH) et d'anticorps (Rituximab) ou d'IgG1 polyclonale ont été produits et caractérisés.

Nous avons montré que ces agrégats induisent la maturation des moDC, objectivée par une augmentation de l'expression de marqueurs d'activation et de co-stimulation (CD40, CD80, CD83, CD86 et HLA-DR), et par l'augmentation de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10).

En utilisant un modèle de co-culture allogénique, nous avons montré que les moDC stimulées par les agrégats induisent la prolifération de lymphocytes TCD4+, dont la polarisation dépendait de la nature de la protéine. Ainsi les agrégats de GH conduisent à une production majoritaire d'IFN γ , signe d'une réponse de type Th1, tandis que les agrégats d'anticorps induisent une réponse mixte, Th1, Th2, Th17 (production d'IFN γ , IL-5, IL-13 et IL-17).

Enfin, nous avons commencé l'étude des mécanismes intra cellulaires impliqués dans l'activation des moDC, en montrant que les agrégats de GH induisent la phosphorylation de p38MAPK, ERK, JNK et NF- κ B (p65). Ces mêmes voies de signalisation sont impliquées dans l'expression de CXCL10, chimiokine connue pour induire la polarisation Th1.

Au final, ces résultats confirment l'effet immunomodulateur des agrégats de protéines sur les cellules dendritiques et précisent leur rôle de signal de danger conduisant à la mise en place d'une réponse immunitaire contre les protéines thérapeutiques.

Title: Effects of protein aggregates on Dendritic Cell maturation. Implication for immunogenicity of therapeutic proteins

Keywords : Dendritic cell, aggregates, therapeutic protein, danger signal

Abstract : A major drawback in therapeutic biological products (BP) use is the development of anti-drug antibodies (ADA) in patients. Among other factors, BP aggregates seems to play a major role in immunogenicity. Moreover, the presence of ADA with high affinity and different isotypes suggest a CD4 T-cell dependent immune response and therefore a pivotal role for antigen presenting cells, such as dendritic cells (DC).

In order to determine if BP aggregates participate to DC activation, aggregates form human growth hormone (GH) and antibodies (Rituximab and polyclonal IgG1) were produced and characterized. Their impact was tested on a model of monocyte-derived dendritic cells (mo-DC).

We have shown aggregates were able to induce moDC maturation, as observed with increase of key co-stimulatory and maturation markers (CD40, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR), and by increase of pro-inflammatory cytokines and chemokines (IL-6, IL-8, IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL10).

Using an allogenic model of co-culture, we have shown that moDC stimulated with aggregates were able to induce CD4⁺ T cells proliferation. Polarization was different following the nature of the protein. GH aggregates were able to induce IFN γ , sign of Th1 response, whereas antibody aggregates induced Th1, Th2, Th17 mix response (with production of IFN γ , IL-5, IL-13 and IL-17).

Finally, we started to study intracellular mechanisms involved in moDC activation, by showing that GH aggregates were able to induce p38MAPK, ERK, JNK and NF- κ B (p65) phosphorylation. These pathways are involved in CXCL10 expression, which is implicated in Th1 polarization.

These results confirmed the immunomodulatory effect of protein aggregates on DC and their role as danger signal, inducing an immune response against therapeutic proteins.

