



HAL
open science

Stratégies thérapeutiques contre la réponse immunitaire anti-Facteur VIII chez l'hémophile A : par modification de la structure du FVIII, par inhibition de la signalisation des lymphocytes B

Sandrine Delignat-Heudier

► **To cite this version:**

Sandrine Delignat-Heudier. Stratégies thérapeutiques contre la réponse immunitaire anti-Facteur VIII chez l'hémophile A : par modification de la structure du FVIII, par inhibition de la signalisation des lymphocytes B. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066002 . tel-01537891

HAL Id: tel-01537891

<https://theses.hal.science/tel-01537891>

Submitted on 13 Jun 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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI
PIERRE ET MARIE CURIE**

ECOLE DOCTORALE : Physiologie, Physiopathologie et thérapeutique

Spécialité : Immunologie

Présentée par :

Sandrine DELIGNAT-HEUDIER

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université Paris VI

Sujet de la thèse

**Stratégies thérapeutiques contre la réponse immunitaire anti-
Facteur VIII chez l'hémophile A :
par modification de la structure du FVIII,
par inhibition de la signalisation des lymphocytes B**

Soutenue le 25 Janvier 2017

Devant le jury composé de :

| | |
|--|----------------------|
| Mme Isabelle CREMER , Professeur, Université Paris VI | (Présidente) |
| Mr Jean-Marie SAINT-REMY , Professeur, Université Catholique de Louvain | (Rapporteur) |
| Mr Roberto MALLONE , Directeur de recherche, INSERM | (Rapporteur) |
| Mme Sophie SIBERIL , Maitre de conférences, Université Paris VI | (Examinatrice) |
| Mr Olivier CHRISTOPHE , Chargé de recherche, INSERM | (Examineur) |
| Mr Sébastien LACROIX-DESMAZES , Directeur de recherche, INSERM | (Directeur de thèse) |

RESUME

L'hémophilie A est une maladie génétique rare liée au chromosome X, qui se traduit par une expression de facteur VIII (FVIII) de la coagulation insuffisante. L'absence de FVIII fonctionnel entraîne des troubles hémorragiques qui peuvent être fatales. La thérapie substitutive par perfusion de FVIII exogène entraîne l'apparition d'anticorps anti-FVIII appelés « inhibiteurs » chez 5 à 30% des patients hémophiles A, et mène à une impasse thérapeutique. Si de nombreuses investigations ont permis de caractériser les effecteurs lymphocytaires T et B impliqués dans cette réponse, elles n'ont pour le moment pas permis de proposer aux patients des stratégies thérapeutiques pour prévenir l'apparition de la réponse immunitaire anti-FVIII. Actuellement seules des stratégies curatives destinées à éradiquer les inhibiteurs sont proposées au patient. La stratégie la plus largement utilisée consiste en l'administration répétée de fortes doses de FVIII sur une longue période. Ce protocole appelé ITI en plus d'être contraignant pour le patient, est extrêmement coûteux et efficace dans seulement 60 à 80% des cas.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à prévenir la réponse immunitaire anti-FVIII en inhibant la capture et l'apprêtement antigénique du FVIII par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Précédemment au laboratoire, il avait été décrit que les deux structures hautement mannosylées présentes au niveau des domaines A1 et C1 du FVIII, sur les Asn 239 et 2118 respectivement, étaient reconnues par le CD206 exprimés par les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (MO-DCs), et que cette voie d'endocytose menait à l'apprêtement antigénique du FVIII. Par mutagenèse dirigée, j'ai montré que l'élimination de la glycosylation en 2118 est suffisante pour abroger la présentation antigénique du FVIII aux lymphocytes T CD4⁺ par les MO-DCs *in vitro*. L'introduction de mutation en 2118 n'a néanmoins pas altéré l'immunogénicité du FVIII chez la souris déficiente en FVIII, en présence ou en absence du facteur de Willebrand, molécule chaperonne du FVIII. Toutefois, l'utilisation d'un hybridome T murin spécifique du FVIII et restreint au HLA-DRB1*0101 a montré que les CPAs murines n'utilisent pas les mêmes voies d'endocytose que les MO-DCs.

Par ailleurs, j'ai exploré la possibilité d'inhiber la réponse lymphocytaire B anti-FVIII, et ainsi l'apparition des inhibiteurs, en utilisant un inhibiteur d'une molécule de la voie de signalisation du récepteur des cellules B, la Bruton's tyrosine kinase (BTK), chez la souris hémophile A. J'ai montré que si l'inhibition de la BTK ne permet pas de prévenir l'apparition des inhibiteurs du FVIII, elle permet en revanche d'altérer la réponse secondaire au FVIII. Des expériences de transfert adoptif chez la souris hémophile A m'ont permis de montrer que l'inhibition de la BTK, lors d'une stimulation des lymphocytes B (LB) mémoires avec le FVIII, réduit significativement leur différenciation en plasmocytes.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse mettent en évidence la possibilité d'abroger la présentation du FVIII aux LT par les MO-DCs, en éliminant la N-glycosylation du FVIII en position 2118. Confrontés aux travaux récents du laboratoire sur l'implication des résidus chargés des domaines C1 et C2, dans la capture et l'apprêtement antigénique du FVIII, ils permettent de proposer un modèle d'endocytose du FVIII par les MO-DCs, et de mettre en lumière la différente nature des mécanismes d'endocytose utilisés par les CPAs murines. Des investigations dans des modèles plus appropriés à l'étude de l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII sont nécessaires pour déterminer l'innocuité d'un FVIII thérapeutique muté en 2118. Des études approfondies sont également à envisager concernant les mécanismes d'action de l'inhibiteur de la BTK sur l'activation et la différenciation des LB mémoires en plasmocytes. Il serait également intéressant de tester des formulations de l'inhibiteur de la BTK avec des nanoparticules liposomales contenant du FVIII afin de rendre cette stratégie spécifique du FVIII.

Liste des publications

Ce travail de thèse repose sur les publications suivantes :

Article 1 : Delignat S, Repessé Y, Gilardin L, Dimitrov JD, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Predictive immunogenicity of Refacto[®] AF. Hemophilia 2014.

Article 2 : Delignat S, Rayès J, Dasgupta S, Gangadharan B, Ing M, Denis Cv, Christophe OD, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Removal of mannose-ending glycan at Asn²¹¹⁸ abrogates FVIII presentation by human monocytes-derived dendritic cells. (En préparation)

Article 3 : Delignat S, Russick J, Gangadharan B, Ing M, Kaveri SV, Lacroix Desmazes S. Inhibition of the Bruton's tyrosine kinase alters the anti-FVIII memory B-cell response in mice with severe hemophilia A. (En préparation)

Tables des matières

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 10 |
| I- Hémophilie A | 11 |
| I.1- Historique | 11 |
| I.2- Description | 12 |
| I.3- Génétique de l'hémophilie A | 12 |
| <i>I.3.1- Gène du FVIII</i> | 12 |
| <i>I.3.2- Mutations liées à/responsables de l'hémophilie A</i> | 12 |
| I.4- Troubles hémorragiques associés à l'hémophilie A | 14 |
| <i>I.4.1- Hémostase chez le patient hémophile A</i> | 14 |
| I.4.1.1- Hémostase primaire | 14 |
| I.4.1.2- Hémostase secondaire | 15 |
| I.4.2- Manifestations cliniques | 17 |
| I.5- Traitements et complications | 17 |
| <i>I.5.1- Traitement</i> | 17 |
| I.5.1.1- Prise en charge actuelle | 17 |
| I.5.1.2- Nouvelles générations de FVIII thérapeutiques | 18 |
| <i>I.5.2- Complications</i> | 19 |
| I.6- Modèle expérimentaux d'hémophilie A | 20 |
| <i>I.6.1- Les modèles animaux d'hémophilie A spontanée</i> | 20 |
| <i>I.6.2- Les modèles animaux d'hémophilie A sévères générés par modification génétique</i> | 20 |
| II- Le FVIII : Cycle de vie en conditions physiologiques | 21 |
| II.1- Structure du FVIII | 21 |
| II.2- Biosynthèse | 22 |
| II.3- Sécrétion | 22 |
| II.4- Les N-glycosylations du FVIII | 24 |
| II.5- Le complexe FVIII-VWF | 24 |
| II.6- Activation et inactivation du FVIII | 25 |
| II.7- Catabolisme du FVIII | 27 |
| <i>II.7.1- Le récepteur LRP1</i> | 27 |
| <i>II.7.2- Famille des récepteurs aux LDL</i> | 27 |
| <i>II.7.3- Famille des récepteurs aux asialoglycoprotéines</i> | 28 |
| <i>II.7.4- Le Siglec-5</i> | 28 |
| III- La réponse immunitaire anti-FVIII | 29 |
| III.1- Dynamique de la réponse immunitaire anti-FVIII | 29 |
| <i>III.1.1- La réponse primaire</i> | 29 |

| | |
|--|----|
| III.1.2- La réponse secondaire | 31 |
| III.2- Les facteurs de risque liés au développement d'inhibiteurs..... | 32 |
| III.2.1- Les facteurs de risque génétiques | 32 |
| III.2.1.1- La mutation du gène F8..... | 32 |
| III.2.1.2- Les allèles HLA de classe II | 33 |
| III.2.1.3- Les gènes de l'immunité | 33 |
| III.2.2- Les facteurs de risques environnementaux | 34 |
| III.2.2.1- Intensité et modalité du traitement | 34 |
| III.2.2.2- Statut inflammatoire du patient | 35 |
| III.2.2.3- La source de FVIII thérapeutique..... | 36 |
| III.3- Acteurs cellulaires et moléculaires impliqués au cours de la réponse immunitaire anti-FVIII | 37 |
| III.3.1- L'endocytose | 37 |
| III.3.1.1- Les cellules présentatrices d'antigènes | 37 |
| III.3.1.2- Les voies d'endocytose du FVIII et les motifs du FVIII impliqués | 38 |
| III.3.1.3- Les signaux de danger | 41 |
| III.3.2- La réponse lymphocytaire T CD4⁺ | 42 |
| III.3.3- La réponse lymphocytaire B | 44 |
| III.3.3.1- La réponse lymphocytaire B primaire | 44 |
| III.3.3.2- La réponse lymphocytaire B mémoire | 45 |
| III.3.3.3- Réponse lymphocytaire B chez la souris hémophile A | 45 |
| III.3.3.4- Focus sur la signalisation du BCR et la Bruton's tyrosine kinase | 46 |
| III.3.4- Les anticorps anti-FVIII | 47 |
| III.4- Stratégie thérapeutique face à la réponse immunitaire anti-FVIII | 49 |
| III.4.1- Stratégies thérapeutiques actuellement utilisées en clinique | 49 |
| III.4.1.1. L'induction de tolérance immunitaire..... | 49 |
| III.4.1.2. La déplétion des lymphocytes B | 50 |
| III.4.2- Les nouvelles approches/cibles thérapeutiques | 51 |
| III.4.2.1. Inhibition de l'endocytose du FVIII par les CPAs | 51 |
| III.4.2.2. Inhibition de l'interaction LT CD4 ⁺ /CPAs | 52 |
| III.4.2.3. Inhibition des lymphocytes B | 53 |
| III.4.2.4. Induction de tolérance par « manipulation » du système immunitaire..... | 54 |
| III.5- Objectif de ma thèse..... | 57 |
| RESULTATS | 58 |
| I- Prédiction de l'immunogénicité d'un nouveau FVIII thérapeutique recombinant délété du domaine B : le Refacto AF | 59 |
| II- L'élimination de l'oligomannose au niveau de l'Asn2118 abroge la présentation du FVIII par les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes | 68 |

| | |
|--|-----|
| III- L'inhibition de la tyrosine kinase de Bruton altère la réponse lymphocytaire B mémoire anti-FVIII chez la souris déficiente en FVIII | 106 |
| DISCUSSION | 125 |
| I- Prévention de l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII par modification de la structure du FVIII | 126 |
| I.1- Maintien de l'activité pro-coagulante du FVIII après élimination des glycosylations en 239 et 2118 | 127 |
| I.2- L'élimination de la glycosylation en 2118 abroge l'apprêtement antigénique du FVIII par les MO-DCs | 128 |
| I.3- MO-DCs et CPAs murines : Des voies d'endocytose du FVIII différentes ? | 131 |
| I.4- Les limites du modèle murin hémophile A | 132 |
| I.5. Les limites du modèle <i>in vitro</i> | 132 |
| I.6. Précaution quant à l'élimination de N-glycosylation sur de potentiels épitopes T | 133 |
| II- Potentiel thérapeutique de l'inhibition de la BTK sur la réponse immunitaire anti-FVIII | 135 |
| II.1- L'inhibition de la BTK ne permet pas de prévenir l'activation des LB naïfs | 135 |
| II.2- L'inhibition de la BTK altère la réponse B mémoire | 137 |
| II.3- Retombées thérapeutiques potentielles | 139 |
| CONCLUSION & PERSPECTIVES | 141 |
| Bibliographie | 144 |
| ANNEXES | 166 |

Table des figures

| | |
|---|------------|
| Figure 1. Hémostase primaire. | 15 |
| Figure 2. Cascade de la coagulation | 16 |
| Figure 3. Structure du FVIII. | 22 |
| Figure 4. Forme circulante du FVIII. | 23 |
| Figure 5. Glycosylations du FVIII. | 24 |
| Figure 6. Activation du FVIII. | 26 |
| Figure 7. Récepteurs de clairance pour le FVIII. | 29 |
| Figure 8. Réponse primaire anti-FVIII. | 31 |
| Figure 9. Réponse secondaire anti-FVIII. | 32 |
| Figure 10. Voies d'endocytose du FVIII et motifs impliqués. | 41 |
| Figure 11 : Représentation schématique de la signalisation du BCR | 47 |
| Figure 12. Nouvelles approches thérapeutiques et cibles thérapeutiques pour prévenir ou éradiquer la réponse immunitaire anti-FVIII. | 56 |
| Figure 13 : Modélisation de la capture et de l'internalisation du FVIII par les MO-DCs. | 130 |
| Figure 14 . Prédiction de la liaison au HLA-DRB1*1501 des peptides de 15 aa comportant les résidus N et Q en position 2118. | 134 |
| Figure 15 : Voies de signalisation du FcγRIIB. | 140 |

Abréviations

| | |
|---------------|--|
| Aa | Acides aminées |
| ASCs | Antibody secreted cells |
| ASGPR | Asialoglycoprotein receptor |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BCR | B cell receptor |
| BHK | Baby hamster kidney |
| BM-DCs | Bone marrow derived dendritic cells |
| BTK | Bruton tyrosine kinase |
| CD | Cluster de différenciation |
| CG | Centre germinatif |
| CHO | Chinese hamster ovary |
| CLEC4M | C-Type Lectin Domain Family 4 Member M |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CPA | Cellule présentatrice d'antigène |
| CRM | Cross-reactive material |
| CTLA-4 | Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 |
| ELISA | Enzyme- linked immunosorbent assay |
| ERGIC53 | ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein |
| F8 | FVIII gene |
| FEIBA | Factor VIII inhibitor bypassing agent |
| Foxp3 | Forkhead transcription factor 3 |
| FT | Facteur tissulaire |
| FVIII | Factor VIII |
| HAMSTeR | Hemophilia A mutation, structures, test and resource |
| HEK293 | Human embryonic kidney cells 293 |
| HLA | Human leukocytes antigen |
| HO-1 | Heme oxygenase-1 |
| HSPG | Heparan sulfate proteoglycans |
| IFN- γ | Interféron- γ |
| Ig | Immunoglobulines |
| IL | Interleukine |

| | |
|---------------|--|
| Inv22 | Intron 22 |
| ITI | Induction de tolérance immunitaire |
| LB | Lymphocytes B |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LMAN1 | Lectin mannose-binding 1 |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRP | Lipoprotein receptor-related protein |
| LB | Lymphocytes B |
| LT | Lymphocytes T |
| MO-DCs | Monocytes derived-dendritic cells |
| NFkB | Nuclear factor-kappa B |
| NFAT | Nuclear factor of activated T-cells |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PLT | Platelets |
| PRR | Pattern recognition receptor |
| PS | Phosphatidyl serine |
| PUP | Previously untreated patient |
| Siglec | Sialic-acid binding immunoglobulin-like lectin |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| TCR | T cell receptor |
| TGF- β | Transforming growth factor- β |
| Th | T helper |
| TNF- α | Tumor necrosis factor- α |
| UB | Unité Bethesda |
| UI | Unité internationale |
| VWF | Facteur de Von Willebrand |
| XLA | X-linked agammaglobulinemia |

INTRODUCTION

I- Hémophilie A

I.1- Historique

Les premières descriptions de cas d'hémophilie remontent à l'Antiquité. Ainsi, dans le Talmud, recueil d'écrits hébraïques du II^{ème} siècle avant Jésus-Christ, est-il indiqué qu'un bébé mâle peut être exempt de circoncision, si deux de ses frères sont décédés des suites hémorragiques de cette intervention (Rosner, 1969). En 1803, un médecin de Philadelphie, John Otto constate que sur trois générations d'une même famille, seuls les hommes sont atteints de ces troubles hémorragiques, tandis que les femmes semblent être à l'origine de leur transmission. Le mode de transmission génétique précis de cette pathologie est établi par Nasse en 1823. Le terme hémophilie, issu des deux mots grecs haïma (sang) et de philia (affection) est utilisé pour la première fois en 1828 à l'université de Zurich par Hopff. L'hémophilie a été parfois également désignée de "maladie des rois", car la reine Victoria qui a régné sur l'Angleterre de 1837 à 1901 était porteuse du gène de la maladie, et deux de ses filles « conductrices » de la pathologie ont transmis l'hémophilie aux familles royales d'Espagne, d'Allemagne et de Russie. Au début du XX^{ème} siècle, Patek et Taylor découvrent la possibilité de corriger ce problème de coagulation en ajoutant une substance dérivée du plasma sanguin qu'ils appellent alors « globuline anti-hémophilique » (Patek and Taylor, 1937). En 1947, Pavlosky observe une coagulation normale en mélangeant le sang de deux patients atteints d'hémophilie mettant ainsi en évidence que l'hémophilie peut être liée à plusieurs déficits biologiques. Aggeler et Biggs identifient en 1952 les deux types d'hémophilie : l'hémophilie A, liée à un déficit en facteur VIII (FVIII), et l'hémophilie B consécutive à un défaut de facteur IX (FIX). Les prémices de la thérapie moderne destinée à corriger les saignements apparaissent en 1964 avec la découverte du cryoprécipité plasmatique de Judith Poole (Poole, 1964).

De nos jours, l'hémophilie A affecte approximativement 1 individu mâle sur 5000 naissances (Gitschier et al., 1984), recouvrant à elle seule 80% des désordres hémorragiques graves héréditaires (Graw et al., 2005) du nord de l'Europe et de l'Amérique.

I.2- Description

L'hémophilie A est une maladie héréditaire liée à une anomalie du gène codant pour le FVIII (gène *F8*) situé sur l'extrémité du bras long du chromosome X. La transmission de ce gène se fait de façon récessive : les femmes sont conductrices de la maladie, tandis que les hommes l'expriment cliniquement. Les mutations du gène *F8* se traduisent par un déficit en FVIII fonctionnel. La sévérité de l'hémophilie A est directement corrélée à l'activité pro-coagulante résiduelle de FVIII détectée dans le plasma. Ainsi, l'hémophilie est-elle dite sévère lorsque l'activité de FVIII plasmatique est indétectable (<1% de la normale), modérée quand elle est comprise entre 1 et 5%, et mineure lorsqu'elle est comprise entre 6 et 30%. L'hémophilie A sévère, modérée et mineure concerne respectivement 40%, 10% et 50% des patients (Antonarakis et al., 1995). L'activité résiduelle chez une femme conductrice est généralement aux alentours de 50%. L'hémophilie féminine est exceptionnelle, il s'agit soit de la descendance d'un homme hémophile et d'une femme conductrice, soit d'un phénomène d'inactivation du chromosome X portant l'allèle sain chez une femme conductrice.

I.3- Génétique de l'hémophilie A

I.3.1- Gène du FVIII

Le gène *F8* a été cloné pour la première fois entre 1982 et 1984 grâce aux travaux de Gitschier *et al* (Gitschier et al., 1984). Localisé à l'extrémité du bras long du chromosome X, en position Xq28, il s'étend sur 186 kb, ce qui représente quasiment 0,1% du chromosome (Purrello et al., 1985). Il comprend 26 exons (Wood et al., 1984) dont l'épissage génère un messager de 9 kb (soit 5 % du gène initial) codant pour une chaîne polypeptidique de 2351 acides aminés (aa), incluant un peptide signal de 19 aa (éliminé durant la translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE)). La protéine mature est ainsi constituée de 2332 aa. Les 95 % de séquences restantes correspondent aux introns et peuvent être porteurs d'une mutation responsable du déficit en FVIII.

I.3.2- Mutations liées à/responsables de l'hémophilie A

Plus de 940 mutations distinctes situées dans le gène *F8* ou dans les régions adjacentes sont à l'origine de l'hémophilie A (Graw et al., 2005). Dans les 2/3 des cas, il existe un historique familial, tandis que l'autre tiers relève d'apparition sporadique de la maladie. L'ensemble de

ces mutations et leurs phénotypes associés sont répertoriés dans la base de données internationale HAMSTeRs (the Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource site ; <http://www.factorviii-db.org/>). De rares cas d'hémophilie A (2%) ne sont pas liés à des mutations du gène *F8*, mais à des mutations localisées au niveau de gènes codant pour des protéines impliquées dans la production/sécrétion du FVIII telles que LMAN1 (Lectin Mannose Binding-1), encore appelée ERGIC-53 (Nichols et al., 1998; Zhang et al., 2003), ou codant pour la protéine chaperonne du FVIII : le facteur Willebrand (Von Willebrand Factor, VWF) (Gaucher et al., 1991; Mazurier et al., 1990).

En 2004, Oldenburg *et al* (Oldenburg et al., 2004) ont caractérisé les mutations du gène *F8* chez 845 familles hémophiles A (sévères et modérées confondues). Les anomalies affectant le gène *F8* incluent des réarrangements de gènes (inversion), des mutations ponctuelles (une seule base est modifiée), de larges délétions de séquences (>50pb), et des petites délétions ou insertions de séquence (<50pb).

Ainsi, l'anomalie la plus fréquemment observée est-elle l'inversion de l'intron 22 qui représente environ 50% des cas d'hémophilie A sévères (Goodeve et al., 1994; Oldenburg et al., 2004). Cette inversion apparaît après recombinaison de deux régions homologues aux séquences de l'intron 22 (Naylor et al., 1995). L'inversion de l'intron 1 est également décrite chez 1 à 4% des hémophilies A sévères.

Les mutations ponctuelles représentent 38% des cas d'hémophilie A. Celles-ci incluent des mutations non-sens ou faux-sens. Une forte proportion des mutations ponctuelles est observée au niveau des di-nucléotides CpG. Quatre codons sur 6 codant pour l'aa Arg contiennent des di-nucléotides CpG. Ainsi, la mutation ponctuelle la plus fréquente chez les patients hémophiles A est-elle la mutation du codon 2150 au niveau de l'exon 23, qui convertit une Arg en His (Graw et al., 2005).

Les petites insertions/délétions de séquence représentent 10% des cas, la majorité entraîne un décalage du cadre de lecture ce qui modifie considérablement la protéine et conduit le plus souvent à un FVIII tronqué. Enfin, les larges délétions et les mutations de sites d'épissage représentent respectivement 3 et 2.6% des cas.

A noter que 5 % des patients atteints d'hémophilie A présentent une activité plasmatique de FVIII indétectable, car leur FVIII est non fonctionnel, mais ils présentent en revanche un taux normal de FVIII circulant. Ces patients sont dits « *cross-reactive material (CRM) positive* »

(Amano et al., 1998) car ils expriment un FVIII, certes inactif, mais présent dans la circulation, contrairement aux patients dits CRM-négatifs qui n'expriment pas du tout de FVIII.

I.4- Troubles hémorragiques associés à l'hémophilie A

I.4.1- Hémostase chez le patient hémophile A

Le FVIII est un des composants clés du processus complexe et intriqué que constitue l'hémostase. L'hémostase comprend l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation d'un caillot de fibrine destiné à stopper les pertes de sang et réguler le flux sanguin (Davie et al., 1991). Ce processus est continu et en équilibre permanent. Classiquement, on distingue l'hémostase dite primaire qui inclut une étape vasculaire et une étape plaquettaire, et l'hémostase secondaire qui comporte la cascade de coagulation.

I.4.1.1- Hémostase primaire

Lors d'une lésion vasculaire, chez un individu normal, l'hémostase primaire est déclenchée en seulement quelques secondes. Elle est initiée par la vasoconstriction des vaisseaux qui ralentit le débit sanguin, permettant ainsi la stagnation locale des différents acteurs de l'hémostase. La mise à nu du sous-endothélium, constitué d'une matrice riche en collagène, déclenche alors l'adhésion et l'activation plaquettaire (Figure 1). Les plaquettes (PLT) adhèrent au sous-endothélium par l'intermédiaire des glycoprotéines membranaires GPIa/IIa spécifiques du collagène. Cette adhésion est amplifiée par le VWF, sécrété par les cellules endothéliales, qui forme un pont entre les glycoprotéines plaquettaires GPIb/IX et les fibres de collagène (Furie and Furie, 1992). Les PLT activées libèrent alors des éléments vasoconstricteurs et pro-agrégants plaquettaires contenus dans leurs granules. Dans le même temps, la membrane plaquettaire subit des transferts de phospholipides anioniques de la couche interne vers la couche externe, permettant ainsi l'activation de la cascade de la coagulation et un début de génération de thrombine. Les traces de fibrine apparaissent et le "clou plaquettaire hémostatique" est formé. Chez les patients hémophiles A, l'adhésion et l'activation plaquettaire sont normales et permettent la formation du « clou plaquettaire » et la génération des premières molécules de thrombine.

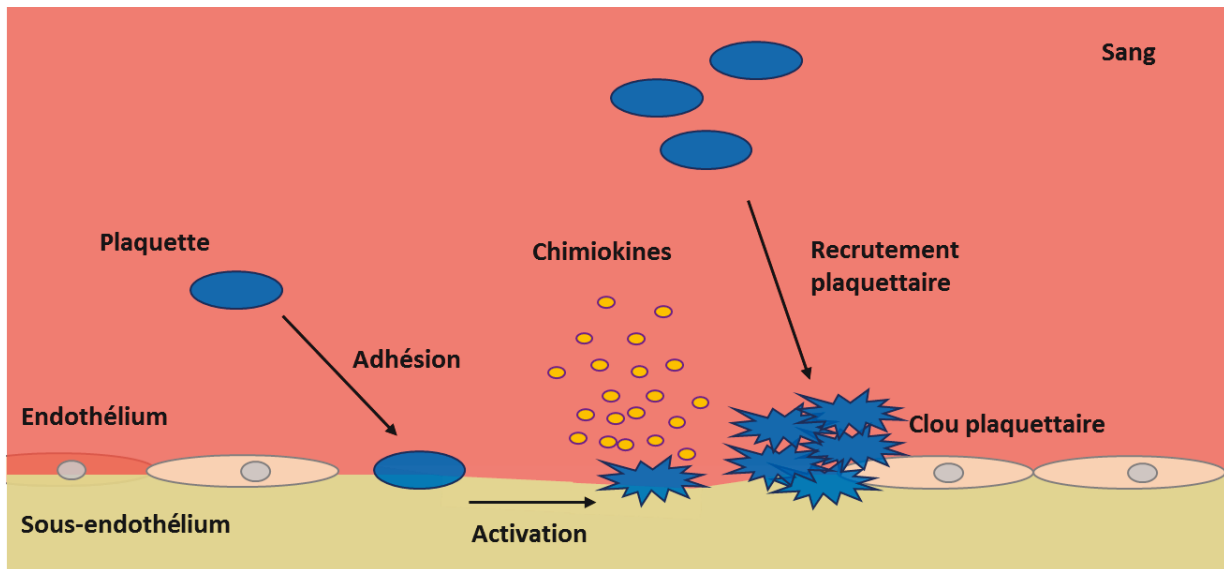


Figure 1. Hémostase primaire. Lors d'une lésion de la paroi endothéliale, les plaquettes adhèrent au sous-endothélium exposé. Elles subissent des modifications membranaires, s'activent et sécrètent des chimiokines qui vont permettre l'attraction de nouvelles plaquettes et l'agrégation plaquettaire.

1.4.1.2- Hémostase secondaire

La coagulation sanguine peut être activée de deux manières: par la voie extrinsèque, déclenchée par l'exposition du facteur tissulaire (FT), ou par la voie intrinsèque, initiée par le contact de surfaces chargées négativement (Dahlbäck, 2000). Ces deux voies sont composées d'une série de réactions protéolytiques successives dans lesquelles un zymogène d'une sérine protéase et son cofacteur glycoprotéique sont activés pour devenir des composants actifs qui catalysent la réaction suivante. Le FVIII est classiquement décrit comme un acteur clé de la voie intrinsèque de la coagulation.

Lors d'une brèche vasculaire, le FT forme un complexe avec le facteur VII activé (FVIIa) présent à l'état de trace dans le plasma, en présence d'ions calcium (Figure 2). Le complexe FT-FVIIa active alors le facteur X ($\text{FX} \rightarrow \text{FXa}$) et le facteur IX ($\text{FIX} \rightarrow \text{FIXa}$). Le FXa active ensuite la pro-thrombine, permettant ainsi la formation des premières molécules de thrombine (Lawson et al., 1994). Une boucle d'amplification de l'activation de la prothrombine en thrombine est alors induite. Le FVIII et le facteur V (FV) sont activés en FVIIIa et FVa par ces premières molécules de thrombine. Le FIXa forme un complexe équimoléculaire avec son cofacteur, le FVIIIa, en présence de phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine des PLT activées) et d'ions calcium, pour former le complexe « ténase ». Ce complexe accélère l'activation du FX ($\text{FX} \rightarrow \text{FXa}$). Le FXa forme à son tour le complexe « prothrombinase » avec

son cofacteur, le FVa. Ce complexe comme son nom l'indique amplifie l'activation de la prothrombine en thrombine. Enfin, la thrombine transforme à son tour le fibrinogène en fibrine qui consolide à l'aide du FXIIIa le caillot sanguin (Davie et al., 1991). Chez le patient hémophile A, le déficit en FVIII entraîne un défaut de formation du complexe ténase. Les faibles quantités de thrombine générées ne permettent pas la consolidation suffisante du clou plaquettaire et la formation du caillot sanguin. Les patients hémophiles A saignent donc plus longtemps que les individus sains.

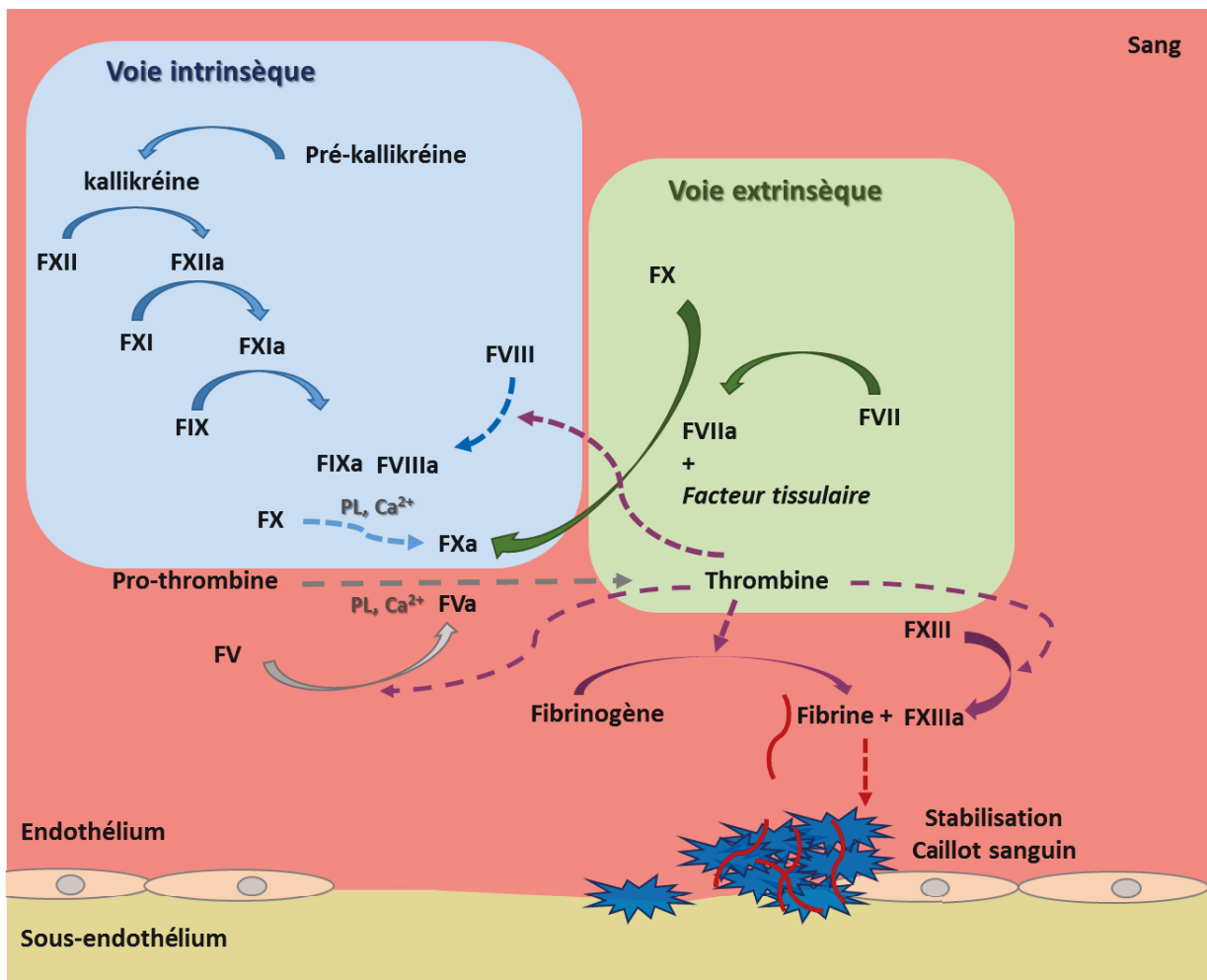


Figure 2. Cascade de la coagulation. L'exposition du collagène et du facteur tissulaire déclenche simultanément l'initiation des voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation. La voie extrinsèque débute par l'auto-activation du FVII en FVIIa. Le FVIIa et le facteur tissulaire transforment de petites quantités de FX en FXa. Le FXa entraîne la génération précoce de thrombine. La thrombine produit par la voie extrinsèque, engendre l'activation d'autres facteurs de la coagulation comme le FV et le FVIII. Le FVIIIa agit comme co-facteur du FIXa. Le FVIIIa et le FIXa s'associent au niveau des phosphatidylsérines exposées à la surface de plaquettes activées, pour former le complexe ténase. Le complexe ténase génère de grandes quantités de FXa. Ce FXa se lie au FVa à la surface des plaquettes pour former le complexe pro-thrombinase, et génère de larges quantités de thrombine, entraînant une forte amplification de la cascade de la coagulation par rétro-activation de plusieurs facteurs. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine. La fibrine en association avec le FXIIIa consolide le caillot sanguin. Chez le patient hémophile A, les étapes signalées par des flèches en pointillés n'ont pas lieu.

I.4.2- Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques associées à l'hémophilie A correspondent à des épisodes hémorragiques internes non contrôlés. La gravité et la fréquence de ces manifestations dépendent directement du taux de FVIII plasmatique circulant. Dans les formes les plus sévères de la pathologie, des hémorragies spontanées en particulier au niveau des articulations et des tissus mous (peau, tendons, ligaments, muscles, ...) sont observées. Des manifestations hémorragiques notamment intracrâniennes peuvent parfois se produire à la naissance, mais en général, les manifestations hémorragiques n'apparaissent que lors de l'apprentissage de la marche. Les saignements chroniques au niveau des articulations conduisent au développement d'arthropathies fortement invalidantes, en particulier au niveau des hanches et des genoux, et à une morbidité élevée (Lafeber et al., 2008). Dans les pays développés, l'hémorragie intracérébrale est la principale cause de mortalité chez les patients hémophiles A (en dehors des maladies infectieuses telles que les infections au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et au VHC (virus de l'hépatite C) transmises dans les années 1980 par les traitements dérivés de plasma).

I.5- Traitements et complications

I.5.1- Traitement

I.5.1.1- Prise en charge actuelle

Le traitement de l'hémophilie A consiste en l'administration de FVIII exogène dit « thérapeutique » par voie intraveineuse. Ce traitement est administré soit à la demande lors d'un épisode hémorragique, soit à titre préventif par prophylaxie. Dans ce dernier cas, le protocole standard consiste à infuser 25-40 UI/kg de FVIII thérapeutique, 2 à 3 fois/semaine (Peyvandi et al., 2016a). Aujourd'hui, les patients de la plupart des pays développés ont accès à des quantités suffisantes de FVIII et sont traités en prophylaxie. Ce mode de traitement permet de prévenir les atteintes osseuses et articulaires, et améliore la qualité de vie des patients (Berntorp, 2003).

Dans les pays développés, deux types de concentrés de FVIII thérapeutiques sont utilisés : soit des dérivés plasmatiques, soit des recombinants (issu du génie génétique). Les FVIII dérivés de plasma sont purifiés à partir de mélanges de plasma de milliers de donneurs sains et ont été

développés dans les années 1960 (Webster et al., 1965). Mais dans les années 1980, la contamination de patients hémophiles A par le VIH et le VHC a fortement remis en question l'utilisation des produits plasmatiques. Aujourd'hui, la sélection des donneurs et les méthodes d'inactivation virale appliquées au FVIII dérivés de plasma ont pratiquement éliminé ce risque infectieux. Cependant, une incertitude demeure quant à la transmission du prion et de la maladie de Creutzfeldt Jacob (Ironsides, 2010). A noter, que ces FVIII dérivés de plasma contiennent des protéines humaines « contaminantes » telle que l'albumine, la fibronectine et le VWF. La contamination de patients hémophiles par des agents infectieux a favorisé le développement industriel de FVIII recombinants clonés à partir de la séquence ADN de deux donneurs caucasiens (Viel et al., 2009). Les FVIII recombinants actuellement utilisés en France sont produits soit par des cellules CHO (Advate®, Baxter), soit par des cellules BHK (Kogenate®, Bayer et Helixate®, CSL-Behring). Un FVIII recombinant délété du domaine B (Refacto®, Wyeth) est également utilisé. Récemment, un FVIII recombinant délété du domaine B produit par des cellules humaines, les HEK293 (Nuwiq®, Octapharma), a été introduit sur le marché (Casademunt et al., 2012). La demi-vie moyenne des différents FVIII thérapeutiques est d'environ 8 à 12 heures.

1.5.1.2- Nouvelles générations de FVIII thérapeutiques

Récemment, de nouvelles générations de FVIII recombinant « à longue durée de vie » ont été développées afin de diminuer la fréquence d'injections de FVIII. Pour cela, deux stratégies différentes ont été utilisées. La première est de lier de manière covalente le FVIII à différents polymères de polyéthylène glycol (PEG) par liaison à une cystéine libre (au niveau des domaines A2, A3 ou B). Actuellement, trois types de FVIII-PEG (BAY94-9027, Bayer ; Bax-855, Baxalta ; N8-GP, Novo Nordisk), sont en cours d'essais cliniques (Mei et al., 2010; Tiede et al., 2013). Toutefois, l'augmentation de la demi-vie observée chez les patients pour ces trois FVIII-PEG reste assez modeste, aux alentours de 1,5 fois (~18h) (Peyvandi et al., 2016a). La seconde stratégie consiste à fusionner le FVIII au fragment Fc de l'IgG1 humaine, en tirant avantage de l'interaction du Fc des IgG avec le récepteur Fc néonatal (FcRn), mécanisme physiologique qui protège les IgG de la dégradation lysosomale. Un FVIII-Fc avec une demi-vie d'environ 18h a été récemment introduit sur le marché Américain (Eloctate, Biogen) (Mahlangu et al., 2014).

1.5.2- Complications

Actuellement, la complication la plus redoutée est l'apparition d'anticorps capables de neutraliser l'activité pro-coagulante du FVIII. De tels anticorps sont appelés « inhibiteurs » car ils inhibent l'activité biologique du FVIII substitutif (de Biasi et al., 1994; Ehrenforth et al., 1992) et rendent le traitement inefficace. Cette complication survient chez 25 à 30% des patients hémophiles A sévères, essentiellement au cours des 15 à 20 premiers jours d'exposition (Gouw et al., 2007a, 2013a, 2013b) et 5 à 10% des patients hémophiles A modérés dans les 50 premiers jours d'exposition (Eckhardt et al., 2013; Oldenburg and Pavlova, 2006). La réponse inhibitrice est évaluée par une variante de la méthode Bethesda (variante Nijmegen, (Verbruggen et al., 1995)). Le titre inhibiteur est estimé en unités Bethesda (UB), 1 UB correspondant à la dilution du plasma testé capable de neutraliser 50% de l'activité pro-coagulante du FVIII d'un plasma normal. Le seuil de positivité est fixé à 0,6 UB. Parmi les patients hémophiles A ayant développé des inhibiteurs, on distingue les « faibles » répondeurs (≤ 5 UB), et les forts « répondeurs » (>5 UB). Les faibles répondeurs gardent un titre inhibiteur ≤ 5 UB, malgré la poursuite des injections de FVIII, tandis que les forts répondeurs présentent un titre inhibiteur qui peut augmenter après chaque nouvelle exposition au FVIII (réponse anamnestic).

Dans le cas d'un patient hémophile A faible répondeur, les doses de FVIII sont augmentées pour saturer les inhibiteurs. En revanche, cette stratégie s'avère inefficace chez les patients hémophiles A forts répondeurs. Ces patients sont traités avec des agents dépourvus de FVIII, tels que des facteurs activés du complexe prothrombinique (FEIBA[®]), ou du facteur VII activé recombinant (Novoseven[®]). Toutefois, l'utilisation de ces produits, qui court-circuitent le FVIII dans la cascade de la coagulation, n'est pas aussi efficace que le traitement substitutif. Enfin, un protocole d'induction de tolérance immunitaire (ITI) est également proposé au patient. Ce protocole consiste en l'administration répétée de fortes doses de FVIII, pouvant parfois être associée à un traitement immunosuppresseur (cyclophosphamide). Ces traitements font disparaître les inhibiteurs chez 65-70% des patients, mais sont contraignants pour le patient et extrêmement coûteux (Peyvandi et al., 2016a). Pour les 30-35% de patients chez qui les inhibiteurs subsistent, les approches actuelles sont soit une thérapie avec un anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) (Leissing et al., 2014), soit une nouvelle ITI avec un FVIII contenant du VWF (Santagostino, 2013).

Ainsi, l'apparition d'inhibiteurs du FVIII chez le patient hémophile A pose-t-elle à la fois un problème clinique et sociétal. D'une part, la qualité de vie des patients est dramatiquement affectée, et les taux de morbidité et de mortalité augmentent (Darby et al., 2004), et d'autre part,

le coût de la prise en charge de ces patients est multiplié par 3 dépassant en général les 200 000 euros par an et par patient (Gringeri et al., 2003).

I.6- Modèle expérimentaux d'hémophilie A

I.6.1- Les modèles animaux d'hémophilie A spontanée

L'hémophilie A spontanée a été décrite dans une large variété d'espèces telles que le chien, le mouton, le chat, et le cheval (Øvlisen et al., 2008). Mais, c'est chez différentes races de chien qu'elle a été le plus largement étudiée et observée (Brooks, 1999; Hough et al., 2002). Le chien hémophile A présente le même mode de transmission de la maladie que l'homme (Brinkhous and Graham, 1950) et les mêmes manifestations cliniques (hémarthroses, hématomes sous-cutanés et hémorragies post-trauma). La maladie peut également être classée selon sa sévérité : mineure, modérée ou sévère. L'apparition d'inhibiteurs du FVIII exogène a été observée dans ce modèle, à des fréquences relativement similaires à celles observées chez les patients hémophiles A. Ainsi, après plusieurs administrations de FVIII canin (cryoprécipité de plasma canin), 5 chiens sur 15 ont-ils développé des anticorps inhibiteurs (Giles et al., 1984). Néanmoins, le nombre limité d'animaux disponibles et le coût du maintien d'une colonie de chiens hémophiles ont conduit au développement de petits modèles animaux expérimentaux d'hémophilie A.

I.6.2- Les modèles animaux d'hémophilie A sévères générés par modification génétique

Les travaux de Bi consistant à insérer une cassette néomycine au niveau de l'exon 16 ou de l'exon 17 du gène du FVIII ont conduit à l'établissement de deux lignées de souris déficientes en FVIII (Bi et al., 1995). Ces souris ont été obtenues par manipulation génétique de cellules ES de souris 129/SV, réimplantées dans un blastocyste de souche C57Bl/6. Un ARNm tronqué a été observé chez ces deux lignées et la chaîne légère du FVIII est indétectable dans le plasma de ces souris (Bi et al., 1996). Ces deux lignées présentent une activité de FVIII plasmatique indétectable. Le temps de saignement est prolongé dans ces deux modèles, mais des saignements spontanés au niveau des articulations ou des tissus ne sont que rarement observés (Bi et al., 1996). Depuis, ces lignées ont été croisées dans des fonds génétiques C57Bl/6 et Balb/C. Après plusieurs administrations de FVIII thérapeutique humain par voie intraveineuse, 70 à 100% des souris développent une réponse IgG anti-FVIII (Meeks et al., 2012; Qian et al.,

1999). Les deux modèles de souris hémophiles (E16 et E17) présentent de nombreux avantages pour l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII. Comme chez les patients hémophiles A sévères, les souris développent une réponse anti-FVIII dépendante des cellules T CD4⁺ après administration de FVIII par voie intraveineuse (Qian et al., 2000a; Reipert et al., 2001). Au cours de ma thèse, j'ai utilisé la souris invalidée au niveau de l'exon 16 sur fond génétique C57Bl/6.

Plus récemment, Nielsen et coll. ont développé un rat hémophile A grâce à la technologie des nucléases à doigt de zinc (Nielsen et al., 2014). Une délétion de 13 pb au niveau de l'exon 16 introduit un codon stop en C-terminal du domaine A3. A noter que le gène *F8* chez le rat se situe au niveau du chromosome 18, et que la transmission du gène est donc autosomale récessive (Lozier and Nichols, 2013). Les rats hémophiles A présentent un taux de FVIII indétectable, et 70% des animaux présentent des épisodes d'hémorragies spontanées nécessitant un traitement. Après des injections répétées de FVIII thérapeutique, les rats FVIII^{-/-} développent une réponse anti-FVIII équivalente à celle des rats FVIII^{+/+} (Lövgren et al., 2016a).

II- Le FVIII : Cycle de vie en conditions physiologiques

II.1- Structure du FVIII

Le FVIII est une glycoprotéine multi-domaine composée d'un triple domaine A, un domaine B, et d'un double domaine C, arrangés ainsi: A1-A2-B-A3-C1-C2 (Figure 3) (Vehar et al., 1984). Les domaines A sont répartis sur la chaîne polypeptidique de la manière suivante : A1 (1-331), A2 (373-711) et A3 (1690-2019). Ils présentent environ 30% d'homologie de séquences entre eux (Vehar et al., 1984; Wood et al., 1984) et 40% avec le FV de la coagulation et la céruloplasmine, protéine liant le cuivre dans le plasma (Church et al., 1984). Ces domaines A sont entourés par des petites régions acides de 30 à 40 aa (a1, a2, a3) riches en Asp et Glu. Le domaine B central est unique, dans le sens où il ne présente pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines. D'une longueur de 980 aa, il n'est pas impliqué dans l'activité pro-coagulante du FVIII. Les domaines C1 (2020-2172) et C2 (2173-2332) présentent des homologies de séquence avec la discoidine I (20%), lectine tétramérique du *Dictyostelium discoïdium*, qui présente une aptitude à lier les phospholipides chargés négativement (Poole et al., 1981). Les domaines A et C contiennent 19 des 23 cystéines. Les ponts disulfures sont intra-domaines (Fay and Smudzin, 1989). A noter que le motif consensus Asn-X-Ser ou Thr, caractéristique des sites de N-glycosylation, apparaît 25 fois dans la séquence du FVIII, et

certaines sites sont connus comme étant occupés. Sur ces 25 sites potentiels, 19 sont situés dans le domaine B, suggérant que cette région est excessivement modifiée par des carbohydrates.

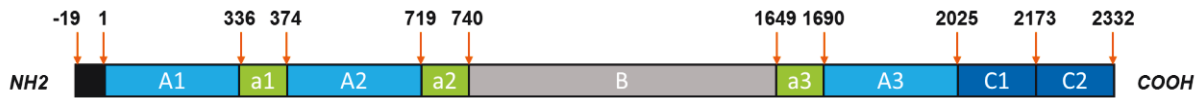


Figure 3. Structure du FVIII. La transcription de l'ARNm codant le FVIII produit une chaîne polypeptidique de 2352 acides aminés qui est adressée au réticulum endoplasmique, à l'intérieur duquel elle perd son peptide signal.

II.2- Biosynthèse

La détection d'ARNm et de protéine du FVIII au niveau du foie ainsi que la présence d'éléments de réponse spécifique de l'expression hépatique dans la région promotrice du gène *F8* (Figueiredo and Brownlee, 1995; Wion et al., 1985; Zelechowska et al., 1985) suggèrent que le foie constitue le site majeur de production du FVIII circulant. Des transplantations de foie chez des patients hémophiles qui, après greffe, présentent des taux de FVIII circulant comparables à la normale (Bontempo et al., 1987), corroborent cette hypothèse. Cependant, le type cellulaire à l'origine du FVIII circulant reste sujet à controverse. Tandis que des travaux montrent la présence d'ARNm codant pour le FVIII, ou la protéine FVIII au niveau des hépatocytes (Becker et al., 2004; Wion et al., 1985), d'autres montrent que seules les cellules endothéliales contiennent du FVIII (Do et al., 1999; Shahani et al., 2014). Néanmoins, plusieurs travaux ont montré la présence d'ARNm codant pour le FVIII au niveau de la rate, des ganglions et des reins (Wion et al., 1985). Des études de transplantation chez des animaux hémophiles ont démontré que des organes tels que la rate et les poumons contribuaient à la présence de FVIII circulant (Groth et al., 1974; Veltkamp et al., 1974). Jacquemin *et al* ont observé la sécrétion de FVIII par des cellules endothéliales du poumon *ex vivo* (Jacquemin et al., 2006), renforçant ainsi l'hypothèse que le foie n'est pas le seul site de biosynthèse du FVIII. Depuis, Everett *et al* ont montré chez la souris, en invalidant temporairement et de manière tissu spécifique la protéine LMAN1, impliqué dans la sécrétion du FVIII, que les cellules endothéliales hépatiques et rénales sont la principale source de FVIII circulant (Everett et al., 2014).

II.3- Sécrétion

La première étape de la sécrétion du FVIII correspond à la translocation du polypeptide du FVIII (2332 aa) dans la lumière du RE, où se produisent les N-glycosylations. Le FVIII interagit

alors avec de nombreuses protéines chaperonnes telles que la calréticuline, la calnexine et la protéine BiP (Ig-binding protein) (Pipe et al., 1998; Swaroop et al., 1997). Cette dernière se lie au domaine A1 du FVIII et retient le FVIII dans le RE. Le transport du FVIII vers l'appareil de Golgi (AG) est limité : il nécessite des taux élevés d'ATP (Dorner et al., 1990) et l'interaction du FVIII avec la lectine du réticulum endoplasmique LMAN-1 et la protéine MCFD-2 (Multiple Coagulation Factor Deficiency-2) (Cunningham et al., 2003; Nichols et al., 1998; Zheng et al., 2010). Dans l'AG, le FVIII subit différentes modifications post-traductionnelles comprenant des O-glycosylations, des sulfatations de résidus tyrosines spécifiques (Pittman et al., 1992, 1994) et des maturations des N-glycosylations (Medzihradzsky et al., 1997).

Avant sa sécrétion, le FVIII subit un clivage protéolytique (Figure 4) au niveau des motifs consensus Arg-x-x-Arg du domaine B (Arg 1313 et Arg 1648) ce qui a pour effet de rompre les liaisons covalentes entre la chaîne lourde (A1-a1-A2-a2-B) et la chaîne légère (a3-A3-C1-C2) (Kaufman et al., 1988). Les molécules de FVIII circulent alors dans le sang sous forme d'hétérodimères au sein desquels les chaînes lourdes et légères sont associées de manière non covalente. Ces interactions sont de nature électrostatique, hydrophobe et dépendante d'ions métalliques. Elles impliquent essentiellement les domaines A1 et A3. Il semblerait que ces interactions fassent intervenir des ions calcium, et cuivre (Ngo et al., 2008).

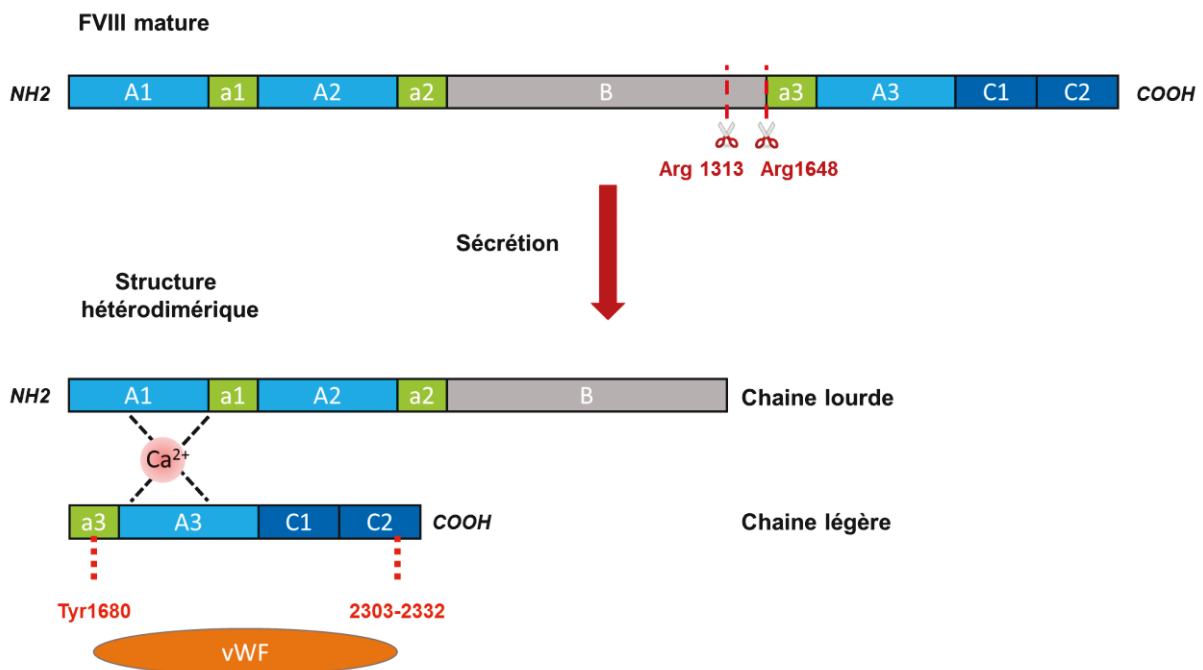


Figure 4. Forme circulante du FVIII. Dans l'appareil de Golgi, la chaîne polypeptidique subit un clivage protéolytique en Arg1313 et en Arg1648, formant ainsi une structure hétérodimérique avec une chaîne lourde (A1, a1, A2, a2 et B) et une chaîne légère (a3, A3, C1 et C2), associées entre elles par un ion divalent. Le FVIII libéré dans la circulation interagit via ses domaines a3 et C2 avec sa molécule chaperonne, le vWF.

II.4- Les N-glycosylations du FVIII

Hironaka *et al* ont analysé le profil des chaînes glycosylées du FVIII recombinant produit par des cellules BHK, et du FVIII natif (dérivé de plasma). Ils ont observé que le FVIII recombinant et le FVIII natif présentent des structures riches en mannose en dehors du domaine B, et des structures composées de 2, 3 ou 4 chaînes glycosylées de type complexe au sein du domaine B. Par ailleurs, 95 % des glycosylations présentes sur le domaine B du FVIII natif sont coiffés par des acides sialiques (Hironaka et al., 1992). Des analyses par chromatographie et spectrométrie de masse ont confirmé que deux sites de glycosylation en A1 et C1 arborent des structures hautement mannosylées se terminant par des mannoses, alors que des structures plus complexes ont été identifiées sur le domaine B et le domaine A3 (Figure 5) (Medzihradzsky et al., 1997). Récemment, l'analyse des glycosylations d'un FVIII délété du domaine B produit par les HEK293 par spectrométrie de masse a révélé que l'Asn en 2118 présente toujours des structures hautement mannosylées terminées par des mannoses, tandis que l'Asn en 239 présente des structures hybrides composées soit de chaînes terminées par des mannoses, soit par des galactoses ou des acides sialiques (Kannicht et al., 2013). Les Asn 41 et 1810 présentent en revanche des structures de type complexe.

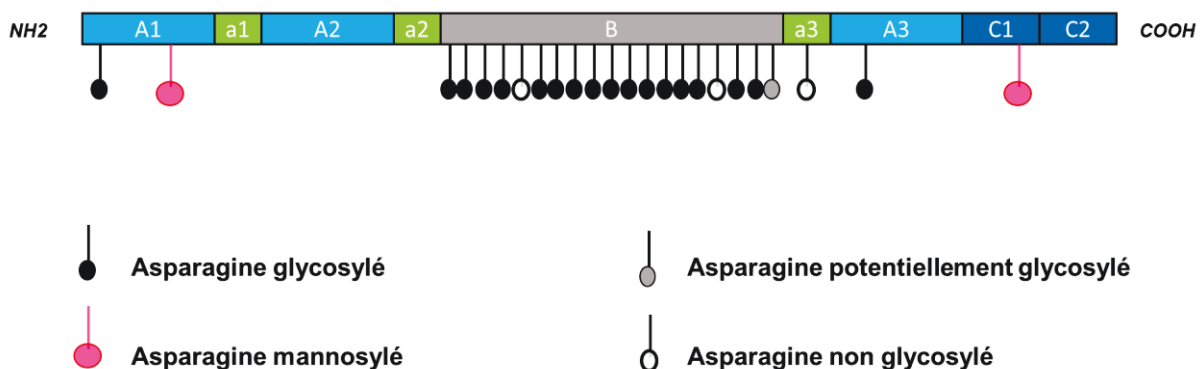


Figure 5. Glycosylations du FVIII. Le FVIII arbore 25 fois la séquence consensus Asn-Xxx-Thr/Ser qui permet l'ajout de N-glycosylations, 19 d'entre elles sont situées au niveau du domaine B. La plupart de ces motifs se termine par des résidus galactose. 95% des résidus galactose présents sur le domaine B sont coiffés d'acide sialique. Les Asn 239 et 2118, situés respectivement au niveau des domaines A1 et C1 présentent des structures hautement mannosylées exposant des mannoses.

II.5- Le complexe FVIII-VWF

Immédiatement après sa libération dans la circulation, le FVIII hétérodimérique se lie au VWF, via des liaisons hydrophobes et électrostatiques. La formation de ce complexe est cruciale pour

le maintien du FVIII dans la circulation comme en atteste la demi-vie très courte du FVIII injecté chez des patients ayant un VWF muté incapable de se lier au FVIII (maladie de Willebrand de type 2N) ou n'ayant pas de VWF (maladie de Willebrand de type 3) (Mazurier et al., 1990; Nishino et al., 1989).

Le VWF maintient le FVIII dans la circulation via différents mécanismes. En absence de saignement, il protège le FVIII d'une liaison prématurée aux plaquettes activées (Nesheim et al., 1991; Saenko and Scandella, 1995) et au FIXa (Lenting et al., 1994). Il empêche également le FVIII d'être dégradé par une variété de protéases telles que la protéine C activée (PCa) et le FXa (Koedam et al., 1988, 1990).

La liaison du FVIII au VWF implique des régions situées dans les domaines a3 (1649-1689) et C2 (2303-2332) (Saenko and Scandella, 1997; Saenko et al., 1994). La synthèse de FVIII recombinant en présence d'un inhibiteur des sulfatations a révélé que la Tyr 1680 au niveau du domaine a3 est essentielle à l'interaction du FVIII avec le VWF (Pittman et al., 1992). Récemment, des analyses du FVIII complexé au domaine de liaison du VWF (D'D3) par microscopie électronique et spectrométrie de masse ont montré que le domaine C1 du FVIII interagit également avec le VWF (Chiu et al., 2015; Yee et al., 2015). Chaque monomère de VWF est capable de lier une molécule de FVIII avec une forte affinité inférieure à 1nM (Lollar et al., 1988). Le ratio physiologique de molécule de FVIII par molécule de VWF est de 1:50 (Weiss et al., 1977). Cela étant, la formation de ce complexe obéit aux lois de la thermodynamique, et on considère qu'en conditions physiologiques, 2 à 5% du FVIII circule sous forme libre, non complexé au VWF (Noe, 1996; Schambeck et al., 2004).

II.6- Activation et inactivation du FVIII

Le VWF joue également un rôle crucial en transportant le FVIII sur le site de saignement, en se liant aux molécules de collagène exposées. Le FVIII ainsi accumulé sur le site de saignement est activé par la thrombine. Cette activation se fait par des clivages protéolytiques au niveau de la chaîne lourde (résidus Arg372 et Arg740) et de la chaîne légère (résidu Arg1689), cette dernière coupure dissociant le FVIII du VWF. La protéolyse du FVIII par la thrombine génère un triplet polypeptidique, composé des fragments A1-a1 (1-372), A2-a2 (373-740) et A3-C1-C2 (1690-2332). Des interactions électrostatiques relient A1-a1 et A2-a2. Ce dernier forme un pont ionique avec la sous-unité A3-C1-C2, pour former le FVIIIa (Figure 6).

Ce changement de conformation du FVIII en FVIIIa augmente son affinité pour les phospholipides d'un facteur 10 (Saenko et al., 1998). Le FVIIIa interagit avec la membrane phospholipidique via son domaine C2 (2303-2332) (Foster et al., 1990). Le domaine C1, et en

particuliers les motifs Lys2092 et Phe2093, pourrait également favoriser l'interaction du FVIIIa avec la membrane plaquettaire (Meems et al., 2009).

Le FVIIIa lié aux phospholipides induit un changement conformationnel du site catalytique du FIXa. Le FIXa se lie au domaine A2 du FVIII, plus précisément au niveau de la région 558-565 et 698-710, et interagit également avec le domaine A3 (résidus 1811-1818) (Lenting et al., 1994).

Le FVIIIa est inactivé essentiellement par dissociation spontanée de la liaison ionique entre le domaine A2 et le dimère A1/A3-C1-C2 (Fay and Smudzin, 1992; Wakabayashi and Fay, 2008), mais aussi après dégradation protéolytique par la PCa, le FXa et la plasmine (Fay et al., 1991; Nogami et al., 2003, 2007).

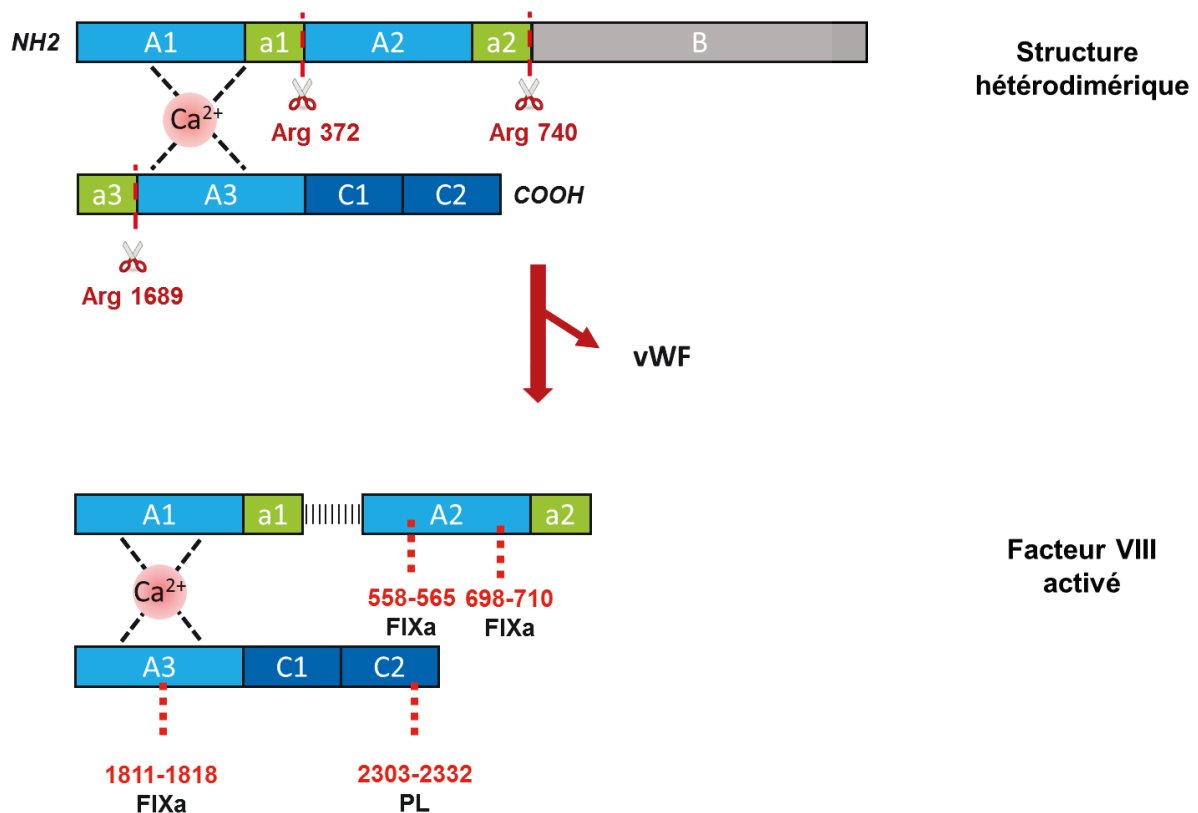


Figure 6. Activation du FVIII. La thrombine active le FVIII par un clivage protéolytique sur la chaîne lourde (Arg372 et Arg740) et sur la chaîne légère (Arg1689), libérant ainsi le VWF. Le FVIII activé adopte alors une conformation hétérotrimérique. Le domaine A1 et la région acide a1 interagissent avec le domaine A2 et la région acide a2 via des interactions faibles. Le FVIIIa se lie aux phospholipides (PL) de la membrane plaquettaire via son domaine C2, et interagit avec le FIXa via ses domaines A2 et A3.

II.7- Catabolisme du FVIII

Le catabolisme du FVIII est dicté d'une part par sa liaison à sa molécule chaperonne le VWF, comme vu précédemment, et d'autre part par son interaction à des récepteurs d'endocytose exprimés à la surface des cellules « scavenger » (macrophages, cellules endothéliales).

II.7.1- Le récepteur LRP1

Le rôle du LRP1 (LDL receptor-related protein-1) ou CD91 dans la clairance du FVIII a été mise en évidence par deux équipes en 1999 (Lenting et al., 1999; Saenko et al., 1999). La pertinence physiologique de ce récepteur dans le catabolisme du FVIII a été démontrée *in vivo* dans un modèle murin, dans lequel la délétion induite de LRP1 entraîne l'augmentation de FVIII plasmatique endogène et l'allongement de sa demi-vie (Bovenschen et al., 2003a). De plus, des études épidémiologiques de deux polymorphismes du gène codant pour le LRP1 ont démontré, chez l'homme, le rôle de ce récepteur dans la régulation du taux de FVIII plasmatique (Vormittag et al., 2007).

Le FVIII présente 3 sites potentiels de liaison au LRP1 (Figure 7): un site de faible affinité, situé au niveau du domaine C2 (Lenting et al., 1999), et deux sites de haute affinité localisés au niveau des domaines A2 et A3 (Bovenschen et al., 2003b; Sarafanov et al., 2006). En conditions physiologiques, le site de liaison situé au niveau de la chaîne lourde (domaine A2) n'est en fait exposé qu'après clivage protéolytique du FVIII (Bovenschen et al., 2006). Il semble ainsi que le FVIII intact se lie au LRP1 seulement via sa chaîne légère, tandis que le FVIIIa se lie au LRP1 via sa chaîne lourde et légère. Par ailleurs, le VWF, complexé au FVIII au niveau de sa chaîne légère, interfère avec la liaison du domaine C2 au LRP1 (Lenting et al., 1999). Une voie alternative a en fait été proposée par l'équipe de Sarafanov : le complexe VWF-FVIII se lie aux protéoglycanes d'héparines sulfatées (HSPG), un composant de la matrice extracellulaire, conduisant à la concentration du FVIII à la surface cellulaire, puis à la dissociation du complexe VWF-FVIII, et exposant ainsi le site de liaison au LRP1 (Sarafanov et al., 2001).

II.7.2- Famille des récepteurs aux LDL

Les études de demi-vie du FVIII humain chez la souris ont montré que le blocage du LRP1 par l'antagoniste RAP augmente significativement plus la demi-vie du FVIII (Saenko et al., 1999) que l'inactivation conditionnelle du gène LRP1 (Bovenschen et al., 2003a). Le RAP n'étant pas un inhibiteur spécifique de LRP1, mais de tous les membres de la famille des récepteurs aux LDL, il est hautement probable que d'autres récepteurs aux LDL jouent un rôle dans le

catabolisme du FVIII plasmatique. Il a par exemple été montré que les LDLR interagissent avec le FVIII et régulent les taux de FVIII circulant par coopération avec le LRP1 (Bovenschen et al., 2005a). Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que le FVIII se lie au VLDLR et à la mégaline avec des affinités avoisinant les 20 nM (Oldenburg et al., 2004).

II.7.3- Famille des récepteurs aux asialoglycoprotéines

Un autre récepteur « scavenger » pour le FVIII a été décrit : l'ASGPR (Bovenschen et al., 2005b). Ce récepteur d'endocytose reconnaît les résidus β -D-galactose et N-acétylgalactosamine. Des expériences réalisées *in vitro* révèlent une absence de liaison de ce récepteur au FVIII délété du domaine B (BDD-FVIII), ce qui suggère que les interactions du FVIII avec ce récepteur ont essentiellement lieu au niveau du domaine B (Figure 7). Cependant, étant donné que le FVIII entier et le BDD-FVIII (Fijnvandraat et al., 1997) ont des demi-vies similaires dans l'organisme, le rôle précis de ce récepteur dans la clairance du FVIII reste à déterminer.

II.7.4- Le Siglec-5

Récemment, Pegon *et al* ont montré que le Siglec-5, récepteur humain appartenant à la famille des lectines, « Sialic-acid binding ImmunoGlobulin-like Lectins », pouvait se lier au VWF et au FVIII. Ces deux protéines comportent des chaînes polysaccharidiques se terminant par des acides sialiques. Alors que la liaison du VWF au Siglec-5 est dépendante de ces acides sialiques, la liaison du FVIII au Siglec-5 semble être indépendante de l'exposition d'acides sialiques. La liaison du FVIII et du VWF au Siglec-5 exprimé à la surface de cellules HEK293 favorise l'endocytose des deux protéines dans les endosomes précoces. De plus, la surexpression de Siglec-5 humain chez la souris, induite par transfert de gène par injection hydrodynamique, entraîne la diminution des concentrations plasmatiques de VWF et du FVIII, suggérant que le Siglec-5 pourrait contribuer à la régulation des taux circulants de VWF/FVIII (Pegon et al., 2012).

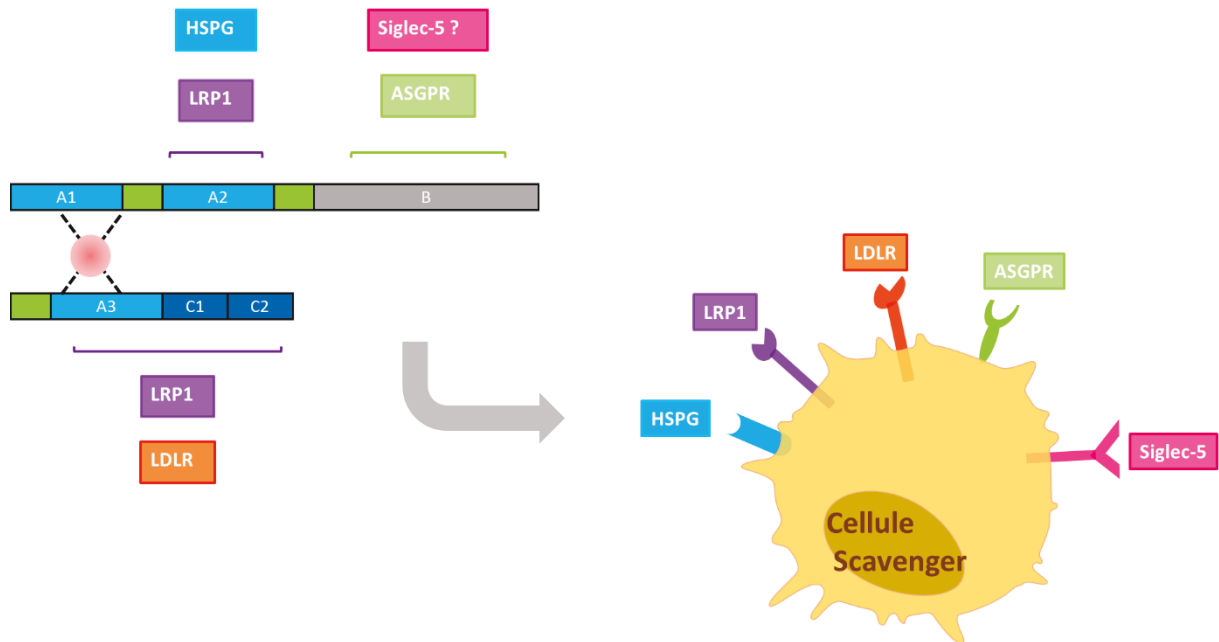


Figure 7. Récepteurs de clairance pour le FVIII. Le FVIII interagit avec le LRP1 via trois sites potentiels situés au niveau des domaines A2, A3 et C2. Certaines de ces régions sont également impliquées dans la liaison du FVIII au LDLR et à l’HSPG. Seul le domaine B du FVIII se lie à l’ASGPR. Le FVIII peut interagir avec le Siglec-5 via les acides sialiques qui recouvrent les chaînes polysaccharidiques du domaine B, mais peut aussi se lier au Siglec-5 indépendamment de l’exposition d’acides sialiques.

III- La réponse immunitaire anti-FVIII

III.1- Dynamique de la réponse immunitaire anti-FVIII

III.1.1- La réponse primaire

D’un point de vue immunologique, l’apparition de la réponse immunitaire anti-FVIII est surprenante pour un antigène administré à faible dose, par voie intraveineuse et en l’absence d’adjuvant. Néanmoins, elle est considérée comme une réponse allogénique classique, dépendante des lymphocytes T (Lacroix-Desmazes et al., 2008).

L’initiation de cette réponse suggère qu’il y a internalisation du FVIII par des cellules présentatrices de l’antigène (CPAs), (Figure 8). Le FVIII endocyté est alors fragmenté au sein de vésicules endosomales, qui fusionnent avec des vésicules de rétention des molécules du complexe majeur d’histocompatibilité de classe II (CMH II). Dans ces compartiments, les peptides endosomaux du FVIII, qui présentent une bonne affinité pour le CMH II, se lient aux molécules de CMH II pour former un complexe qui est alors adressé et exposé à la surface membranaire. Les CPAs migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate

ou les ganglions pour atteindre les zones riches en lymphocytes T (LT). Les complexes CMH II-peptide sont alors présentés par les CPAs aux LT CD4⁺ naïfs.

La reconnaissance du peptide antigénique par le récepteur à l'antigène des LT fournit un premier signal d'activation (signal 1), mais n'est pas suffisante pour induire l'activation des LT CD4⁺. Des signalisations supplémentaires impliquant des interactions ligand-récepteur présents à la surface des cellules T et des CPAs (signal 2) et la présence des cytokines pro-inflammatoires dans le micro-environnement (signal 3) sont nécessaires.

Une de ces signalisations implique l'interaction du ligand de CD40 (CD40L), exprimé à la surface des LT activés et du CD40, exprimé à la surface des CPAs. En effet, le blocage de la signalisation CD40-CD40L par un anticorps monoclonal empêche l'apparition d'anticorps anti-FVIII chez la souris déficiente en FVIII (Reipert et al., 2001; Rossi et al., 2001). L'interaction de B7.2 (CD86) exprimé par les CPAs avec la molécule CD28, exprimée par les LT, est également nécessaire à l'activation de la réponse T anti-FVIII (Qian et al., 2000a).

Une fois activé, les LT CD4⁺ migrent vers les follicules B où les lymphocytes B naïfs, après internalisation du FVIII via leurs immunoglobulines membranaires ("B-cell receptor" ou BCR), présentent aux LT CD4⁺ activés des peptides du FVIII associés au CMH de classe II. La synapse LT/LB ainsi formée mène à l'activation, la prolifération et la différenciation des LB. Certains LB subissent des commutations de classe et des hypermutations somatiques au sein des centres germinatifs, pour devenir des LB mémoires, tandis que d'autres se différencient en dehors des follicules en plasmocytes à courte durée de vie, ces derniers étant responsables de la sécrétion d'anticorps anti-FVIII (Kurosaki et al., 2015).

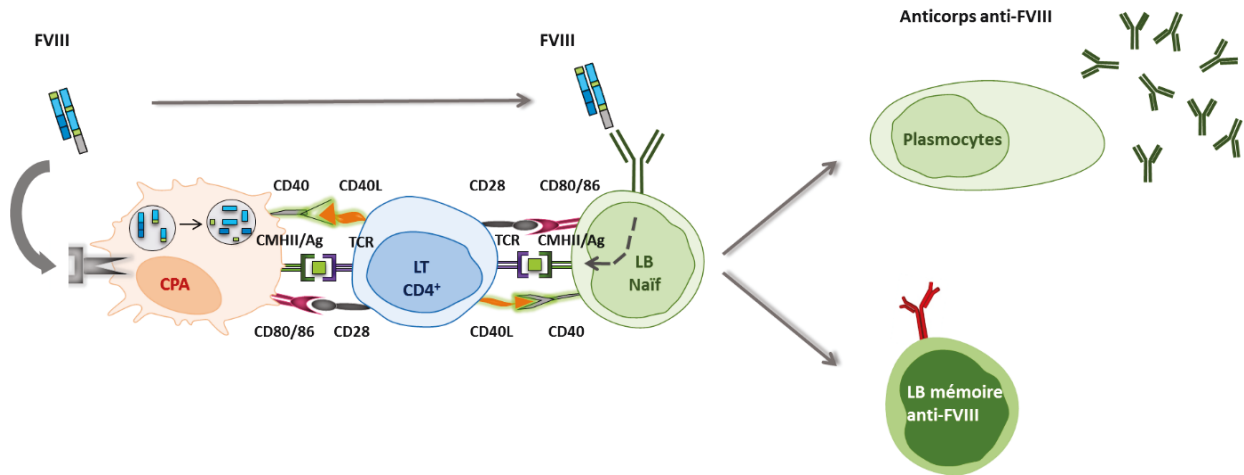


Figure 8. Réponse primaire anti-FVIII. La réponse anti-FVIII débute par l’internalisation du FVIII par les CPAs, au sein desquelles le FVIII est apprêté pour être présenté aux LT CD4⁺ naïfs, sous la forme de peptides associés aux molécules de CMH II. Dans un contexte de micro-environnement pro-inflammatoire (augmentation de l’expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80/86, production de cytokines pro-inflammatoires), la synapse immunologique formée par la CPA et le LT va induire l’activation du LT naïfs en LT effecteur. Les LT CD4⁺ activés activent à leur tour les LB naïfs qui ont précédemment reconnu le FVIII par l’intermédiaire de leur BCR. L’interaction LT/LB induit la prolifération de ces derniers dans les centres germinatifs où ils subissent la commutation de classe et des hypermutations somatiques pour générer des LB mémoires spécifiques du FVIII, tandis que certains LB se différencient en plasmocytes sécréteurs d’anticorps anti-FVIII.

III.1.2- La réponse secondaire

Durant la réponse primaire, les cellules B et T responsables du développement de la réponse immunitaire sont naïves. En revanche, une exposition ultérieure au FVIII recrute les LB mémoires spécifiques du FVIII générés au cours de la réponse primaire (Figure 9). Ces LB sont capables de développer une réponse envers le FVIII plus rapide et plus robuste que les LB naïfs, et leur implication entraîne la production d’anticorps anti-FVIII neutralisants de forte affinité (Kurosaki et al., 2015; Reipert, 2016).

Qian *et al.* ont démontré l’importance de l’interaction des LT et des LB lors de la réponse humorale secondaire anti-FVIII (Qian et al., 2000b) chez la souris hémophile A. En effet, l’administration d’un anticorps monoclonal anti-CD40L, chez les souris déficientes en FVIII ayant déjà développé une réponse immunitaire contre le FVIII, conduit à la disparition des centres germinatifs (CGs), 24h après le traitement. Par ailleurs, l’injection répétée de FVIII parallèlement à l’administration de l’anticorps anti-CD40L prévient la formation de nouveaux GCs et ainsi le développement d’anticorps anti-FVIII, sans toutefois induire une tolérance à long terme. Les interactions CD40-CD40L jouent donc un rôle crucial dans la formation et le maintien des CGs lors d’une réponse secondaire au FVIII.

A noter que la réponse secondaire génère des plasmocytes à longue durée de vie susceptibles de migrer dans la moelle osseuse pour gagner des niches spécifiques (Nutt et al., 2015).

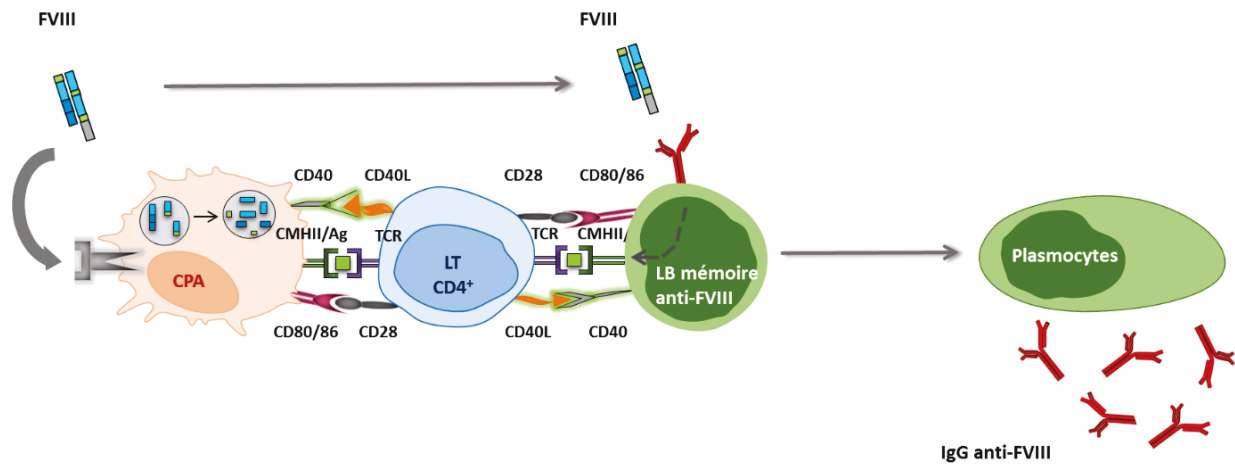


Figure 9. Réponse secondaire anti-FVIII. Lors d’une exposition ultérieure au FVIII, les LB mémoires spécifiques du FVIII peuvent jouer le rôle de CPA en endocytant le FVIII après sa liaison au BCR de haute affinité. La signalisation LT/LB induit l’activation du LB mémoire et sa différenciation en plasmocyte sécréteur d’IgG de haute affinité pour le FVIII.

III.2- Les facteurs de risque liés au développement d’inhibiteurs

La recherche de facteurs de risque liés au développement d’inhibiteurs a mis en évidence que la réponse immunitaire anti-FVIII était une complication multifactorielle, impliquant à la fois des facteurs de risque génétiques et environnementaux.

III.2.1- Les facteurs de risque génétiques

Lorsqu’il existe un historique d’apparition d’inhibiteurs au sein de la famille d’un patient, le risque pour ce patient de développer un inhibiteur est multiplié par 3 (Gill, 1999). Cette observation révèle l’importance des facteurs de risque génétiques dans l’apparition des inhibiteurs.

III.2.1.1- La mutation du gène *F8*

Parmi ces facteurs, le type de mutation du gène *F8* est bien établi, et illustré par le fait que 30% des patients hémophiles A sévères développent des inhibiteurs (Schwaab et al., 1995), tandis que seulement 5% des hémophiles A modérés sont touchés par cette complication (Hay, 1998). Ainsi, les patients dits « CRM négatifs », ayant une mutation entraînant l’absence d’expression de FVIII circulant, ont-ils plus de risque de développer des inhibiteurs. En effet, en absence

d'éducation thymique au FVIII des LT CD4⁺ de ces patients, les LT spécifiques du FVIII n'ont pas été éliminés lors de la sélection négative, et il n'y a pas eu d'induction de cellules T régulatrices spécifiques du FVIII.

Ainsi, les patients présentant des altérations sévères comme l'inversion de l'intron 22, des larges délétions et des mutations non-sens présentent un risque accru d'apparition d'inhibiteurs (Goodeve and Peake, 2003). Ces mutations conduisent à l'expression d'un FVIII fortement tronqué (large mutation, mutation non-sens), ou à l'absence totale de FVIII endogène (inversion intron 22). Néanmoins, Gouw *et al.* ont réalisé une méta-analyse sur 5283 patients hémophiles A sévères issues de 30 cohortes différentes, qui révèle un risque plus important de développer des inhibiteurs lors d'une large délétion et d'une mutation non-sens comparé à l'inversion de l'intron 22 (Gouw et al., 2012). Ces résultats sont surprenants étant donné l'absence totale de FVIII endogène chez ces patients, et donc l'absence supposée de tolérance du système immunitaire au FVIII exogène. L'observation de Pandey *et al* de l'expression intracellulaire de deux chaînes polypeptidiques du FVIII (FVIII_{I22I} et FVIII_B) par les PBMC et les cellules hépatiques de ces patients pourrait donner un début d'explication (Pandey et al., 2013). Ces deux chaînes polypeptidiques pourraient probablement être exprimées par les cellules endothéliales thymiques médullaires de ces patients et ainsi favoriser l'induction de tolérance des LT au FVIII. Ces résultats restent cependant à confirmer car une autre étude rapporte l'absence d'ARNm codant le FVIII dans les PBMC (Everett et al., 2014).

III.2.1.2- Les allèles HLA de classe II

L'haplotype HLA du patient a aussi été proposé comme étant un facteur de risque. Des études cliniques et des études de modélisation suggèrent que certains haplotypes HLA pourraient être associés à un risque élevé d'apparition d'inhibiteurs, tandis que d'autres seraient protecteurs. Ainsi, l'haplotype HLA DRB1*15 et DQB1*0602 a été associé à un risque élevé d'apparition d'inhibiteurs (Hay et al., 1997; Oldenburg et al., 1997; Pavlova et al., 2009), tandis que l'haplotype HLA DRB1*11 et DQB1*03 a été associé à un risque faible de développement d'inhibiteurs (Pergantou et al., 2013). Cependant, ces observations reposent sur des cohortes restreintes en nombre de patients, des investigations sur des cohortes plus grandes sont nécessaires pour confirmer l'importance des haplotypes HLA dans l'apparition d'inhibiteurs.

III.2.1.3- Les gènes de l'immunité

L'analyse de polymorphismes de nucléotide de gènes de l'immunité a mis en évidence une corrélation entre certains polymorphismes et l'apparition d'inhibiteurs. Le groupe d'Astermark

a été le premier à identifier des polymorphismes des gènes du TNF α , de l'IL-10 ou encore du CTLA-4 associés au développement d'inhibiteurs (Astermark et al., 2006a, 2006b, 2007). Depuis, de nombreuses études ont corroborées ces observations (Pavlova et al., 2009, 2009; Pinto et al., 2012). Au laboratoire, il a été montré une corrélation entre certains polymorphismes du gène de l'hème oxygénase-1 et le développement d'inhibiteurs (Repressé et al., 2013). L'hème oxygénase-1 catalyse la formation de monoxyde de carbone à partir de l'hème et a été associé aux fonctions des LT régulateurs (Brusko et al., 2005; Choi et al., 2005).

Récemment, l'apparition de nouvelles techniques de séquençage haut débit a permis d'identifier de nouveaux marqueurs génétiques de l'immunité associés à l'apparition d'inhibiteurs. Le groupe d'Astermark a ainsi analysé par étude d'association pangénomique 13.331 polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs) parmi 1.081 gènes de l'immunité chez 833 hémophiles A sévères, issues de 3 cohortes différentes (Astermark et al., 2013). Treize SNPs ont été associés significativement à l'apparition d'inhibiteurs pour les 3 cohortes, parmi eux, 5 sont corrélés à un risque accrue (MAPK9, DOCK2, CD44, IQGAP2 et CSF1R), tandis que les 8 autres semblent être protecteurs (PDGFRB, PCGF2, HSP90B1, F13A1, IGSF2, ALOX5AP, MAP2K4 et PTPRN2). Plus récemment, le groupe de Peyvandi a identifié 10 variants génétiques associés au risque inhibiteur par séquençage à haut débit d'exomes (Gorski et al., 2016). Ils ont en particulier identifié un variant situé dans une région hautement conservé entourant le locus *LCT* du chromosome 2q21 comme étant fortement associé au développement d'inhibiteurs. Le gène *LCT* code pour la lactase-phlorizine hydrolase, requise pour la digestion du lactose au niveau du petit intestin.

III.2.2- Les facteurs de risques environnementaux

III.2.2.1- Intensité et modalité du traitement

L'âge du patient au moment de la première perfusion a été proposé comme facteur de risque. Une première étude a ainsi montré que le risque de développer des inhibiteurs est 3 fois plus élevé lorsque le patient est traité avant l'âge de 6 mois qu'après 12 mois (Lorenzo et al., 2001). Depuis, des études ont contredit cette observation (van der Bom et al., 2003; Gouw et al., 2007b) qui était biaisée par une différence d'intensité de traitement en fonction de l'âge des patients. L'intensité du traitement a en effet été proposée comme facteur de risque. Plusieurs études cliniques ont démontré que des traitements intensifs continus d'une durée supérieure à 5 jours sont associés à un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer des inhibiteurs (Gouw et al., 2007b, 2013b; Maclean et al., 2011). La modalité du traitement selon l'administration de

FVIII thérapeutique à la demande ou en prophylaxie a également été proposée comme facteur de risque. En effet, la théorie selon laquelle un antigène thérapeutique exogène induirait une réponse immunitaire par sa présence discontinue (Pradeu et al., 2013) pourrait expliquer la prévalence plus faible d'inhibiteurs observée chez les patients traités en prophylaxie (Gouw et al., 2007b, 2013b; Kurnik et al., 2010).

III.2.2.2- Statut inflammatoire du patient

Selon la « théorie du danger » de Matzinger (Matzinger and Kamala, 2011), la présence de « signaux de danger » dans le micro-environnement où se produit le saignement pourrait favoriser l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII. Les actes chirurgicaux chez les patients hémophiles sont parfois suivis de l'apparition d'inhibiteurs du FVIII (Koestenberger et al., 2000), et une étude basée sur une analyse systématique des données de la littérature montre que le risque est augmenté de 4 fois lorsque les patients reçoivent de fortes doses de FVIII en prévision d'une chirurgie comparé à un saignement (Eckhardt et al., 2011). Il est probable que la lésion de l'endothélium induit, à cette occasion, une activation des cellules endothéliales suivie de la sécrétion dans la circulation de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires qui pourraient participer au recrutement et à l'activation des effecteurs immunitaires. Par ailleurs, l'injection de FVIII en association avec une infection ou une vaccination pourrait augmenter le risque de développer des inhibiteurs en raison de la présence de signaux de danger. Ainsi, Kurnik *et al* ont-ils réalisé une étude pilote chez 26 PUPs (previously untreated patients) traités avec du FVIII en prophylaxie, dès les premiers signes de saignements, à une fréquence et des doses plus faibles que le traitement standard (1 x 25 UI/kg/semaine versus 3 x 40-50 UI/kg/semaine pour le traitement standard). Au cours des 20 premiers jours d'exposition au FVIII, les injections ont été rigoureusement réalisées à distance de potentiels événements inflammatoires tels que les infections, les actes chirurgicaux ou les vaccinations (Kurnik et al., 2010). Dans le cas d'épisodes hémorragiques sévères, de plus fortes doses de FVIII ont été rapidement administrées afin de minimiser le nombre d'injections et de réduire les lésions tissulaires. L'incidence d'apparition d'inhibiteurs comparée à celle d'un groupe témoin historique (30 patients ayant reçu le traitement prophylactique standard) a ainsi été considérablement réduite (48% groupe témoin versus 3,8% groupe d'étude). Ces travaux suggèrent que l'injection du FVIII exogène dans un contexte qui évite tout signal de danger (saignement, infection, immunisation, ...) diminue le risque d'allo-immunisation.

Néanmoins, ces résultats n'ont pu être confirmés depuis dans d'autres cohortes de patients (Astermark, 2015), et des études précliniques menées chez la souris et le rat hémophiles A sont

contradictoires. En effet, alors qu'au laboratoire, nous avons montré que l'induction de saignements aigus au niveau des articulations chez la souris hémophile A n'augmente pas la réponse immunitaire anti-FVIII (Peyron et al., 2015), tandis que Lovgren *et al* ont observé que les épisodes hémorragiques accélèrent l'apparition de la réponse anti-FVIII chez le rat hémophile (Lövgren et al., 2016b). Par ailleurs, l'injection d'antigènes vaccinaux avant l'administration répétée de FVIII réduit l'incidence de la réponse immunitaire anti-FVIII chez un modèle de souris hémophile A (Lai et al., 2016a).

III.2.2.3- La source de FVIII thérapeutique

La source de FVIII thérapeutique, recombinant versus dérivé de plasma, reste le facteur de risque le plus controversé et le plus débattu au sein de la communauté scientifique. En effet, il est plausible que les différentes modifications post-traductionnelles des FVIII recombinants produits par des cellules de hamster (CHO ou BHK) engendrent des molécules plus immunogènes que le FVIII natif contenu dans les préparations dérivées de plasma (Hironaka et al., 1992). Par ailleurs, les protéines plasmatiques contenues dans le FVIII dérivé de plasma, telles que le VWF, pourraient moduler la réponse immunitaire anti-FVIII en empêchant l'endocytose du FVIII par les CPAs (Behrmann et al., 2002; Dasgupta et al., 2007a; Delignat et al., 2007). Il a par ailleurs été montré que le FVIII dérivé de plasma contient des traces de cytokines, comme le TGF- β et l'IL-10, soupçonnées d'être capables de moduler la réponse anti-FVIII chez la souris hémophile A (Kallas et al., 2007; Qadura et al., 2009). Les études qui permettent de rendre compte de l'immunogénicité d'un FVIII sont réalisées chez des PUPs. Ainsi, deux études basées sur une revue d'analyses systématiques des essais cliniques montrent-elles une prévalence d'inhibiteurs presque 2 fois plus élevée chez les patients traités avec du FVIII recombinant comparé aux patients traités avec du FVIII dérivé de plasma, 27% versus 10,8% (Wight and Paisley, 2003), et 27,4% versus 14,3% (Iorio et al., 2010). Cependant, une étude similaire n'incluant que des études prospectives ne montrent pas de différence significative (27% versus 21%) (Franchini et al., 2012). Depuis, une étude prospective internationale réalisée sur 574 PUPs a montré un risque similaire de développement d'inhibiteurs entre les FVIII dérivés de plasma et recombinants (Gouw et al., 2013a), tandis que Peyvandi *et al* ont récemment réalisé une étude prospective internationale randomisée sur 251 PUPs et montré une prévalence d'inhibiteurs significativement plus élevée avec le FVIII recombinant comparé au FVIII dérivé de plasma (44,5% versus 26,7% (Peyvandi et al., 2016b)). Néanmoins, ces études comportent des biais, en particulier une hétérogénéité des populations de patients en termes de facteurs de risque.

III.3- Acteurs cellulaires et moléculaires impliqués au cours de la réponse immunitaire anti-FVIII

III.3.1- L'endocytose

III.3.1.1- Les cellules présentatrices d'antigènes

En théorie, différents types de CPA pourraient être impliqués dans l'endocytose du FVIII thérapeutique chez les patients. Parmi ceux-là, les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les LB sont des candidats potentiels. Cependant, le type de CPA impliqué dépend du contexte immunitaire du patient, selon qu'il s'agit de sa première exposition au FVIII ou non.

Chez les PUPs dont le système immunitaire n'a encore jamais « rencontré » le FVIII, la reconnaissance du FVIII par les LB naïfs est peu probable étant donné la faible fréquence de LB spécifiques du FVIII chez un patient naïf. Dans ce contexte, les macrophages et les DC semblent être les meilleurs candidats pour l'induction d'une réponse LT CD4⁺.

Les macrophages sont généralement décrits comme étant des cellules phagocytaires très efficaces du fait de l'expression d'un éventail assez large de récepteurs d'endocytose. Dans le sang, ils circulent en tant que monocytes et se différencient en macrophages en infiltrant les tissus. De nombreuses sous-populations de macrophages sont présentes dans la rate. Ainsi, au laboratoire, nous avons observé une co-localisation du FVIII, 30 min après injection par voie intraveineuse, avec les macrophages métalophiliques et les macrophages de la zone marginale de la rate dans le modèle murin d'hémophilie A (Navarrete et al., 2009). Au cours de ces travaux, l'élimination des macrophages spléniques et des cellules dendritiques CD11c⁺/CD8 α par injection de liposomes chargés en clodronate chez la souris hémophile A abrogeait la réponse humorale anti-FVIII (Navarrete et al., 2009). Cependant, cette observation ne permet pas d'affirmer que les macrophages de la zone marginale jouent le rôle de CPAs dans la réponse au FVIII, mais pourrait refléter leur rôle dans les échanges cellulaires et moléculaires nécessaires à la mise en place de cette réponse. Par ailleurs, la capacité des macrophages à exprimer des molécules de co-stimulation et activer des LT CD4⁺ naïfs est moindre en comparaison aux DC (Delamarre et al., 2005; Trombetta and Mellman, 2005).

Les DC sont en effet décrites comme de véritables cellules « sentinelles » (Banchereau and Steinman, 1998). Elles possèdent une forte plasticité, elles circulent sous forme immature dans la circulation sanguine, mais sont aussi présentes dans de nombreux tissus. Elles

échantillonnent les antigènes et, simultanément, détectent les signaux de danger. Suite à leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires, elles « décident » des conséquences à donner à la présentation de l'antigène aux cellules T : inactivation des cellules T et induction de tolérance immunitaire ou, au contraire, stimulation des cellules T et activation de la machinerie immunitaire, selon la nature des signaux qu'elles ont perçus dans le micro-environnement.

Au laboratoire, nous avons montré *in vitro* que les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MO-DCs) sont capables d'endocyter le FVIII et de le présenter à une lignée T CD4⁺ humaine spécifique du FVIII. Depuis, d'autres travaux ont également montré la capacité des DC à endocyter et présenter le FVIII aux LT CD4⁺ (van Haren et al., 2011; Herczenik et al., 2012).

Chez les patients ayant déjà développé une réponse immunitaire active anti-FVIII, comme évoqué précédemment, l'endocytose du FVIII peut se faire (i) via l'internalisation de complexes immuns FVIII-IgG anti-FVIII par les récepteurs Fc présents à la surface des LB, DC et macrophages, (ii) par le BCR présent à la surface des LB mémoires spécifiques du FVIII, (iii) par des récepteurs d'endocytose exprimés à la surface des DC et des macrophages, comme lors d'une réponse primaire.

III.3.1.2- Les voies d'endocytose du FVIII et les motifs du FVIII impliqués

Théoriquement, le FVIII pourrait être internalisé de trois manières : par macropinocytose, par phagocytose ou par endocytose dépendante de récepteurs. La macropinocytose concerne l'internalisation de fortes quantités d'antigènes solubles de façon non-spécifique par invagination de la membrane. Au vu des faibles quantités de FVIII dans la circulation, il est peu probable que le FVIII soit internalisé par les CPAs par macropinocytose. La phagocytose consiste en la capture de grosses particules solubles comme les virus, les bactéries ou encore les cellules apoptotiques. En ce qui concerne les protéines, l'endocytose passe le plus souvent par l'intermédiaire de récepteurs. L'endocytose dépendante de récepteurs est efficace d'un point de vue cinétique et est spécifique de certains fragments des glycoprotéines, ce qui permet la capture d'antigènes présents à de faibles concentrations dans le milieu environnant (Trombetta and Mellman, 2005).

Le FVIII circulant principalement sous forme de complexe avec le VWF, il n'est pas exclu que l'internalisation du complexe VWF-FVIII par un récepteur d'endocytose liant le VWF mène à l'apprêtement antigénique du FVIII par les CPAs. Plusieurs récepteurs d'endocytose pour le

FVIII ou le VWF ont été identifiés (Lai et al., 2016b; Lenting et al., 2010). L'endocytose du FVIII ou du complexe FVIII/VWF peut soit mener à son accumulation dans les lysosomes, puis à sa dégradation, soit à son adressage vers les endosomes, conduisant à la présentation de peptides associés aux molécules de CMH II, aux LT CD4⁺. Le devenir du FVIII (catabolisme ou apprêtement et présentation aux cellules T) suite à l'endocytose via des récepteurs au FVIII ou au VWF dépend du site d'internalisation, de la nature des cellules et des récepteurs responsables de l'endocytose.

Pour ce qui concerne les MO-DCs utilisées comme modèle de CPA, plusieurs études ont montré que lorsque le FVIII est complexé au VWF, celui-ci n'est ni endocyté ni présenté aux LT CD4⁺ (Dasgupta et al., 2007a; Delignat et al., 2012; Herczenik et al., 2012). La majorité des connaissances accumulées sur les récepteurs d'endocytose du FVIII concernent principalement son catabolisme (Bovenschen et al., 2005b; Lai et al., 2016b; Lenting et al., 1999; Saenko et al., 1999; Sarafanov et al., 2001) et ont été décrit précédemment (paragraphe II.6). A ce jour, le seul récepteur d'endocytose identifié pour mener à l'apprêtement antigénique du FVIII et à sa présentation aux LT est le CD206 encore appelé « macrophage mannose receptor » (MMR) (Navarrete et al., 2010). En effet, au laboratoire, les travaux de Dasgupta *et al* ont montré que, bien que les MO-DCs expriment un LRP1 fonctionnel, elles n'internalisent pas le FVIII via ce récepteur, mais en partie par le CD206 (Dasgupta et al., 2007b, 2008; Repessé et al., 2012). Ainsi, la pré-incubation des MO-DCs avec le mannane, un antagoniste des récepteurs sensibles aux mannoses, inhibe-t-elle de 50% l'endocytose du FVIII par les MO-DCs et abroge l'activation d'une lignée T CD4⁺ humaine anti-FVIII (Dasgupta et al., 2007b).

Le CD206 est un récepteur d'endocytose dépendant d'ions divalents qui appartient à la famille des lectines de type C. La distribution tissulaire du CD206 est assez bien documentée chez la souris, mais demeure en revanche encore mal connue chez l'homme. De manière générale, le CD206 est exprimé par différentes sous-populations de macrophages, de DC, ainsi que par les cellules endothéliales microvasculaires hépatiques, spléniques, lymphatiques et dermiques (Martinez-Pomares, 2012; Pontow et al., 1992). Le CD206 est impliqué dans les réponses immunitaires innées de par sa capacité à reconnaître une grande variété d'agents pathogènes (bactéries Gram positive ou Gram négative, levures, parasites et mycobactéries) (Stahl and Ezekowitz, 1998). Il joue également un rôle dans la réponse immunitaire adaptative et mène à l'apprêtement antigénique (Taylor et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que le CD206 régule le catabolisme d'un grand nombre de glycoprotéines endogènes chez la souris (Lee et al., 2002). Néanmoins, le rôle du CD206 dans l'endocytose et l'apprêtement antigénique du FVIII *in vivo* reste à démontrer. Par ailleurs, au laboratoire, nous n'avons pas observé l'implication des

récepteurs sensibles aux mannoses dans l'endocytose du FVIII par un modèle de DC murines, les BM-DCs (Delignat et al., 2012).

Plus récemment, le groupe de Lillicrap a montré qu'un autre récepteur de la catégorie lectine de type C, le CLEC4M encore appelé CD299, L-SIGN ou DC-SIGNR pouvait se lier, internaliser et cataboliser le VWF et le FVIII, complexé ou non (Lai et al., 2016b; Rydz et al., 2013). Le CLEC4M est exprimé par les cellules endothéliales sinusoidales du foie, du placenta, des ganglions lymphatiques, du poumon et du tractus gastro-intestinal (Zhang et al., 2014). De manière similaire au CD206, la liaison du CLEC4M est dépendante des oligosaccharides hautement mannosylés et exposés du FVIII (Figure 10). Bien que le CLEC4M soit principalement décrit comme un récepteur d'adhésion, un rôle du CLEC4M dans l'immunogénicité du FVIII ne peut être exclu.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à éliminer ces résidus hautement mannosylés par mutagenèse dirigée, afin d'évaluer leur rôle dans l'immunogénicité du FVIII.

Par ailleurs, les travaux de Herczenik *et al* ont montré que l'anticorps monoclonal KM33, spécifique d'un épitope du domaine C1 du FVIII, bloque l'endocytose du FVIII par les MO-DCs sans toutefois identifier le récepteur impliqué (Herczenik et al., 2012). L'anticorps KM33 se lie aux résidus Arg2090, Lys2092 et Phe2093 du domaine C1 du FVIII. La substitution de ces résidus par des Ala par mutagenèse dirigée abroge l'endocytose du FVIII par les MO-DCs (Wroblewska et al., 2012). Récemment, des travaux du laboratoire ont montré que les Arg2215 et 2220 du domaine C2, homologue au domaine C1, participent également à l'endocytose du FVIII par les MO-DCs (cf annexe (Gangadharan et al., 2016)).

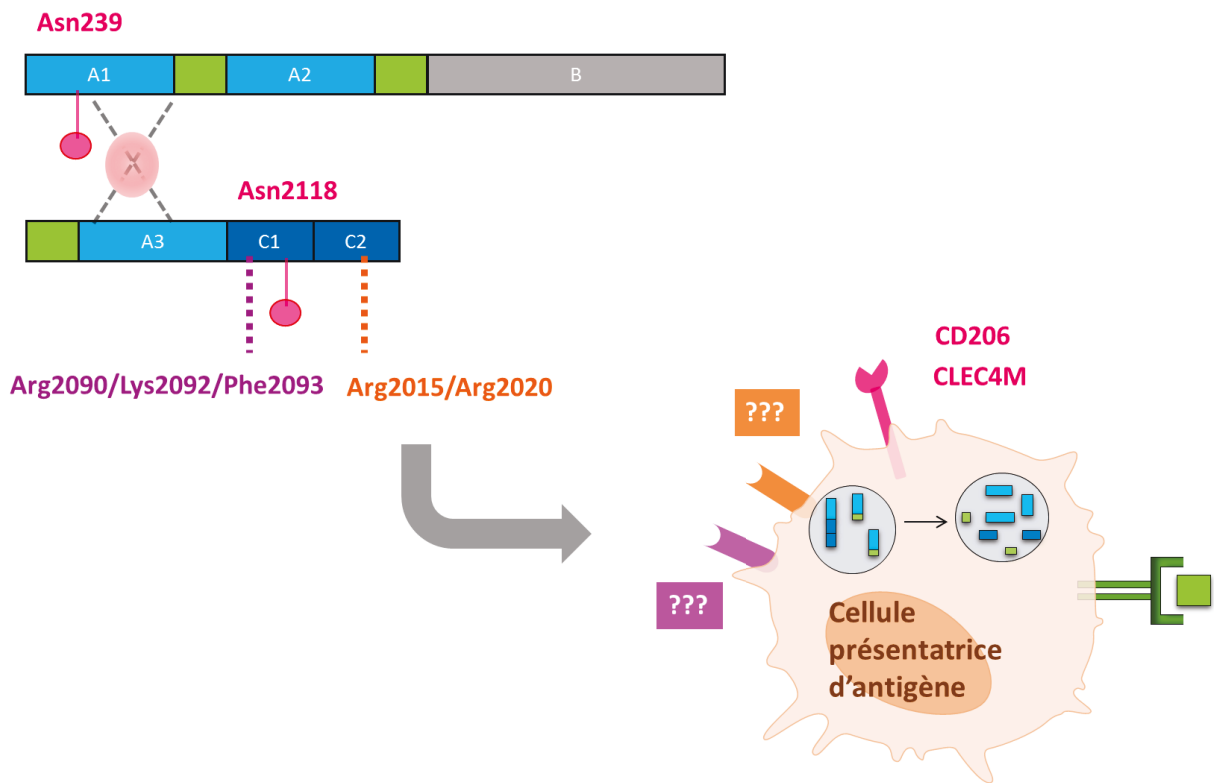


Figure 10. Voies d'endocytose du FVIII et motifs impliqués. Deux sites de N-glycosylations au niveau des résidus Asn239 et Asn2118 sont impliqués dans la liaison du FVIII au CD206 et au CLEC4M. L'endocytose du FVIII par le CD206 mène à l'apprêtement antigénique du FVIII par les MO-DCs. Les résidus Arg2090/Lys2092/Phe2093 du domaine C1 et Arg2215/Arg2220 du domaine C2 sont également impliqués dans l'endocytose du FVIII par les DC humaines. Le(s) récepteur(s) à l'origine de l'endocytose du FVIII par l'intermédiaire de ses résidus demeure(nt) inconnu(s).

III.3.1.3- Les signaux de danger

Comme évoqué précédemment, une réponse immunitaire n'a lieu que si les CPAs sont activées par des signaux de danger via des récepteurs appartenant à la famille des PRR (« Pattern recognition receptor »). Ces signaux de danger peuvent être endogènes tels que des molécules issues d'une lésion ou d'un stress cellulaire, ou exogènes, tels que des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMP). Le système immunitaire prend ainsi la décision d'enclencher ou non une réponse contre l'antigène (endogène ou exogène) en fonction des signaux d'alerte présents dans le micro-environnement. Le développement des inhibiteurs du FVIII chez les patients hémophiles A suggère que leur organisme a reçu un signal de danger dans le contexte du traitement. A ce jour, la ou les source(s) de signaux de danger dans la réponse immunitaire anti-FVIII demeure(nt) inconnue(s). Il a été suggéré que la molécule FVIII elle-même pouvait être à l'origine du signal de danger. Néanmoins, Pfistershammer *et al* ont montré *in vitro* que le FVIII n'est pas capable d'induire directement la maturation des MO-DCs

(Pfistershammer et al., 2006) ce qui semble exclure une reconnaissance directe du FVIII par les PRR exprimés par les DCs. Plus récemment, Miller *et al* ont observé un effet synergique du FVIII dérivé de plasma et du lipopolysaccharide (LPS) sur l'expression des molécules de co-stimulation CD83 et CD86 par les MO-DCs. Il semblerait ainsi que le FVIII dérivé de plasma pourrait jouer un rôle synergique sur la maturation des DCs dans un contexte de signal de danger (Miller et al., 2015). Néanmoins, l'absence d'effet du FVIII recombinant dans leur système suggère que l'effet synergique observé pourrait être induit par une (des) protéine(s)/molécule(s) contenue(s) dans le FVIII dérivé de plasma et non par la molécule FVIII.

Il a été également envisagé que le signal de danger pouvait être inhérent à l'activité pro-coagulante du FVIII injecté. En effet, l'injection du FVIII dans un contexte de saignement déclenche l'activation du FX accumulé jusqu'alors, et entraîne une explosion de la génération de thrombine (Dargaud et al., 2005). Skupsky *et al* ont ainsi montré que le FVIII inactivé par la chaleur est moins immunogène que le FVIII natif, et que l'injection d'hirudine, un inhibiteur de la thrombine, au moment de l'administration de FVIII, réduit considérablement la réponse immunitaire anti-FVIII chez la souris hémophile A (Skupsky et al., 2009). Depuis, ces travaux ont été contredits par les travaux de Meeks *et al*, qui ont généré des mutants du FVIII portant soit la mutation Val634Met, soit les mutations Arg372Ala/Arg1689Ala. Le mutant Arg372Ala/Arg1689Ala n'est pas protéolysé par la thrombine et ne se dissocie donc pas du VWF, tandis que le Val634Met peut être clivé par la thrombine, mais est en revanche inactif. Chez la souris hémophile A, le mutant Val634Met est aussi immunogène que le FVIII sauvage, tandis que le mutant Arg372Ala/Arg1689Ala est légèrement moins immunogène (Meeks et al., 2012). Au laboratoire, nous avons confirmé ces observations en montrant une immunogénicité similaire du mutant Val634Met dans un contexte d'absence d'activation de la voie extrinsèque de la coagulation chez la souris hémophile A ((cf annexe (Gangadharan et al., 2014)).

III.3.2- La réponse lymphocytaire T CD4⁺

L'implication des LT CD4⁺ dans le développement de la réponse anti-FVIII semble évidente de par le fait qu'une grande proportion d'inhibiteurs du FVIII chez les patients hémophiles A sont d'isotype IgG4 (Gautier et al., 1996; Lavergne et al., 1976), et de très haute affinité pour le FVIII (Jacquemin et al., 1998). Cela implique que les LB anti-FVIII ont subi des hypermutations somatiques et une commutation de classe isotypique au niveau des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, processus dépendants des LT CD4⁺ (De Silva and Klein, 2015). Par ailleurs, la disparition des inhibiteurs chez les patients hémophiles A

contaminés par le VIH et présentant un déficit de LT CD4⁺ démontre l'importance des LT CD4⁺ dans le maintien de la réponse immunitaire anti-FVIII (Bray et al., 1993).

La présence de LT CD4⁺ anti-FVIII circulants chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs a été mise en évidence par test de prolifération après stimulation *in vitro* avec du FVIII natif ou des peptides dérivés du FVIII (Reding et al., 2000; Singer et al., 1996). Néanmoins, la présence de LT CD4⁺ circulants ayant la capacité de proliférer *in vitro* suite à la stimulation avec des peptides du FVIII a également été observée chez les patients hémophiles A sans inhibiteurs et les donneurs sains (Jones et al., 2005; Reding et al., 2000, 2003, 2004). La prolifération de LT CD4⁺ en présence de FVIII ne reflète donc pas forcément le développement d'une réponse immunitaire de type inhibitrice au FVIII, mais c'est probablement le phénotype des LT CD4⁺ anti-FVIII, et en particuliers leur profil cytokinique, qui détermine la mise en place d'une tolérance ou l'induction d'une réponse immunitaire anti-FVIII.

Hu *et al* ont ainsi analysé le profil cytokinique de blastes T induits par stimulation *in vitro* avec du FVIII à partir de PBMC de donneurs sains, et de patients hémophiles A avec ou sans inhibiteurs par cytométrie en flux. Ils ont ainsi observé que les blastes T de patients hémophiles A avec inhibiteurs sont de phénotype Th1 (IFN γ positif) et Th2 (IL-4 positif), tandis que les blastes T de patients hémophiles A sans inhibiteur présentent un phénotype Th1 et Th3 (TGF- β 1 positif) (Hu et al., 2007). De manière intéressante, les blastes T issus de donneurs sains sont de phénotype Th1 ou Th3, mais jamais Th2. Ces résultats suggèrent que les LT CD4⁺ Th1 sont impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII, tandis que la polarisation des LT CD4⁺ vers le phénotype Th2 favorise le développement d'une forte réponse immunitaire au FVIII avec production d'anticorps inhibiteurs. L'observation de blastes T TGF- β 1⁺ à partir des PBMC de donneurs sains et de patients sans inhibiteur indique que la polarisation des LT CD4⁺ vers Th3 pourrait participer au maintien d'une tolérance au FVIII. Chez la souris hémophile A, le développement d'inhibiteurs a également été associé à une réponse de type Th1 (IFN γ) et Th2 (Qadura et al., 2011; Rossi et al., 2001).

Le groupe de Conti-Fine a identifié par test de prolifération de LT CD4⁺ de patients hémophiles A en présence de peptides du FVIII, différents épitopes T situés au niveau des domaines A2, A3 et C2 (Hu et al., 2004; Reding et al., 2003, 2004). Jones *et al* ont analysé les spécificités épitopiques de lignées T CD4⁺ issus de patients hémophiles A par test de prolifération avec des peptides chevauchants la séquence entière du FVIII délété du domaine B (Jones et al., 2005). Ils ont identifié un épitope T au niveau du domaine C1, situé dans la région 2098-2112. Ce peptide 2098-2112 induit également une réponse T CD4⁺ avec les PBMC de donneurs sains, et présente une forte affinité pour plusieurs allèles HLA-DR. De manière intéressante, le groupe

de Pratt a observé en utilisant des tétramères CMH II-peptide du FVIII, que les LT CD4⁺ de patients hémophiles A modérés avec inhibiteurs, présentant une mutation faux sens (un seul aa muté) au niveau du gène *F8*, reconnaissent un épitope qui comporte la séquence sauvage (aa non substitué) et non la séquence mutée (James et al., 2011).

Plus récemment, le groupe de Reipert a développé un modèle murin hémophile A humanisé, cette souris déficiente pour le FVIII et pour le CMH II murin, exprime les molécules CMH II humaines : HLA-DRA*01:01 et HLA-DRB1*15:01 (haplotype associé au risque de développer des inhibiteurs). Ils ont identifié chez ce modèle murin 8 régions comportant des épitopes T CD4⁺, au niveau des domaines A1, A2, A3 et C1 (Steinitz et al., 2012).

Au début de ma thèse, j'ai eu pour objectif de produire un hybridome T CD4⁺ anti-FVIII restreint au HLA DRB1*01:01 afin d'étudier l'apprêtement antigénique du FVIII et sa présentation aux LT CD4⁺ par les CPAs humaines et murines.

III.3.3- La réponse lymphocytaire B

Les réponses humorales sont liées à la génération et au maintien de cellules sécrétrices d'anticorps (ASCs ou plasmocytes) issues de la différenciation de précurseurs lymphocytaires B matures. Les cellules B matures peuvent appartenir à 3 sous-populations : les cellules B folliculaires, les LB de la zone marginale et les cellules B1 (Allman and Pillai, 2008; Carsetti et al., 2004).

III.3.3.1- La réponse lymphocytaire B primaire

Il est généralement admis que les réponses humorales contre des protéines impliquent la voie des LB folliculaires au sein des organes lymphoïdes secondaires (Nutt et al., 2015). La phase précoce de cette voie d'activation correspond à une réponse extra-folliculaire qui est initiée par l'interaction de l'Ag avec le BCR du LB folliculaire naïf. Cette interaction initiale induit l'activation et la transduction de signaux intra-cellulaires pouvant éventuellement mener à la différenciation des LB folliculaires en plasmocytes à courte durée de vie. Ces plasmocytes produisent des IgM et des IgG, généralement de faible affinité voire d'affinité modérée pour l'antigène contre lequel ils sont dirigés.

Durant la phase tardive de la réponse B folliculaire, les LB activés rentrent à nouveau dans les follicules B où ils interagissent avec les LT folliculaires 'helper', commencent à proliférer et forment les CGs (Nutt et al., 2015). Les CGs sont des micro-environnements spécialisés propices aux interactions entre LB et LT folliculaires. Ces interactions entraînent la prolifération et la sélection de LB folliculaires ainsi que l'accumulation d'hypermutations

somatiques sur les gènes codant pour les régions variables des BCRs. Les réponses associées aux CGs génèrent des plasmocytes à longue durée de vie qui migrent vers la moelle osseuse où ils peuvent survivre longtemps au sein de niches spécifiques (Moser et al., 2006) et qui produisent des anticorps de haute affinité. Les réponses des CGs génèrent également des LB mémoires capables de se différencier rapidement en ASCs après réexposition à l'antigène (Kometani et al., 2013).

La mise en évidence d'anticorps anti-FVIII de faible affinité chez les donneurs sains et chez les patients hémophiles A sans inhibiteur pourrait résulter d'une différenciation B extra-folliculaire (Hofbauer et al., 2015; Reipert, 2016). A l'inverse, l'observation d'anticorps de haute affinité et d'isotype IgG4 chez les patients hémophiles A avec inhibiteur suppose une différenciation B folliculaire au sein de CGs nécessitant la présence de LT folliculaires spécifiques du FVIII (Hofbauer et al., 2015; Reipert, 2016; Whelan et al., 2013).

III.3.3.2- La réponse lymphocytaire B mémoire

Les LB mémoires anti-FVIII sont essentiels pour maintenir des réponses anticorps dans le temps et pour conduire à une réponse anamnésique rapide après réexposition au FVIII. Aussi, le groupe de Reipert a développé des méthodes de détection des LB mémoires spécifiques du FVIII chez les patients hémophiles A. Van Helden *et al* ont évalué la fréquence des LB mémoires anti-FVIII dans le sang de patients hémophiles A avec inhibiteurs, en incubant le thymome murin irradié EL4B5, qui exprime le CD40L, avec les LB CD19⁺ des patients durant 9 à 10 jours. L'incubation des LB mémoires dans ces conditions permet leur différenciation en plasmocytes et la présence de LB mémoires spécifiques du FVIII a été évaluée par test ELISpot (van Helden et al., 2007). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que la fréquence de cellules B mémoires circulantes spécifiques du FVIII est comprise entre 0,05% et 0,24% des cellules B totales exprimant une IgG de surface. Par ailleurs, les cellules B mémoires étant principalement localisées dans la rate, la fréquence des cellules B mémoires périphériques semble modulée par une récente stimulation par l'antigène et n'est pas corrélée avec les niveaux d'anticorps inhibiteurs circulants chez le patient (van Helden et al., 2010).

III.3.3.3- Réponse lymphocytaire B chez la souris hémophile A

Pour ce qui concerne la souris hémophile A, Hausl *et al* ont suivi la réponse humorale anti-FVIII après 4 injections hebdomadaires de FVIII, puis 22 semaines après la dernière injection. Ils ont ainsi observé l'apparition d'ASCs dans la rate après 2 injections de FVIII (Hausl et al., 2002). Leur apparition corrèle avec la détection d'anticorps anti-FVIII dans la circulation. Dans

la moelle osseuse, les ASCs anti-FVIII sont détectés après 3 injections de FVIII. Au cours de ces travaux, Hausl *et al.* ont montré que les plasmocytes spécifiques du FVIII persistent au moins 22 semaines dans la moelle osseuse en l'absence d'injection de FVIII.

III.3.3.4- Focus sur la signalisation du BCR et la Bruton's tyrosine kinase

La spécificité antigénique d'un LB est déterminée par son BCR. La signalisation induite via le BCR est essentielle au développement des LB ainsi qu'à leur sélection, leur survie, leur prolifération et leur différenciation en ASCs. L'engagement du BCR entraîne la mise en contact et la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) des molécules transmembranaires Ig α et Ig β par une tyrosine kinase de la famille Src (LYN), présente en forte concentration dans les radeaux lipidiques. Ceci entraîne le recrutement de la protéine kinase SYK, médiateur le plus proximal de la signalisation du BCR (Rowley *et al.*, 1995). La phosphorylation de SYK provoque le recrutement et la phosphorylation de BLNK (B lymphocyte adapter protein), protéine adaptatrice qui agit comme une plateforme pour la formation d'un complexe de signalisation. Ce complexe recrute alors la Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) qui phosphoryle la phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2), ce qui entraîne la production de phosphatidyl-inositol-3 (IP3) et de diacyl-glycérol (DAG), puis l'induction d'un flux calcique, et l'activation des facteurs de transcriptions NF κ B (Nuclear factor-kappa B) et NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (Figure 11). L'expression d'une BTK fonctionnelle est essentielle au développement normal des LB. Ainsi, chez les patients XLA (X-linked agammaglobulinemia), les faibles taux d'Ig circulants et le défaut de maturation des LB, sont liés à une mutation du gène codant pour la BTK (Tsukada *et al.*, 1993, 2012). Par ailleurs, les souris Xid qui présentent une mutation non-sens au sein du gène codant pour la BTK (Rawlings *et al.*, 1993), ont un nombre de LB périphériques réduit de moitié, et des taux d'IgM et d'IgG3 très faibles. Les souris Xid sont incapables de répondre à des antigènes T indépendants de type II (Vinuesa *et al.*, 2001), et à certains antigènes T-dépendants (Kenny *et al.*, 1987). L'implication de BTK dans de nombreuses voies de signalisation et à différents stade de l'ontogénie du LB confère à la BTK un rôle central dans la réponse immunitaire.

Durant ma thèse, je me suis intéressée à la possibilité de prévenir et/ou bloquer la réponse anti-FVIII en inhibant la voie de signalisation du BCR des LB grâce à un inhibiteur de la BTK.

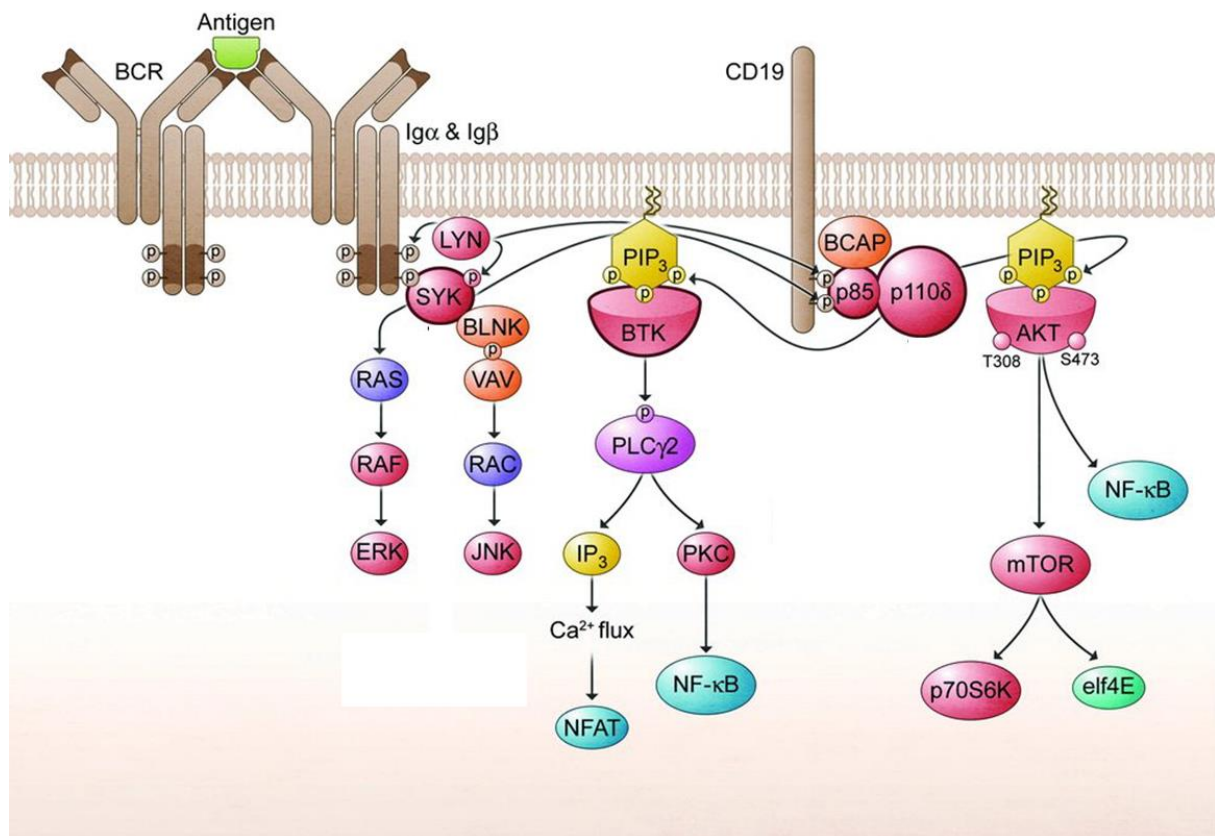


Figure 11 : Représentation schématique de la signalisation du BCR. L'engagement du BCR par l'antigène induit la phosphorylation des motifs ITAM des molécules transmembranaires Igα et Igβ par LYN. SYK est alors recrutée au niveau des ITAM phosphorylés et activée par LYN, par phosphorylation et transautophosphorylation. SYK phosphoryle à son tour des médiateurs clés tels que BLNK, BCAP, et VAV. SYK et LYN phosphorylent également CD19. Ces différentes phosphorylations favorisent la formation d'un complexe de signalisation au niveau de la membrane plasmique qui résulte dans la production de PIP3, qui déclenche l'activation de BTK et AKT. SYK et BTK phosphorylent et activent PLCγ2, qui produit de l'IP3 et du DAG, induisant ainsi un flux calcique et l'activation des enzymes PKC conduisant à l'activation des facteurs de transcriptions NFκB et NFAT. Adaptée de Puri *et al* (Puri et al., 2013).

III.3.4- Les anticorps anti-FVIII

Il est à noter que chez les patients hémophiles A, seuls les anticorps inhibiteurs sont dépistés par le test Bethesda. Les anticorps anti-FVIII « non-inhibiteurs » reconnaissent souvent des domaines du FVIII qui ne sont pas impliqués dans son activité pro-coagulante. Cependant, en se fixant au FVIII, ils peuvent former des complexes immuns et réduire ainsi sa demi-vie dans l'organisme (Batsuli et al., 2016; Kazatchkine et al., 1980; Reipert et al., 2000).

Les anticorps anti-FVIII sont de type IgG, et leur distribution isotypique est comparable à la distribution physiologique des sous-classes d'IgG, avec cependant une prédominance des sous-

classe IgG4 et IgG1 (Gilles et al., 1993). Récemment, Whelan *et al* ont analysé les anticorps anti-FVIII chez différentes cohortes de patients hémophiles A avec ou sans inhibiteurs, ainsi que chez une cohorte de sujets sains (Whelan et al., 2013) par test Elisa. Ils ont ainsi confirmé une prédominance des isotypes IgG1 et IgG4 chez les patients avec inhibiteurs, et n'ont jamais détecté d'anticorps anti-FVIII d'isotype IgG4 chez les patients sans inhibiteur, ou chez les sujets sains. Plus récemment, Hofbauer *et al* ont montré que les anticorps anti-FVIII détectés chez les patients avec inhibiteurs ont une affinité 100 fois plus élevée que les anticorps anti-FVIII détectés chez les patients hémophiles A sans inhibiteur, et chez les sujets sains. Par ailleurs, les deux anticorps monoclonaux humains inhibiteurs disponibles aujourd'hui, BO2C11 et LE2E9, sont d'isotype IgG4 (Jacquemin et al., 2000, 1998).

Grâce à des approches expérimentales telles que l'immunoblotting et l'immunoprécipitation, trois régions portant des épitopes majeurs pour les anticorps ont pu être mises en évidence : l'extrémité N-terminale du domaine A2, le domaine A3, et le domaine C2 du FVIII. Ainsi, Scandella *et al* ont-ils montré dans une étude comportant 34 plasmas de patients hémophiles avec inhibiteurs que dans 80% des cas, la spécificité porte sur ces deux ou trois sites avec une composante anti-A2 dans 70% des cas, et une composante anti-C2 dans 82% des cas (Scandella, 1996). Une étude réalisée chez la souris déficiente en FVIII a montré également une réponse majoritaire IgG1 anti-A2 et IgG2a anti-C2, après plusieurs injections de FVIII par voie intraveineuse (Healey et al., 2007).

Différents mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'inhibition de l'activité fonctionnelle du FVIII par les anticorps inhibiteurs. L'encombrement stérique a été un des premiers mécanismes proposés. En se liant au FVIII, les anticorps empêchent l'interaction du FVIII avec les différentes molécules participant à la cascade de la coagulation telles que le FIXa, le FX, la thrombine ou encore les phospholipides (Ananyeva et al., 2004). D'autres anticorps inhibiteurs sont spécifiques d'épitopes formés par l'interaction du FVIII avec le VWF, empêchant ainsi le FVIII de se désolidariser du VWF pour être activé par la thrombine (Nogami et al., 2002). Par ailleurs, Lacroix-Desmazes *et al* ont démontré au laboratoire que certains de ces anticorps anti-FVIII ont des propriétés enzymatiques et dégradent le FVIII (Lacroix-Desmazes et al., 1999, 2002). Ces anticorps sont retrouvés chez plus de 50% des hémophiles A sévères ayant développé des anticorps inhibiteurs, et leur cinétique de dégradation du FVIII est corrélée à leur activité inhibitrice mesurée dans le plasma par test Bethesda, suggérant ainsi que ces anticorps jouent un rôle dans l'inactivation du FVIII thérapeutique.

III.4- Stratégie thérapeutique face à la réponse immunitaire anti-FVIII

III.4.1- Stratégies thérapeutiques actuellement utilisées en clinique

III.4.1.1. L'induction de tolérance immunitaire

Ces 30 dernières années, la stratégie la plus largement utilisée en cas de survenue d'un inhibiteur a été l'induction de tolérance immunitaire (ITI). Cette stratégie consiste en l'administration de fortes doses de FVIII sur plusieurs mois, voire plusieurs années. Le premier protocole ainsi mis au point par Brackmann, appelé « protocole de Bonn » repose sur l'administration quotidienne de FVIII à des doses supérieures à 200 UI/kg (Brackmann et al., 1996; Oldenburg et al., 1999). Depuis, des protocoles alternatifs utilisant de faibles doses de FVIII, associés à l'utilisation de thérapies non spécifiques du FVIII, telles que les stéroïdes (Aznar et al., 1984), de fortes doses d'immunoglobuline intraveineuse (IVIg) (Nilsson et al., 1988), ou l'immunoabsorption extra-corporelle (Knöbl and Derfler, 1999), ont également été évalués. Des études rétrospectives ont montré que, quel que soit le protocole, les chances de succès d'ITI demeurent similaires entre 60 et 80% (Coppola et al., 2010). Néanmoins, ces différentes études ont permis d'identifier différents facteurs associés à la réussite de l'ITI, tels que le faible titre inhibiteur (<10 UB/ml) avant le début de l'ITI, un pic historique du titre inhibiteur inférieur à 200 UB/ml avant ITI (idéalement <50 UB/ml) et un faible pic du titre inhibiteur au début de l'ITI (<22 UB/ml) (Hay et al., 2012). Il est à noter qu'environ 12,8% et 30% des patients rendus tolérants au FVIII développent à nouveau des anticorps inhibiteurs 1 an et 5 ans après ITI, respectivement (Antun et al., 2015).

Actuellement, bien qu'étant la stratégie la plus largement utilisée et la plus efficace, les mécanismes mis en jeu lors de l'induction de cette tolérance demeurent inconnus. En effet, les investigations chez l'homme restent limitées du fait de la rareté des patients et du faible volume de prélèvements sanguins disponible, et de par la sensibilité limitée des méthodes de détection des cellules immunitaires spécifique du FVIII. Par ailleurs, les injections quotidiennes par voie intraveineuse de FVIII dans le modèle murin sont difficilement réalisables et se heurtent à des questions éthiques.

Néanmoins, il semble que l'éradication des inhibiteurs chez les patients ne s'accompagnent pas pour autant d'une élimination des IgG anti-FVIII (Gilles et al., 1996). Au cours de l'ITI des anticorps anti-idiotypiques apparaissent et neutralisent l'activité inhibitrice des inhibiteurs du FVIII (Saint-Remy et al., 1999; Sakurai et al., 2004). Par ailleurs, le BCR des LB mémoires spécifiques du FVIII étant également un anticorps anti-FVIII, il est probable que les anticorps

anti-idiotypiques en se liant au BCR de ces LB mémoires modulent la réponse lymphocytaire B anti-FVIII (Gilles, 2010).

Un autre mécanisme proposé par les travaux de Hausl *et al* chez la souris hémophile A est l'inhibition de la stimulation des LB mémoires et leur différenciation en plasmocytes (Hausl et al., 2005). Dans leur approche expérimentale, les splénocytes de souris ayant été immunisées avec du FVIII, déplétés en cellules CD138 positives (plasmocytes), représentant ainsi un pool de LB mémoires anti-FVIII, ne se différencient pas en plasmocytes *in vitro*, ni *in vivo* après transfert adoptif chez des souris naïves, lorsque de fortes doses de FVIII sont utilisées pour stimuler la réponse B mémoire. Alors que des concentrations physiologiques (0,01-0,1µg/ml) induisent la différenciation des LB mémoires, les concentrations de FVIII avoisinant celles pouvant être atteintes avec les protocoles d'ITI (1-20µg/ml) inhibent la différenciation des LB mémoires. Cette inhibition est irréversible et ne fait pas intervenir les LT anti-FVIII. Il semblerait que les fortes doses de FVIII induisent l'activation des caspases, entraînant l'apoptose des LB mémoires.

Par ailleurs, il a été suggéré que l'exposition continue à de fortes doses d'antigène peut inhiber de manière réversible la prolifération et la sécrétion de cytokines des cellules T CD4⁺ mémoires spécifique de cet antigène (Han et al., 2010), et induire un arrêt du cycle cellulaire de ces LT CD4⁺ (Ohtsuka et al., 2016). Pautard *et al* ont ainsi étudié les réponses lymphocytaires T CD4⁺ anti-FVIII chez 5 patients hémophiles A ayant suivi avec succès un protocole d'ITI, et 5 donneurs sains. Après différents cycles de stimulation avec des DC autologues en présence de FVIII, ils ont dérivé une lignée lymphocytaire T anti-FVIII à partir des PBMC d'un patient sur 5, et aucune à partir des PBMC de donneurs sains. Ces résultats suggèrent qu'il est possible d'induire une tolérance au FVIII sans déplétion systématique des LT CD4⁺ anti-FVIII (Pautard et al., 2011).

III.4.1.2. La déplétion des lymphocytes B

En cas d'échec de l'ITI, une thérapie par déplétion des LB exprimant le CD20, « thérapie Rituximab », peut être proposée. Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique (homme/souris), spécifique de la molécule CD20 (Tobinai et al., 1998). Le CD20 est une protéine transmembranaire qui régule les étapes initiales d'activation et de différenciation des LB. La molécule CD20 est exprimée dès le stade pré-B à la surface des LB jusqu'au stade B mémoire, mais n'est pas exprimé par les plasmocytes. La liaison du Rituximab au CD20 provoque une déplétion rapide et durable des cellules exprimant le CD20 (Pescovitz, 2006).

Ainsi, la thérapie Rituximab menée chez 50 patients hémophiles, n'ayant pas été tolérés par ITI, a-t-elle abouti à l'éradication des inhibiteurs chez 67% des patients environ 3 mois en moyenne après le début de la thérapie. Néanmoins, 27% de ces patients développent à nouveau un inhibiteur 14 mois après le début de la thérapie (Franchini et al., 2008).

Différents mécanismes d'action ont été proposés pour l'élimination des LB par le Rituximab dont la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), et l'induction directe de la voie apoptotique (Glennie et al., 2007; Taylor and Lindorfer, 2007).

La thérapie Rituximab ne cible pas les plasmocytes, mais élimine les LB immatures, matures et mémoires. Elle prévient ainsi l'initiation d'une nouvelle réponse humorale naïve anti-FVIII, ainsi que l'apparition de réponses immunitaires secondaires au FVIII. Chez la souris hémophile A, il a été montré que l'administration d'un anticorps murin anti-CD20 d'isotype IgG1 induit une tolérance au FVIII et augmente la fréquence de cellules T régulatrices spléniques (Zhang et al., 2011).

III.4.2- Les nouvelles approches/cibles thérapeutiques

Ces dernières années, diverses stratégies visant à prévenir la réponse anti-FVIII ou à l'éradiquer après apparition des inhibiteurs ont été développées. Ces approches expérimentales sont exposées dans ce chapitre en fonction des étapes et/ou acteurs de la réponse immunitaire anti-FVIII ciblés et sont répertoriées dans la figure 12.

III.4.2.1. Inhibition de l'endocytose du FVIII par les CPAs

L'endocytose du FVIII par une CPA étant un prérequis pour l'apparition de la réponse immunitaire anti-FVIII, des équipes dont la nôtre, se sont intéressées à la possibilité de prévenir la réponse anti-FVIII soit en modifiant la structure du FVIII au niveau des résidus potentiellement impliqués dans l'endocytose du FVIII, soit en modifiant sa formulation.

Ainsi, comme cité précédemment dans le paragraphe *III.1.2.3*, le groupe de Voorberg a évalué l'immunogénicité du FVIII une fois muté au niveau des résidus du domaine C1 impliqués dans son endocytose par les MO-DCs. L'administration du mutant C1 (Arg2090Ala, Lys2092Ala et Phe2093Ala) chez la souris hémophile A entraînait une réponse immunitaire significativement plus faible, comparé au FVIII sauvage (Wroblewska et al., 2012). Au laboratoire, nous avons évalué la possibilité de réduire l'immunogénicité du FVIII en modifiant les résidus du domaine C2 (homologue au domaine C1) impliqués dans l'endocytose du FVIII par les MO-DCs. La mutation des résidus Arg2215 et Arg2220 du domaine C2 par des Ala ne nous a pas permis

d'observer une réduction significative de l'immunogénicité du FVIII chez la souris hémophile A (Gangadharan et al., 2016).

Le groupe de Balu-Iyer a tenté de masquer le domaine C2 en complexant le FVIII à des nanoparticules de O-Phospho-L sérine (OPLS). Le domaine C2 comporte en effet un domaine de liaison aux lipides (2303-2332) qui se lie à la phosphatidylsérine des plaquettes activées via le groupement O-Phospho-L sérine. L'administration de FVIII complexé aux OPLS chez la souris déficiente en FVIII entraîne une réponse humorale significativement plus faible par rapport à l'administration de FVIII seul (Gaitonde et al., 2015). Il semble que les complexes FVIII-OPLS régulent négativement l'expression de CD40 à la surface des BM-DCs et polarisent la réponse lymphocytaire T CD4⁺ vers un phénotype Th3 (TGF-β1, IL-10) *in vitro* (Gaitonde et al., 2012). Néanmoins, l'affinité du FVIII pour l'OPLS (5,71 μM) est plus faible que pour le VWF (0,5 nM), il est donc très probable que l'effet observé de l'OPLS chez la souris hémophile A soit inhérent aux premières minutes qui suivent l'injection de FVIII, et soit insuffisant pour prévenir l'apparition des inhibiteurs du FVIII.

III.4.2.2. Inhibition de l'interaction LT CD4⁺/CPAs

Comme nous l'avons vu précédemment au paragraphe III.1.1, l'interaction du CD40 exprimé à la surface des CPAs et du CD40L (ou CD154) exprimé par les LT activés est nécessaire à l'initiation et au maintien de la réponse anti-FVIII. Il a été montré chez le modèle murin hémophile A que l'injection de l'anticorps anti-CD40L, 24h avant l'administration de FVIII, prévient le développement de la réponse humorale anti-FVIII, mais ne permet pas d'induire une tolérance à long terme (Qian et al., 2000a, 2000b; Reipert et al., 2001). Néanmoins, l'injection de l'anticorps anti-CD40 chez des souris ayant déjà développé des anticorps anti-FVIII induit la disparition des CGs spléniques et la diminution des titres d'anticorps anti-FVIII circulants (Qian et al., 2000b). Aussi, 3 patients hémophiles A avec un titre inhibiteur >10 UB/ml ont été traité 3 fois avec un anticorps anti-CD40L à raison de 10mg/kg, avec une injection par mois. Chez ces 3 patients, la thérapie anti-CD40L a été suivi d'une baisse du titre inhibiteur (Ewenstein et al., 2000). Toutefois, cette thérapie a dû être interrompue car elle a été associée à des troubles thrombotiques majeurs, probablement liés au fait que les plaquettes activées exprimaient également le CD40L (Kawai et al., 2000).

Des fragments F(ab)₂ anti-CD3 ont également été utilisés afin de perturber la signalisation induite par le complexe CD3-TCR des LT. Les F(ab)₂ anti-CD3 induisent une signalisation partielle du complexe TCR-CD3, entraînant une anergie des LT CD4⁺. Ainsi, l'administration

d'une faible dose (10µg/jour, durant 5 jours) de F(ab)₂ anti-CD3, avant l'injection répétée de FVIII réduit-elle drastiquement l'apparition des inhibiteurs du FVIII chez la souris hémophile A (Waters et al., 2009). Au cours de ces travaux, Waters *et al* ont observé que l'effet protecteur de la thérapie anti-CD3 était associé à une déplétion partielle des LT CD4⁺, à l'émergence d'une population T CD4⁺/CD25⁺ et à une polarisation des LT effecteurs vers le phénotype Th1. Néanmoins, pour que la thérapie anti-CD3 soit efficace, il faut qu'elle soit réalisée avant l'administration de FVIII. Cela suppose de réaliser les injections d'anti-CD3 dès l'âge de 6 mois, âge auquel une thérapie anti-CD3 n'a jamais été réalisée (Waters and Lillicrap, 2009).

Plus récemment, le groupe de Scott a cherché à identifier les épitopes T du FVIII par analyse *in silico* de prédiction d'affinité de peptides du FVIII aux molécules HLA de classe II. Une telle analyse, réalisée au niveau du domaine C2 du FVIII (domaine contenant à la fois des épitopes T et B), a permis à Moise *et al* de prédire des modifications de résidus au sein de ces épitopes. Ces modifications permettent de diminuer l'affinité de ces peptides pour les molécules HLA de classe II et ainsi réduire l'activation cellulaire T anti-FVIII (Moise et al., 2012). Cette stratégie, dénommée « de-immunisation », bien que séduisante s'avère complexe à mettre en œuvre. En effet, la réponse T anti-FVIII implique divers épitopes T répartis sur les domaines A3, C1 et C2. Aussi, est-il ardu de concevoir de multiples modifications de résidus au sein des épitopes T sans affecter la fonction pro-coagulante du FVIII thérapeutique (Scott, 2014).

III.4.2.3. Inhibition des lymphocytes B

Les LB étant les précurseurs des plasmocytes sécréteurs d'anticorps anti-FVIII, des stratégies visant les LB spécifiques du FVIII ou les plasmocytes eux-mêmes ont été envisagées. Ainsi, Macauley *et al* ont-ils étudié la possibilité d'inhiber l'activation des LB spécifiques du FVIII avec des nanoparticules liposomales contenant le ligand de CD22 (CD22L) et du FVIII (Macauley et al., 2013). En effet, la stimulation du BCR associée à la signalisation CD22 régule négativement les LB (Jellusova and Nitschke, 2011). Dans leur modèle expérimental, une seule administration de liposome complexé au FVIII et au CD22L chez la souris hémophile A permettait de réduire l'apparition des anticorps anti-FVIII. Cette stratégie n'a néanmoins pas été évaluée dans un contexte d'injections répétées de FVIII.

Au laboratoire, Meslier *et al* ont tenté d'éradiquer les inhibiteurs du FVIII en ciblant les plasmocytes grâce à un inhibiteur du protéasome, le bortezomib. Le traitement des souris hémophiles A avec inhibiteurs, sur une période de 10 semaines, en parallèle à l'administration de FVIII, n'a pas permis d'éliminer les inhibiteurs du FVIII. Malgré une diminution

significative du nombre de plasmocytes totaux, les plasmocytes spécifiques du FVIII ne sont pas éliminés par le traitement au bortezomib. Il semble que les plasmocytes spécifiques du FVIII survivent au sein de niches spécifiques dans la moelle osseuse, et leur élimination reposerait plus sur des stratégies de compétition pour ces niches plutôt que sur l'utilisation d'un agent de déplétion tel que le bortezomib (Meslier et al., 2011).

III.4.2.4. Induction de tolérance par « manipulation » du système immunitaire

Des immunosuppresseurs des LT tels que la rapamycine, un inhibiteur de la signalisation du récepteur à l'IL-2, ont également été testés chez le modèle murin hémophile A. L'administration quotidienne de rapamycine, par voie orale, à des souris déficientes en FVIII, parallèlement à des injections répétées de faibles doses de FVIII, réduit le développement des inhibiteurs du FVIII (Moghimi et al., 2011). Dans ce modèle expérimental, le traitement à la rapamycine est associé à l'émergence de LT CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ et à une régulation négative du phénotype Th2. Actuellement, le groupe de Scott cherche à rendre cette immunosuppression spécifique de l'antigène en administrant la rapamycine complexée à des nanoparticules liposomales contenant du FVIII (Zhang et al., 2016).

Le rôle des cellules T régulatrices a ainsi été décrit dans l'induction et le maintien d'une tolérance au FVIII dans plusieurs modèles expérimentaux. Récemment, Liu *et al* ont décrit une nouvelle approche chez la souris hémophile A favorisant la sélection et l'expansion de cellules T régulatrices *in vivo* (Liu et al., 2014), par injection d'un complexe IL-2/anticorps anti-IL-2 (JES6-1). L'administration concomitante de ce complexe au FVIII, durant 4 semaines (à raison de 3 fois/semaine), inhibe le développement des anticorps anti-FVIII inhibiteurs, et semble induire une tolérance durant les semaines qui suivent. L'effet protecteur de ce complexe est associé à une augmentation de 7 fois du nombre de LT régulateurs naturels CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺/Helios⁺ dans le sang périphérique des souris traitées, comparé au groupe contrôle. Ces cellules T régulatrices semblent être à courte durée de vie, hautement suppressives, mais très probablement non spécifiques du FVIII.

Récemment, le groupe de Scott a produit des cellules T régulatrices spécifiques du FVIII par transduction rétrovirale de cellules T régulatrices polyclonales issues de donneurs sains, avec les séquences codantes d'un TCR anti-FVIII (séquencé à partir d'un clone T issu d'un patient hémophile A). Ces LT régulateurs spécifiques du FVIII suppriment les réponses T effectrices et la différenciation des LB mémoires en plasmocytes *in vitro* (Kim et al., 2015).

Au laboratoire, nous avons également évalué la possibilité d'induire une tolérance au FVIII chez la souris hémophile A par transfert materno-fœtal des domaines immuno-dominants du FVIII, A2 et C2, chacun fusionné au fragment Fc de l'IgG1 (Fc γ 1) murin. Le fragment Fc γ 1 permet le passage naturel des domaines A2 et C2 du FVIII à travers la barrière placentaire via le récepteur au Fc néonatal (FcRn). Le passage de l'A2-Fc γ 1 et du C2-Fc γ 1 chez les fœtus induisait une tolérance au FVIII via l'émergence de LT régulateurs centraux et périphériques (Gupta et al., 2015).

Par ailleurs, De Groot *et al* ont récemment observé que le fragment Fc des IgG comporte des épitopes appelés « Régitopes T » qui semblent activer et/ou recruter des LT régulateurs naturels, capables de supprimer une réponse immunitaire en cours (Cousens et al., 2013; De Groot et al., 2008). Le potentiel thérapeutique de ces « Régitopes T » pour induire une tolérance au FVIII chez le patient hémophile A fait actuellement l'objet d'investigations.

Enfin, l'administration de FVIII par la voie mucosale, voie connue pour favoriser l'induction de tolérance, a également été expérimentée. Rawle *et al* ont ainsi administré le domaine C2 du FVIII purifié à des souris hémophiles A, soit par voie nasale, soit par voie orale, avant d'injecter le C2 par voie sous-cutanée en présence d'adjuvant (Rawle et al., 2006). Ces travaux ont servi de preuve de concept de la possibilité d'induire une tolérance au FVIII par administration du FVIII par la voie mucosale. Néanmoins, cette induction de tolérance nécessite des quantités importantes de FVIII, et le maintien de l'intégrité du FVIII jusque dans l'intestin. Le groupe d'Herzog a ainsi produit des fragments de FVIII bioencapsulés. La bioencapsulation permet de protéger les fragments du FVIII de la dégradation par les enzymes gastriques. De plus, ces fragments de FVIII ont été fusionnés à la sous-unité du transporteur transmuqueux de la toxine B du choléra (CTB), permettant ainsi la digestion et l'absorption des fragments FVIII par la flore microbienne de l'intestin. Au cours de ces travaux, les domaines immunogènes du FVIII ont été produits par transgénèse de l'ADN du chloroplaste dans des plantes de tabac. Ces plantes de tabac transplastomiques expriment alors des taux élevés de fragments de FVIII liés à la CTB : le CTB-chaîne lourde (HC), et CTB-C2. Durant quatre semaines, des souris hémophiles A ont été gavées avec les feuilles transplastomiques deux fois par semaine, puis des injections de FVIII par voie intraveineuse ont été réalisées. L'administration *per os* des fragments de FVIII bioencapsulés a permis de réduire de manière drastique le développement d'une réponse humorale au FVIII chez la souris hémophile A (Sherman et al., 2014).

INTRODUCTION

| Cible | Thérapie | Mécanisme d'action |
|-------------------------------|---|--|
| CPAs/ Endocytose | FVIII mutés OPLs-FVIII | Prévient l'endocytose du FVIII par les cellules dendritiques Diminue l'expression de CD40 par les DCs, polarise la réponse T vers Th3 |
| Lymphocytes T CD4+ | | |
| Non spécifique de l'antigène | Anti-CD40L Anti-CD3 | Bloque les interactions CPAs/ LT CD4+, inhibe la formation et le maintien des centres germinatifs Prévient la formation de la synapse d'activation CPA-LT, augmente le ratio LT régulateurs:LT effecteurs |
| Spécifique du FVIII | FVIII mutés (prédiction liaison HLA-DR) | De-immunisations, évite reconnaissance d'une séquence peptidique du FVIII par les LT |
| Lymphocytes B | Liposomes FVIII + CD22L | Suppression de la réponse lymphocytaire B par engagement du CD22 |
| plasmocytes | Bortezomib | Eradication non spécifique des plasmocytes |
| Induction de tolérance | | |
| Non spécifique de l'antigène | Rapamycine IL-2/anti-IL-2 | Inhibiteur de la signalisation IL-2, augmente le ratio LT régulateurs:LT effecteurs Augmente le nombre de LT régulateurs naturels |
| Spécifique de l'antigène | Transduction de Trég polyclonales avec TCR anti-FVIII (2191-2220) Transfert materno/Fœtal (A2-Fc et C2-Fc) Regitopes T CTB-HC/ CTB-C2 voie orale | Suppression des réponses T effectrices et différenciation des LB mémoires en plasmocytes <i>in vitro</i> Induction de LT régulateurs spécifiques de A2 et C2 chez le fœtus Inhibition de la prolifération des LT effecteurs spécifiques du FVIII Induction de tolérance spécifique de la chaîne lourde et du domaine C2 du FVIII par voie mucoale |

Figure 12. Nouvelles approches thérapeutiques et cibles thérapeutiques pour prévenir ou éradiquer la réponse immunitaire anti-FVIII.

III.5- Objectif de ma thèse

Les objectifs de ma thèse ont été de mettre en place et d'évaluer des stratégies thérapeutiques permettant de prévenir l'apparition de la réponse immunitaire anti-FVIII, ou de l'éradiquer. Pour ce faire, j'ai envisagé deux approches différentes.

D'une part, j'ai étudié la possibilité de prévenir la réponse immunitaire anti-FVIII dès l'initiation de cette réponse en modifiant la structure du FVIII afin d'inhiber son endocytose par les CPAs et réduire ainsi son immunogénicité *in vivo*. Je me suis en particulier intéressée aux rôles des deux glycanes se terminant par des mannoses au niveau des Asn239 et Asn2118 des domaines A1 et C1, respectivement. Ces deux motifs sont impliqués dans l'endocytose du FVIII par les MO-DCs via le CD206 (Dasgupta et al., 2007b). J'ai donc fait l'hypothèse que l'élimination de ces motifs pourrait réduire l'immunogénicité du FVIII.

En amont de cette étude, j'ai mis en place des outils et des tests *in vitro* et *in vivo* afin de pouvoir comparer et prédire l'immunogénicité de différents FVIII.

D'autre part, j'ai évalué une approche thérapeutique visant à bloquer la réponse cellulaire B responsable de la production d'inhibiteurs par inhibition de la voie de signalisation du BCR, grâce à un inhibiteur de la Bruton's tyrosine kinase (BTK). En effet, comme cité précédemment au paragraphe III.3.3.4, la BTK est un élément essentiel de la signalisation du BCR impliquée dans la prolifération, le développement, la survie/apoptose et l'activation des LB. De fait, la BTK est une molécule cible dans le traitement des proliférations lymphoïdes B malignes, mais également dans certaines maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé ou la polyarthrite rhumatoïde (Puri et al., 2013) et plusieurs inhibiteurs de la BTK ont été développés. J'ai ainsi évalué au cours de ma thèse le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la voie du BCR chez la souris hémophile A par un inhibiteur de la BTK avant apparition de la réponse immunitaire anti-FVIII par inhibition de la signalisation du BCR des LB naïfs, et après développement des anticorps anti-FVIII par inhibition de la signalisation du BCR des LB mémoires.

RESULTATS

I- Prédiction de l'immunogénicité d'un nouveau FVIII thérapeutique recombinant délété du domaine B : le Refacto AF

L'administration de FVIII thérapeutique exogène chez les patients hémophiles A sévères entraînent le développement d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs chez 30% d'entre eux. Alors que certains facteurs de risques génétiques tels que la mutation du gène *F8* ou les polymorphismes dans la région promotrice de gène de l'immunité ont clairement été associés à l'apparition d'inhibiteurs (Astermark, 2015), la source de FVIII thérapeutique est régulièrement évoquée comme facteur de risque environnemental, selon sa nature (recombinante ou dérivée de plasma), la présence ou non du domaine B, ou encore s'il s'agit d'un produit thérapeutique de seconde ou de troisième génération (Gouw et al., 2013a). Récemment, un FVIII recombinant délété du domaine B, de troisième génération a été mis sur le marché, le Refacto AF. La terminologie « troisième génération » réfère au fait que le Refacto AF est produit sans addition de protéines plasmatiques humaines ou animales ou d'albumine dans le milieu de culture, lors de la purification et dans la formulation finale, et que la purification par chromatographie d'affinité repose sur l'utilisation d'un peptide synthétique.

A ce jour, il existe peu de modèles prédictifs qui permettent d'anticiper l'immunogénicité d'un FVIII thérapeutique chez les patients hémophiles A. Dans cette étude, j'ai mis en place des outils et des tests *in vitro* et *in vivo* afin de comparer l'immunogénicité de ce FVIII thérapeutique à deux autres FVIII recombinants non délétés du domaine B, commercialisés en France, l'Helixate et l'Advate, qui sont respectivement de seconde et de troisième génération.

Au laboratoire, Dasgupta *et al* avaient précédemment identifié un nouveau récepteur d'endocytose pour le FVIII : le « macrophage mannose receptor » ou CD206. La liaison du FVIII au CD206 exprimé par les MO-DCs mène à l'apprêtement antigénique du FVIII (Dasgupta et al., 2007b). Dans un premier temps, j'ai donc mis en évidence la capacité de liaison des trois FVIII thérapeutiques recombinants au CD206 soluble par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J'ai ensuite comparé l'endocytose des trois produits thérapeutiques par les MO-DCs, et montré que le Refacto AF est endocyté par les MO-DCs de manière dose-dépendante, mais significativement moins que l'Advate et l'Helixate à fortes doses. Cependant, les MO-DCs incubées avec des faibles doses de Refacto AF activent un hybridome T murin anti-FVIII restreint au HLA-DRB1*0101 de manière similaire à des MO-DCs incubées avec les mêmes doses d'Helixate ou d'Advate. Enfin, l'intensité de la réponse

humorale anti-FVIII induite chez la souris déficiente en FVIII par le Refacto AF était similaire à celle induite par l'Advate et significativement plus faible que celle induite par l'Helixate.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette étude m'ont-ils permis de prédire une immunogénicité comparable du Refacto AF à un autre FVIII thérapeutique de troisième génération, l'Advate. Dans ces modèles de « prédiction/ comparaison » d'immunogénicité *in vitro* et *in vivo*, la présence du domaine B ne semble pas moduler l'immunogénicité du FVIII. Ces résultats m'ont conforté dans l'utilisation d'une séquence codante le FVIII délété du domaine B pour la suite de mes travaux. Par ailleurs, la réalisation de cette étude m'a permis de développer des outils, tels que l'hybridome T murin anti-FVIII restreint au HLA-DRB1*0101, qui a été très important pour les travaux sur la caractérisation des motifs du FVIII impliqués dans son endocytose et son apprêtement antigénique par les MO-DCs humaines et les CPAs murines, conduits par deux autres doctorants du laboratoire (cf Annexe (Gangadharan et al., 2016)), et moi-même.



ORIGINAL ARTICLE *Clinical haemophilia*

Predictive immunogenicity of Refacto[®] AF

S. DELIGNAT,*†‡ Y. REPESSÉ,§ L. GILARDIN,*†‡ J. D. DIMITROV,*†‡** Y.C. LONE,¶
S. V. KAVERI*†‡** and S. LACROIX-DESMAZES*†‡**

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR S), Paris, France; †Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, UMR, Paris, France; ‡Université Paris Descartes, UMR S Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; §Haemophilia Centre, University Hospital of Caen, Caen, France; ¶INSERM, Hôpital Paul Brousse Bâtiment INSERM Lavoisier, Villejuif, France; and **International Associated Laboratory IMPACT (INSERM, France–Indian Council of Medical Research, India), National Institute of Immunohaematology, Mumbai, India

Summary. The administration of therapeutic factor VIII (FVIII) to treat or prevent haemorrhages in haemophilia A patients results, in up to 30% of the cases, in the development of inhibitory anti-FVIII antibodies. Much debate has taken place on the relevance of the nature of the FVIII product as a risk factor for inhibitor development. Thus, the plasma-derived vs. recombinant origin, the second vs. third generation of the product, or the presence of the B domain have been controversially evoked. A few years ago, Refacto[®] AF, a third-generation recombinant B domain-deleted FVIII was marketed. The aim of this study was to compare the immunogenicity of Refacto[®] AF to that of two recombinant full-length FVIII products: Helixate[®] and Advate[®]. For the three recombinant FVIII products, we compared the binding to the mannose-sensitive endocytic receptor CD206, the dose-dependent endocytosis by immature

monocyte-derived dendritic cells (DCs), the activation by FVIII-loaded DCs of a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted mouse T-cell hybridoma and the induction of inhibitory anti-FVIII IgG in FVIII-deficient mice. At elevated FVIII concentrations, Refacto[®] AF was less endocytosed than full-length recombinant products. At lower concentrations, however, Refacto[®] AF was endocytosed by DCs and activated T cells as well as Helixate[®] and Advate[®]. The levels of inhibitory anti-FVIII IgG induced by Refacto[®] AF in FVIII-deficient mice were lower or equal to that induced by Helixate[®] and Advate[®] respectively. The predicted immunogenicity of Refacto[®] AF is identical to or lower than that of the two recombinant full-length FVIII products available on the French market.

Keywords: factor VIII, haemophilia A, immunogenicity, inhibitors, prediction, refacto[®] AF

Introduction

The administration of exogenous therapeutic factor VIII (FVIII) to haemophilia A patients results, in a substantial number of cases, in the development of inhibitory anti-FVIII antibodies, referred to as FVIII inhibitors. Several categories of risk factors have been associated with the occurrence of FVIII inhibitors, the more clearly characterized risk factor being the nature of the gene abnormality underlying FVIII deficiency [1], together with differences in HLA haplotypes [2–4] and polymorphisms in the promoter regions of immune genes [5–8]. Yet, different levels of immunogenicity of

the different available FVIII concentrates have also been evoked. Thus, differences in incidence of FVIII inhibitors have been controversially attributed to the plasma-derived or recombinant origin of the FVIII products [9–11]. Similarly, a recent clinical study has proposed an increased incidence of inhibitor with recombinant FVIII products of second generation, which are manufactured using a process that includes human serum albumin (HSA) in the cell culture medium, but is formulated without HSA as a stabilizer, as compared to products of the third generation that are produced and stabilized without human and/or animal proteins [11,12]. Furthermore, an implication of the B domain in the immunogenicity of FVIII has been debatably evoked. Thus, a prospective meta-analysis study suggested an enhanced FVIII immunogenicity in previously treated patients upon deletion of the B domain [13,14]. The latter finding was, however, not confirmed by the PedNet and Rodin studies [11]. Likewise, early work in FVIII-deficient mice concluded

Correspondence: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR 872 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France.
Tel.: +33 1 44 27 82 02; fax: +33 1 44 27 81 94;
e-mail: Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Accepted after revision 21 November 2013

to similar immunogenicity of full-length and B domain-deleted FVIII [15], and studies of the endocytosis of FVIII by human immature monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs), the first step in the initiation of the immune response to therapeutic FVIII, indicated equal or lower endocytosis of B domain-deleted FVIII as compared to full-length FVIII [16].

A few years ago, a third-generation B domain-deleted recombinant factor VIII (rFVIII) product, Refacto® AF, was marketed, the manufacture of which uniquely includes purification chromatography by synthetic-affinity ligand rather than murine-based monoclonal antibody, as well as an HSA-free cell culture process [17]. In this study, we have compared the immunogenicity of Refacto® AF to that of Helixate® and Adate®, two full-length second and third-generation FVIII products, respectively, that are available on the French market. In-house *in vitro* assays and experiments in FVIII-deficient mice suggest that the predicted immunogenicity of Refacto® AF is lower than or equal to that of full-length products.

Materials and methods

Preparation of FVIII from therapeutic concentrates

Different commercially available therapeutic FVIII products were analysed: two full-length recombinant FVIII (second-generation product Helixate®, CSL-Behring, Marburg, Germany, and third-generation product Advate®, Baxter Bioscience, Maurepas, France), and one recombinant B domain-deleted FVIII (third-generation product ReFacto® AF, Pfizer, Paris, France). The different FVIII were solubilized in their respective excipients and dialyzed against RPMI or HEPES 10 mM in the presence of 2.5 mM CaCl₂ for 3 h at 4 °C. FVIII:Ag and FVIII:C were quantified using an Asserachrom® kit (Stago, Asnières sur Seine, France) and a chromogenic assay (Dade-Behring, Marburg, Germany), respectively, using human plasma as standard. All concentrations indicated are based on the FVIII:Ag values.

CD206 ELISA

ELISA plates (Nunc) were coated with Kogenate® (10 µg mL⁻¹) for 1 h at 37 °C, and blocked with 10 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 0.05% (v/v) tween 20 (TTBS) and 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Meanwhile, recombinant human CD206 (rhCD206, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) at 30 µg mL⁻¹ (167 nM) was incubated with increasing concentrations of recombinant FVIII [Helixate®, 0–933.9 nM; ReFacto® AF (Pfizer), 0–1006 nM; Advate®, 0–412.5 nM] for 2 h at 37 °C. The rhCD206 was then incubated with insolubilized

recombinant FVIII. Binding of the rhCD206 was revealed with a goat anti-human CD206 IgG (R&D Systems, Lille, France) and a donkey anti-goat IgG coupled to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Bergheimer, Germany). Binding was measured at 492 nm after revealing with *o*-phenylenediamine dihydrochloride.

Preparation of immature monocyte-derived dendritic cells

Monocytes from peripheral blood mononuclear cells were isolated using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) from heparinized buffy coats of healthy donors in RPMI-1640 medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum, L-glutamine and antibiotics. Adherent monocytes were cultured in X-VIVO¹⁵ medium supplemented with 1% human AB serum, in the presence of 500 IU human recombinant IL-4 (R&D Systems, Lille, France) and 1000 IU human recombinant GM-CSF (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) per 10⁶ cells. After 5 days of culture, the non-adherent immature monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs)-enriched fraction was harvested and the immature status was confirmed by the expression of the following surface phenotypic markers: CD40, CD80, CD86, CD83, CD1a and HLA DR, as explained previously [18].

FVIII endocytosis by monocyte-derived dendritic cells

Immature MO-DCs (4 × 10⁵ cells/well) were incubated in 100 µL of X-VIVO¹⁵ with FVIII (0, 50, 100, 200 or 400 IU mL⁻¹), either at 4 °C or 37 °C. After the incubation period, cells were washed thoroughly with ice-cold PBS. Intracellular FVIII was recognized after permeabilization with 0.1% saponin, using the FITC-labelled monoclonal antibody (mAb771P52H7, 10 µg mL⁻¹, a kind gift from LFB, Les Ulis, France), directed to the A2 domain of FVIII. Percentages of cells positive for FVIII were analysed by flow cytometry. Uptake was quantified as the difference in the % cells at 37 °C and 4 °C.

Activation of FVIII-specific T-cell hybridoma

HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II-knockout mice (Sure-L1 mice) [19] were immunized subcutaneously with 140 µg of FVIII (Refacto®) in Complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 15 days later with 100 µg recombinant C2-Fc chimeric protein in Incomplete Freund's adjuvant. Cells of lymph nodes were collected 4 days later, stimulated 72 h with FVIII (Refacto®) and finally fused with BWZ36 (TCR-/-) cells (a kind gift from Prof N Shastri, University of California, Berkeley, CA, USA)

using polyethylene glycol. Of the FVIII-specific DR1-restricted T-cell hybridomas, we selected the sub-clone 1G8-A2 that secreted IL-2, when incubated with FVIII and splenocytes from Sure-L1 mice (data not shown). For T-cell presentation assays, MO-DCs from a healthy donor with the HLA class II locus DRB1*0101/0301 were generated and cultured for 24 h in 96 round bottom plates with the 1G8-A2 FVIII-specific T-cell hybridoma (ratio 1:10) in the presence of the different FVIII preparations. IL-2 secretion by activated T cells was measured in the supernatant by ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Mice

Mice were 8-week-old, exon 16 FVIII-deficient males with an agouti background (a kind gift from Prof H.H. Kazazian, Department of Genetics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA) [20,21]. Mice were treated at day 0, 7, 14, 21 and 28 by retro-orbital intravenous injection with 1 IU of FVIII:Ag. Blood was drawn by retro-orbital bleeding 5 days after the 4th administration of FVIII. Decomplemented plasma was kept at -20°C until use. Groups of 7–8 mice were used in each set of experiments. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (Comité Régional d'Éthique p3/2005/002).

Titration of anti-FVIII IgG

ELISA plates (Nunc) were coated with FVIII ($2\ \mu\text{g mL}^{-1}$, Recombinate[®]), 1 h at 37°C , and blocked with PBS-1% BSA. Serum dilutions were then incubated for 1 h at 37°C . Bound IgG was revealed using a HRP-coupled monoclonal anti-mouse IgG and substrate. The mouse monoclonal anti-FVIII IgG mAb6 (a gift from Prof. J.M. Saint-Remy, KUL, Belgium) was used as standard. Levels of anti-FVIII IgG are presented in $\mu\text{g mL}^{-1}$ equivalent to the mAb6 standard.

Titration of FVIII inhibitors

Decomplemented plasma was incubated with a standard pool of human plasma (Siemens, Saint-Denis, France) for 2 h at 37°C . The residual pro-coagulant FVIII activity was measured using the 'FVIII chromogenic assay kit' following the manufacturer's recommendations (Siemens). Bethesda titres, expressed in BU mL^{-1} , are defined as the reciprocal of the dilution of plasma that produces 50% residual FVIII activity.

Results

Binding of Refacto[®] AF to CD206

CD206 was found to bind to immobilized FVIII in ELISA (data not shown), confirming that FVIII is a

ligand for CD206 [22]. The concentration of CD206 required to reach 50% of binding was equal to 2.1 ± 0.9 , 2.7 ± 1.4 and 7.1 ± 2.6 nM (mean \pm SD) in the case of Helixate[®], Advate[®] and ReFacto[®] AF respectively. The different FVIII products at varying concentrations were then preincubated with a constant amount of rhCD206. The residual binding of rhCD206 to immobilized FVIII was then measured. In all the cases, the presence of soluble FVIII inhibited the binding of CD206 to coated FVIII (Fig. 1). The competition ELISA allowed to estimate the equilibrium constants that characterize the interaction of recombinant FVIII with rhCD206. Values obtained were: 149 ± 33 nM (mean \pm SEM) in the case of Helixate[®], 44 ± 6 nM in the case of Advate[®] and 293 ± 186 nM in the case of Refacto[®] AF. Similar experiments using Refacto[®] yielded a K_D of 218 ± 63 nM (data not shown).

Endocytosis of Refacto[®] AF by human dendritic cells and activation of a FVIII-specific T-cell hybridoma

We then compared the dose-dependent endocytosis of the different FVIII products by human immature MO-DCs. We reported previously that the endocytosis of Kogenate[®]/Helixate[®] and Advate[®] follow similar dose-dependency [16]. In contrast, the endocytosis of Helixate[®] was more pronounced than that of Refacto[®] AF (Fig. 2). A linear regression analysis indicated that the slopes of the curves of FVIII endocytosis by MO-DCs were significantly different between Helixate[®] and Refacto[®] AF: 0.093 ± 0.018 and 0.046 ± 0.012 respectively ($P = 0.031$).

In the next step, the processing of the endocytosed FVIII and presentation of FVIII-derived peptides were compared in a T-cell stimulation assay, wherein the dendritic cells (DCs) loaded with varying concentrations of the different FVIII products were incubated with a mouse CD4^+ T-cell hybridoma specific for human FVIII presented in the HLA-DRB1*0101 context. MO-DCs loaded with the three different FVIII activated the T-cell hybridoma to a similar extent (Fig. 3). This result is consistent with the fact that the amount of endocytosed FVIII by MO-DCs was similar for the three products at the lowest FVIII concentrations (i.e. below $100\ \text{IU mL}^{-1}$, Fig. 2).

Immunogenicity of Refacto[®] AF in FVIII-deficient mice

We compared the immunogenicity of the three FVIII products in FVIII-deficient mice. Mice were treated weekly with 1 IU of FVIII and the immune responses were assessed by measuring both anti-FVIII IgG in ELISA and FVIII inhibitors in a coagulation assay. The experiments were performed independently two

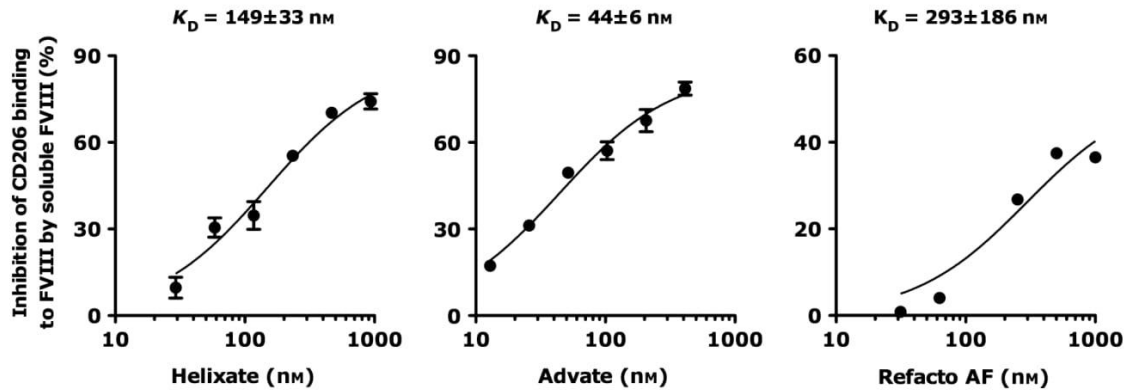


Fig. 1. Interaction of ReFacto[®] AF with CD206. Recombinant human CD206 (30 µg mL⁻¹) was preincubated with increasing concentrations of each FVIII product. Samples were then incubated with immobilized FVIII (Kogenate[®]/Helixate[®]). The bound rhCD206 was revealed and is expressed as the % of the amount bound in the absence of soluble FVIII. Full circles indicate means ± SEM of one to four independent experiments. The full line curve indicates data fitted to the Michaelis-Menten equation ($R^2 \geq 0.96$). K_D values represent the apparent affinity at equilibrium.

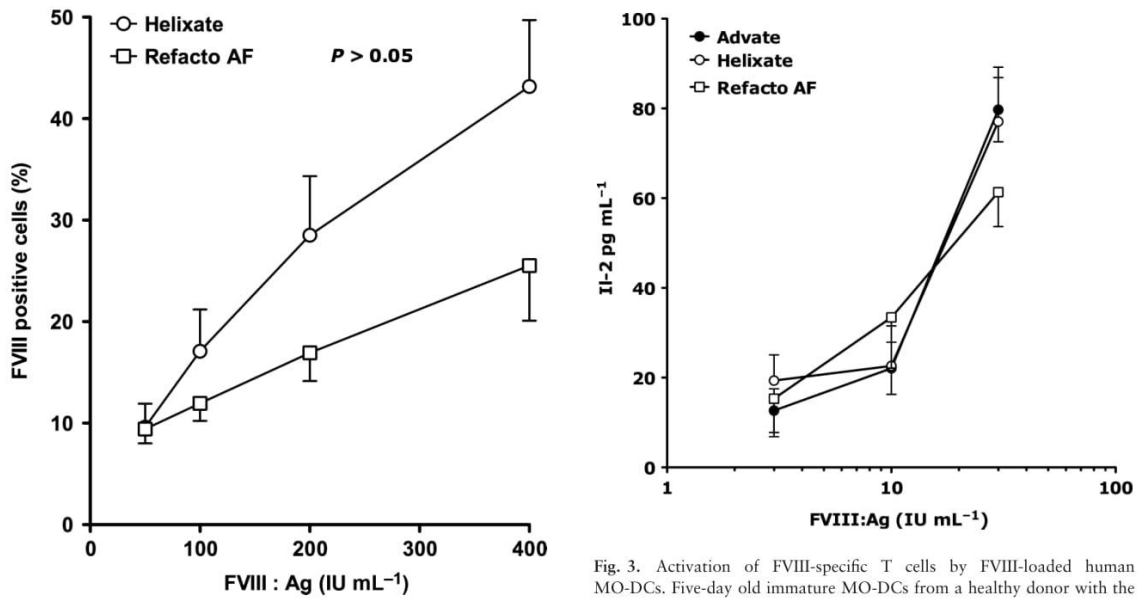


Fig. 2. Dose-dependent endocytosis of ReFacto[®] AF by DCs. Five-day-old monocyte-derived human DCs were incubated in X-VIVO¹⁵ medium containing 0–80 µg mL⁻¹ (0–400 UI mL⁻¹) of either Kogenate[®]/Helixate[®] or ReFacto[®] AF. Results are means of seven independent experiments. Error bars indicate SEM.

Fig. 3. Activation of FVIII-specific T cells by FVIII-loaded human MO-DCs. Five-day old immature MO-DCs from a healthy donor with the HLA class II DRB1*0101/0301 haplotypes were cultured with the 1G8-A2 FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted mouse T-cell hybridoma in the presence of the different FVIII preparations (3, 10 and 30 IU mL⁻¹). Supernatant was collected after 24 h and the IL-2 secreted by activated T cells was measured. Representative of three experiments (means ± SEM).

times yielding similar results. The pooled data are depicted in Fig. 4 (Panels A and B). In both experiments, about four mice (13–14%) developed a negligible IgG immune response to FVIII or did not develop anti-FVIII IgG at all. Conversely, all FVIII products induced inhibitory anti-FVIII IgG in some haemophilic mice. The levels of anti-FVIII IgG and inhibitory titres did not differ between the groups of mice treated with Advate[®] or ReFacto[®] AF. In contrast, Helixate[®] induced more dispersed responses among the treated

mice. As a result, mice treated with Helixate[®] developed significantly higher levels of anti-FVIII IgG and of FVIII inhibitors than mice treated with Advate[®] or ReFacto[®] AF.

Discussion

The immunogenicity of protein therapeutics in patients is generally appreciated empirically during the pre-licensure clinical trials that test the efficacy and safety

490 S. DELIGNAT *et al.*

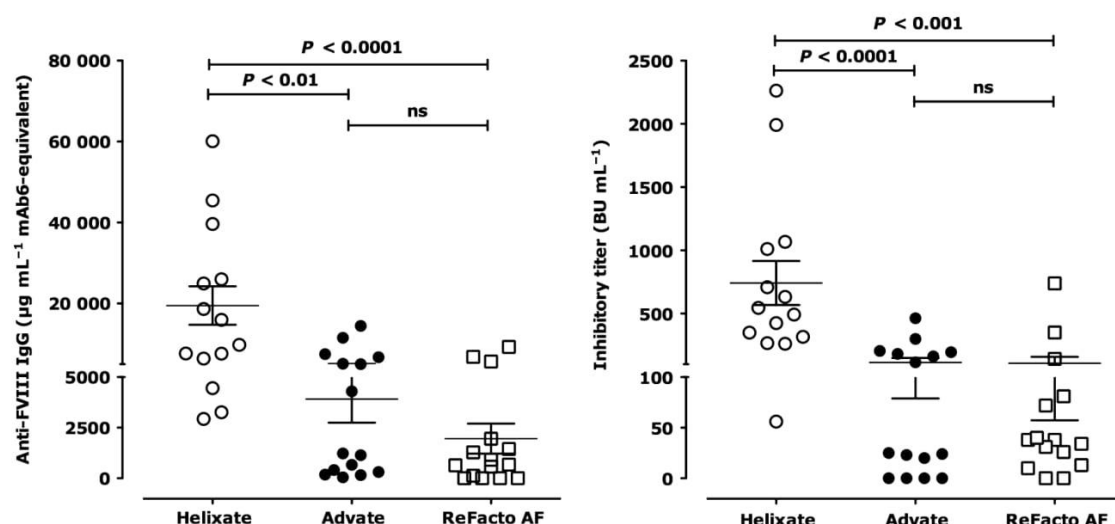


Fig. 4. Immunogenicity of ReFacto[®] AF in FVIII-deficient mice. Helixate[®], Advate[®] and ReFacto[®] AF were administered iv to FVIII-deficient mice once a week for 4 weeks. Mice were bled 5 days after the last FVIII injection and anti-FVIII IgG in serum were quantified by ELISA using a mouse monoclonal anti-FVIII IgG as a standard (amounts expressed in µg mL⁻¹ mAb6-equivalent, Panel A) and by the modified Bethesda assay (Panel B). The figure depicts results (means ± SEM) pooled from two independent experiments (14–15 mice per group). Levels of anti-FVIII immune responses were identical in the case of each product in the two experiments. Differences in levels of anti-FVIII IgG and FVIII inhibitors were statistically assessed using a one-way ANOVA.

of the drug on a relatively small number of patients, and in postmarketing surveillance studies wherein the safety of the pharmaceutical drug is followed in larger patient cohorts after release of the therapeutics. To date, however, very few approaches allow anticipation of the immunogenicity of protein therapeutics prior to administration to the patients. Predictive approaches for drug immunogenicity have been established from the knowledge immunologists have of the initiation of immune responses towards protein antigens. Initiation of an immune response against a protein requires that the protein be endocytosed by antigen presenting cells (AgPC), in a context wherein the AgPC receive maturation signals, and that the protein-derived processed peptides be presented to the T-cell receptor of naïve CD4⁺ T lymphocytes by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. The naïve protein-specific T cells are then activated, proliferate and bring about the necessary triggers for the specific immune response to proceed. In line with this, a strategy to anticipate the immunogenicity of protein therapeutics relies on the *in silico* prediction of T-cell epitopes, using for instance freely available softwares such as IEDB [23,24], that is generally confirmed using *in vitro* binding assays – the prediction of T-cell epitopes, however, merely evaluates the probability for peptides derived from the protein therapeutics to be presented by MHC class II molecules to CD4⁺ T cells. Conversely, an alternative prediction strategy consists in monitoring the capacity of the drug to promote the *in vitro* proliferation of CD4⁺ T lymphocytes originating, in most of the

cases, from healthy individuals [25]. T-cell proliferation assays thus evaluate the clonal frequency of T cells that are specific for the protein therapeutics in a normal immune repertoire with no warranty that the same is true in the patients who receive the drug as therapy. Besides, owing to variability in MHC class II molecules, T cells from different individuals often recognize distinct epitopes, in a given protein antigen. Immunogenicity in appropriate animal models is also an important aspect of preclinical development of a protein therapeutic. In this work, we concentrated on alternative steps of the immune response to therapeutic FVIII [26] to compare the immunogenicity of ReFacto[®] AF with that of Helixate[®] and Advate[®]. We studied the capacity of the different FVIII products to bind to a recently identified endocytic receptor for FVIII, i.e. CD206, and to be endocytosed by AgPC. We also compared the capacity of the endocytosed FVIII products to be presented to FVIII-specific T cells. Lastly, we evaluated the capacity of FVIII to elicit inhibitory anti-FVIII antibodies in FVIII-deficient mice.

Our earlier studies on the dose-dependent endocytosis of FVIII by immature MO-DCs had indicated that Kogenate[®] and Advate[®], that are full-length recombinant products of the second and third generation, respectively, are internalized following identical kinetics [16]. In this work, we observed that the endocytosis of ReFacto[®] AF is lower than that of Helixate[®]. We had demonstrated that the endocytosis of FVIII by immature MO-DCs implicates at least in part the mannose-sensitive receptor CD206, that preferentially

binds to mannose-ending glycans located at Asn239 (A1 domain) and Asn2118 (C1 domain) [22]. Accordingly, the apparent affinity of Refacto[®] AF for CD206 was estimated to be equal to or lower than that of Helixate[®] and Advate[®].

While the levels of endocytosis of Refacto[®] AF were lower than that of Helixate[®] at the highest concentrations used in the assay, they were identical when FVIII concentrations ≤ 100 IU mL⁻¹ were used. To investigate whether dendritic cells loaded with low doses of FVIII are able to activate FVIII-specific CD4⁺ T cells irrespective of the nature of the FVIII product used in the assay, we generated a mouse T-cell hybridoma that is specific for human FVIII and that is restricted to the HLA-DRB1*0101 haplotype. Although the HLA-DRB1*0101 haplotype has not been positively associated with the occurrence of FVIII inhibitors in large cohorts of patients with severe haemophilia A [2–4], HLA-DRB1*0101 has been identified in inhibitor-positive patients with mild haemophilia [27,28]. The HLA-DRB1*0101-restricted T-cell hybridoma, while not accounting for the diversity of the HLA alleles among the haemophilia population, allows to validate the endocytosis, processing and presentation of FVIII-derived peptides to CD4⁺ T cells by human DCs. Of note, because the T-cell hybridoma originates from the memory T cells of a hyper-immunized animal, it is activated *in vitro* by immature DCs and does not require matured DCs and co-stimulatory signals in addition to the TcR-peptide-MHC axis for optimal T-cell activation. Incubation of Refacto[®] AF at 3, 10 or 30 IU mL⁻¹ with immature DCs induced levels of IL-2 secretion by the T-cell hybridoma similar to that induced by DCs incubated with Helixate[®] or Advate[®] at the same concentrations, suggestive of an identical degree of *in vitro* predicted immunogenicity for the three FVIII products. In agreement with these data, the intravenous administration to FVIII-deficient mice of replacement doses of B domain-deleted FVIII induced levels of inhibitory anti-FVIII IgG that were identical to that induced by Advate[®], and although significantly lower, in this series of experiments, than that induced by Helixate[®].

The B domain of FVIII has no documented role in coagulation: it is dispensable for the pro-coagulant activity of FVIII as it is removed from the molecule

upon cleavage and activation by thrombin [29]. The B domain has, however, been proposed to play a role in FVIII secretion as well as in FVIII half-life. Thus, the B domain of FVIII carries up to 17 glycosylation sites that participate in the intracellular trafficking of FVIII from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, either linked to LMAN1 [30] or to calreticulin [31]. Conversely, N-acetyl-D-galactosamin-ending glycans on the B domain of FVIII have been shown to participate in the asialoglycoprotein receptor-mediated catabolism of FVIII *in vivo* when they are not capped by sialic acid residues [32]. To our knowledge, there is no evidence that the B domain of FVIII is involved in the immunogenicity of FVIII. Potential mannose-ending glycans on the B domain were not found to play a role in the endocytosis of FVIII by MO-DCs through mannose-sensitive pathways [22]. Likewise, blocking galactose-binding receptors failed to prevent FVIII uptake by immature MO-DCs. In agreement with this, B domain-deleted FVIII was never confidently reported as more immunogenic than full-length products in patients with haemophilia A [11–14]. Taken together with these pieces of information, our data suggest that Refacto[®] AF, a novel third-generation B domain-deleted recombinant FVIII product, is not predicted to be immunologically different from other full-length products currently on the market.

Acknowledgements

We thank Professor John Robinson (Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) for his advice in generating the FVIII-specific T-cell hybridomas. This study was supported by INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by a grant from Pfizer (Paris, France). LG was the recipient of a 'poste d'accueil INSERM' fellowship.

Author contributions

Planning of the study was by SD and SLD. Experiments were performed by SD, YR, LG, JDD and SVK. Essential material was contributed by YCL. Analysis of the data was done by SD, YR, JDD and SLD. The report was written by SD and SLD.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

- Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J *et al.* from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 488–501.
- Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost* 1997; 77: 238–42.
- Hay CR, Ollier W, Pepper L *et al.* HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost* 1997; 77: 234–7.
- Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S *et al.* Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 2006–15.
- Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED *et al.* The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* 2013; 121: 1446–54.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlson J *et al.* Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; 108: 3739–45.

- 7 Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Bern-
torp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the
IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes
are associated with inhibitor development
in patients with hemophilia A. *Blood* 2006;
107: 3167–72.
- 8 Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Bern-
torp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the
CTLA-4 gene and inhibitor development in
patients with severe hemophilia A. *J
Thromb Haemost* 2007; 5: 263–5.
- 9 Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V
et al. Influence of the type of factor VIII
concentrate on the incidence of factor VIII
inhibitors in previously untreated patients
with severe hemophilia A. *Blood* 2006;
107: 46–51.
- 10 Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G,
Escuriola Ettinghausen C, Tedgard U, van
den Berg HM. Recombinant versus plasma-
derived factor VIII products and the devel-
opment of inhibitors in previously
untreated patients with severe hemophilia
A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007;
109: 4693–7.
- 11 Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R *et al.*
Factor VIII products and inhibitor develop-
ment in severe hemophilia A. *N Engl J
Med* 2013; 368: 231–9.
- 12 Kessler CM, Iorio A. The Rodin (Research
Of Determinants of INhibitor Development
among PUPs with haemophilia) study: the
clinical conundrum from the perspective of
haemophilia treaters. *Haemophilia* 2013;
19: 351–4.
- 13 Aledort LM, Navickis RJ, Wilkes MM.
Can B-domain deletion alter the immuno-
genicity of recombinant factor VIII? A
meta-analysis of prospective clinical studies.
J Thromb Haemost 2011; 9: 2180–92.
- 14 Iorio A, Marcucci M, Makris M. Concen-
trate-related inhibitor risk: is a difference
always real? *J Thromb Haemost* 2011; 9:
2176–9.
- 15 Delignat S, Dasgupta S, Andre S *et al.*
Comparison of the immunogenicity of dif-
ferent therapeutic preparations of human
factor VIII in the murine model of hemo-
philia A. *Haematologica* 2007; 92: 1423–6.
- 16 Repesse Y, Dasgupta S, Navarrete AM,
Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S.
Mannose-sensitive receptors mediate the
uptake of factor VIII therapeutics by
human dendritic cells. *J Allergy Clin Immu-
nol* 2012; 129: 1172–3.
- 17 Kelley B, Jankowski M, Booth J. An
improved manufacturing process for Xyn-
tha/ReFacto AF. *Haemophilia* 2010; 16:
717–25.
- 18 Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonnel C
et al. Inhibition of maturation and function
of dendritic cells by intravenous immuno-
globulin. *Blood* 2003; 101: 758–65.
- 19 Pajot A, Michel ML, Fazilleau N *et al.* A
mouse model of human adaptive immune
functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic
H-2 class I/class II-knockout mice. *Eur J
Immunol* 2004; 34: 3060–9.
- 20 Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High
KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr. Tar-
geted disruption of the mouse factor VIII
gene produces a model of haemophilia A
[letter]. *Nat Genet* 1995; 10: 119–21.
- 21 Qian J, Borokov M, Bi L, Kazazian HH,
Hoyer LW. Inhibitor antibody development
and T cell response to human factor VIII
in murine hemophilia A. *Thromb Haemost*
1999; 81: 240–4.
- 22 Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J *et al.*
A role for exposed mannositations in pre-
sentation of human therapeutic self-pro-
teins to CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl
Acad Sci U S A* 2007; 104: 8965–70.
- 23 Kim Y, Sette A, Peters B. Applications for
T-cell epitope queries and tools in the
Immune Epitope Database and Analysis
Resource. *J Immunol Methods* 2010; 374:
62–9.
- 24 Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA *et al.*
The immune epitope database 2.0. *Nucleic
Acids Res* 2010; 38: D854–62.
- 25 Delluc S, Ravot G, Maillere B. Quantifica-
tion of the preexisting CD4 T-cell reper-
toire specific for human erythropoietin
reveals its immunogenicity potential. *Blood*
2010; 116: 4542–5.
- 26 Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre
S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynam-
ics of factor VIII interactions determine its
immunologic fate in hemophilia A. *Blood*
2008; 112: 240–9.
- 27 James EA, Kwok WW, Ettinger RA, Thomp-
son AR, Pratt KP. T-cell responses over time
in a mild hemophilia A inhibitor subject: epi-
tope identification and transient immunoge-
nicity of the corresponding self-peptide. *J
Thromb Haemost* 2007; 5: 2399–407.
- 28 Ettinger RA, James EA, Kwok WW,
Thompson AR, Pratt KP. HLA-DR-
restricted T-cell responses to factor VIII
epitopes in a mild haemophilia A family
with missense substitution A2201P. *Haem-
ophilia* 2010; 16: 44–55.
- 29 Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K.
The life cycle of coagulation factor VIII in
view of its structure and function. *Blood*
1998; 92: 3983–96.
- 30 Cunningham MA, Pipe SW, Zhang B, Hau-
ri HP, Ginsburg D, Kaufman RJ. LMAN1
is a molecular chaperone for the secretion
of coagulation factor VIII. *J Thromb Haem-
ost* 2003; 1: 2360–7.
- 31 Pipe S, Morris J, Shah J, Kaufman R. Dif-
ferential interaction of coagulation factor
VIII and factor V with protein chaperones
calnexin and calreticulin. *J Biol Chem*
1998; 273: 8537–44.
- 32 Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM,
Vlijmen BJ, Mertens K. The B domain of
coagulation factor VIII interacts with the
asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haem-
ost* 2005; 3: 1257–65.

II- L'élimination de l'oligomannose au niveau de l'Asn2118 abroge la présentation du FVIII par les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes

L'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII chez l'hémophile A implique que le FVIII thérapeutique est endocyté et apprêté par les CPAs (Lacroix-Desmazes et al., 2008). Des travaux précédents du laboratoire avaient montré que les chaînes oligosaccharidiques se terminant par des mannoses au niveau des Asn239 et Asn2118 du FVIII permettaient la liaison du FVIII au CD206 (Dasgupta et al., 2007b). La liaison du FVIII au CD206 exprimés par les DCs humaines menait à l'endocytose du FVIII et à la présentation de peptides dérivés du FVIII à des LT CD4⁺ spécifiques du FVIII. Dans cette étude, j'ai évalué la possibilité de prévenir l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII *in vitro* et *in vivo*, en éliminant les N-glycosylations en 239 et 2118 par mutagenèse dirigée, sans altérer les fonctions pro-coagulantes du FVIII.

Des expériences de transfert de gènes codants pour le FVIII sauvage ou muté en N239 et/ou N2118 chez la souris déficiente en FVIII, ont montré que les FVIII mutés présentent une activité spécifique similaire à celle du FVIII sauvage. Le double mutant N239/2118Q était capable de corriger le temps de saignement de manière similaire au FVIII sauvage dans des expériences de section de la queue. J'ai donc produit les FVIII recombinants correspondants. J'ai ainsi observé *in vitro* que l'élimination de la glycosylation du FVIII en 2118 au niveau de son domaine C1 est suffisante pour abroger la présentation du FVIII par les MO-DCs aux LT CD4⁺ spécifiques du FVIII. Cependant, l'élimination de cette glycosylation n'a pas entraîné de diminution de la réponse humorale anti-FVIII chez la souris déficiente en FVIII. Le FVIII circulant sous forme de complexe avec sa protéine chaperonne le VWF, j'ai cherché à savoir si en absence de VWF, l'élimination de la glycosylation en 2118 pouvait altérer l'immunogénicité du FVIII. Là encore, le FVIII muté en 2118 induisait une réponse anti-FVIII similaire à celle induite par le FVIII sauvage chez la souris déficiente en FVIII et en VWF. En accord avec ces résultats, j'ai observé que l'élimination de la glycosylation en 2118 n'altérait pas la capacité des CPAs spléniques murines à présenter le FVIII aux LT CD4⁺ spécifiques du FVIII.

Mes résultats confirment le rôle des mannoses exposés au niveau du domaine C1 du FVIII en 2118 dans la capture et l'apprêtement antigénique du FVIII par les MO-DCs humaines. Par ailleurs, mes observations confirment que les MO-DCs humaines et les CPAs murines

n'utilisent pas les mêmes récepteurs/voies d'endocytose pour internaliser et présenter le FVIII aux LT CD4⁺. Des travaux antérieurs ont montré que la mutation de résidus chargés au niveau du domaine C1 (Wroblewska et al., 2013) ou du domaine C2 (Gangadharan et al., 2016) du FVIII réduit significativement l'internalisation du FVIII par les MO-DCs humaines et par les BM-DCs murines. L'ensemble de ces observations suggèrent que les mécanismes d'endocytose du FVIII par les MO-DCs et les CPAs murines sont différents, mais impliquent préférentiellement les domaines C1 et C2 du FVIII. Par ailleurs, les différences de distribution des récepteurs lectines de type C tels que le CD206 entre l'homme et la souris (Linehan et al., 1999; Martinez-Pomares et al., 2005; Pack et al., 2008) nous encourage à poursuivre de futures investigations concernant le rôle de la glycosylation en 2118 dans un modèle d'hémophilie A plus proche de l'homme.

Title: Removal of mannose-ending glycan at Asn²¹¹⁸ abrogates FVIII presentation by human monocyte-derived dendritic cells

Running title: Oligomannose carbohydrates mediate FVIII uptake by antigen presenting cells

Sandrine Delignat, Julie Rayès, Suryasarathi Dasgupta, Bagirath Gangadharan, Mathieu Ing, Cécile V Denis, Olivier D Christophe, Srinivas V Kaveri, Sébastien Lacroix-Desmazes.

Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S 1138, Paris, F-75006 France; Université Paris Descartes, UMR S 1138, Paris, F-75006 France; INSERM, U1138, Paris, F-75006 France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U770, Le Kremlin-Bicêtre, France; UMR S 770, Univ. Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Corresponding author: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France - Tel: 01 44 27 82 02 - Fax: 01 44 27 81 93. Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count for text: 4154

Word count for abstract: 255

Number of figures: 5

Number of tables: 0

Number of references: 51

Abstract

The development of an allo-immune response against therapeutic FVIII is the major complication in hemophilia A patients. We have previously shown that oligomannose carbohydrates on FVIII allow the binding of FVIII to the macrophage mannose receptor expressed on human dendritic cells (DCs), thereby leading to FVIII endocytosis, processing and presentation to CD4⁺ T lymphocytes. Here, we investigated whether altering the recognition of FVIII mediated by mannose-sensitive receptors on antigen-presenting cells (AgPCs) may be a strategy to reduce FVIII immunogenicity and prevent inhibitors formation. Gene transfer experiments in FVIII-deficient mice indicated that N239Q and/or N2118Q FVIII mutants have unaltered specific activities as compared to native B domain-deleted (BDD) FVIII; N239Q/N2118Q mutant corrected blood loss in tail clip experiments. Production of the corresponding recombinant BDD FVIII mutants or light chains indicated that removal of the N-linked glycosylation site at Asn2118 was sufficient to abrogate *in vitro* the activation of FVIII-specific CD4⁺ T cells by human monocyte-derived DCs (MO-DCs). In contrast, removal of mannose-ending glycans at Asn2118 did not alter FVIII endocytosis and presentation to CD4⁺ T cells by mouse AgPCs. In agreement with this, the N2118Q mutation did not reduced FVIII immunogenicity *in vivo* both in FVIII-deficient and in double VWF/FVIII-deficient mice. Our results highlight the differences in the endocytic pathways between human and mouse DCs, and may relate to dissimilarities in tissue distribution of CD206 in rodents and humans. Further investigations in preclinical models of hemophilia A closer to humans are needed to decipher the exact role of mannose-ending glycans in the immunogenicity of therapeutic FVIII.

Introduction

Ten to thirty percent of patients with hemophilia A develop inhibitory anti-factor VIII (FVIII) antibodies following replacement therapy with therapeutic FVIII [1]. The reasons for the elevated immunogenicity of therapeutic FVIII, as compared to other therapeutic glycoproteins, have been intensively investigated. These include congenital [2,3] or bleeding-induced [4] chronic inflammation favoring the recruitment and activation of antigen-presenting cells (AgPCs) and of immune effectors, and disequilibrium in regulatory elements of the humoral or cellular arms of the adaptive immune system [5–7]. A mandatory step for developing an anti-FVIII immune response is the endocytosis of the exogenously administered FVIII by AgPCs, such as dendritic cells (DCs) and macrophages, and the presentation of FVIII-derived peptides on major histocompatibility complex class II (MHC II) molecules by AgPCs to CD4+ T lymphocytes [7,8].

We have previously demonstrated the importance of mannose-sensitive receptors for the endocytosis of FVIII by human DCs, leading to the presentation of FVIII-derived peptides to T cells [9]. Indeed, the saturation of mannose-sensitive receptors using an excess of mannan resulted in a reduced internalization of different FVIII products by DCs [9,10]. Both recombinant and plasma-derived FVIII have been reported to contain mannose-ending glycans at positions N239 of the A1 domain and N2118 of the C1 domain [11,12]. We had observed that pre-incubation of DCs with an antibody towards the macrophage mannose receptor (CD206), or enzymatic removal of mannosylated glycans on FVIII, both reduced FVIII presentation to a human CD4+ T cell line [9]. Conversely, a recombinant CD206 construct bound both the light and heavy chains of B domain-deleted FVIII [9], and all the recombinant FVIII products commercially available at the time of the studies interacted with CD206 [13]. While mannose-ending glycans on foreign glycoproteins generally mediate pathogens recognition and elimination by the immune system, oligomannose carbohydrates on self-

antigens and their binding to CD206 have been implicated in their catabolism [14]. Here, we studied the involvement of two mannose-ending glycans present at positions N239 and N2118 of FVIII in its immunogenicity *in vitro* and *in vivo*.

Material and Methods

Animals.

FVIII exon 16 knock-out C57Bl/6 mice (a gift from Prof H.H. Kazazian, Department of Genetics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia) [15] and double VWF/FVIII deficient mice were used. SureL1 mice are HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic, H-2 class I-/class II-knockout mice and were a gift from Dr Yu-Chun Lone (INSERM, hôpital Paul Brousse, Villejuif, France) [16]. All mice used in the experiments were 7 to 12 weeks old. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (authorization #23BA53).

FVIII gene transfer to FVIII deficient mice and correction of bleeding time.

To induce hepatic expression of FVIII, FVIII-deficient mice were injected in the tail vein with the plasmid pLIVE (100 µg) encoding wild-type FVIII ($\Delta 2$ FVIII) [17], or the N239Q ($\Delta 2$ FVIII^{239Q}), N2118Q ($\Delta 2$ FVIII^{2118Q}) or N239Q/N2118Q ($\Delta 2$ FVIII^{239Q/2118Q}) mutants (Figure 1A and Supplementary methods), in a large volume (10% of body weight) of 0.9% NaCl within 5 seconds [18]. No mortality was reported during the hydrodynamic injection of pLIVE. Four days later, blood was collected: FVIII:C and FVIII:Ag were quantified in citrated plasma using a two-stage chromogenic assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) and an Asserachrom[®] kit (Stago, Nières-sur-Seine, France). The next day, mice were anesthetized and 3 mm of the distal tail were cut with a scalpel. Blood was collected during 30 min in 50 ml of saline buffer at 37°C. Erythrocytes were then pelleted at 1500 g and lysed in H₂O. The amount of released hemoglobin, proportional to the volume of blood loss, was determined by measuring

the optical density at 416 nm, and using a standard curve prepared upon lysis of 20 to 100 μ l of mouse blood.

Production of B domain-deleted FVIII and FVIII light chain.

The FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q}, FVIII^{2118A} and FVIII^{239Q/2118Q} mutants were generated after cloning human B domain-deleted FVIII (FVIII^{HSQ}) in the the ReNeo plasmid and stable transfection of BHK-M cells (Supplementary Methods). A N2118A mutated light chain of human FVIII was generated after cloning the cDNA (pSP64-VIII, ATCC, Manassas, VA, USA) in the pNUT vector and stable transfection of CHO K1 cells (Supplementary Methods).

Binding of FVIII to VWF and phosphatidylserine.

VWF (2 μ g/ml Wilfactin®, LFB, Les Ulis, France), or 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) were coated on ELISA plates (NUNC, Rochester, USA). After blocking with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS and 0.05% Tween 20, purified FVIII were incubated at different dilutions on the coated plates. Bound FVIII was revealed using a biotin-coupled monoclonal anti-human FVIII antibody (clone GMA-8015, Green Mountain Antibodies, Burlington, VT, USA), followed by streptavidin-HRP (R&D systems, Minneapolis, USA). Results are shown as optical densities measured at 492 nm in arbitrary units.

Half-life of FVIII in FVIII-deficient mice.

Six days after the hydrodynamic injection to FVIII-deficient mice of pLIVE- Δ 2FVIII, mice were injected intravenously with 500 μ g of biotin-N-hydrosuccinimide ester (Pierce, Rockford, USA) dissolved in saline buffer. Blood was collected on citrated tubes after 15 min (time considered for complete biotinylation of endogenous proteins), which was considered as t=0 min. Blood samples were then collected after 5, 30, 90, 180 and 360 min. Residual biotinylated

FVIII was measured by ELISA, using a polyclonal anti-human FVIII antibody (Kordia, Leiden, the Netherlands) and streptavidin-HRP (R&D Systems, Minneapolis, USA).

In other experiments, FVIII-deficient mice were administered intravenously with FVIII^{HSQ} or FVIII^{2118Q} (100 μ l, 10 nM). Plasma was recovered with heparinized capillaries 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 and 480 min after injection and kept at -80°C until use. FVIII:Ag was measured in plasma using a sandwich ELISA with an anti-FVIII C2 domain monoclonal antibody (ESH-8, Hyphen Biomed), and an anti-FVIII A2 domain monoclonal antibody (GMA-8015) as coating and detection antibodies respectively, and human plasma as a standard (Siemens Healthcare Diagnostics).

Activation of a FVIII-specific T cell hybridoma.

MO-DCs from a healthy donor with the HLA class II alleles DRB1*0101/0301 were generated as previously described [19]. Briefly, purified monocytes by CD14 positive selection (Miltenyi Biotec, Paris, France) were cultured in RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Belgium), 10% fetal calf serum (FCS, Life Technologies, Saint-Aubin, France), supplemented with GM-CSF (1000 IU/10⁶ cells) and IL-4 (500 IU/10⁶ cells) (Miltenyi Biotec). After 5 days, immature MO-DCs were incubated for 24 hr with the FVIII-specific T cell hybridoma 1G8-A2 (ratio 1:10, 10.000 MO-DCs for 100.000 T cells) with recombinant FVIII in X-VIVO¹⁵ medium (Lonza). When mouse AgPCs were used, mitomycin C-treated splenocytes from SureL1 mice were cultured for 24 hr with 1G8-A2 (ratio 2:1, 200.000 splenocytes for 100.000 T cells). Levels of interleukine-2 (IL-2) secreted in the supernatant by T cells were assessed using BD OptEIA™ mouse IL-2 ELISA set (BD Biosciences).

Activation of a FVIII specific human T-cell line.

The FVIII-specific human T cell line D9E9 (gift from Dr M. Jacquemin), was incubated with five day-old MO-DCs from a DRB1*1501 donor, or with the FVIII-specific human B cell line (BO2C11) with the DRB1*1501/DRB5*0101 alleles [20]. MO-DCs and B cells (10.000 cells) were cultured with 5.000 T cells in DMEM-F12 (Lonza) containing 10% FCS and 20 U/ml recombinant human IL-2 (Sigma Aldrich), and with various FVIII preparations or recombinant FVIII fragments for 20 hr at 37°C. When indicated, DCs and B cells were pre-incubated with mannan (1 mg/ml, Sigma Aldrich) for 30 min at 37°C prior to the addition of FVIII and D9E9 T cell line. Production of interferon-gamma was measured in the supernatants using the human IFN-gamma Duo Set (R&D Systems).

Administration of FVIII to mice.

FVIII-deficient mice or VWF/FVIII-deficient mice were injected intravenously with 0.5 µg recombinant FVIII^{HSQ} or mutated FVIII, once a week for 4 weeks. Blood was collected five days after the last FVIII injection, and plasma was kept at -20°C until analysis. Endotoxin levels in the different recombinant FVIII was below the accepted threshold (i.e., <0.01 ng endotoxin/20 g mouse weight) as assessed using the ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript, Piscataway, NJ, USA).

Titration of anti-FVIII IgG and FVIII inhibitors.

ELISA plates were coated with FVIII (1 µg/ml, Recombinate®, Baxter, Maurepas, France) overnight at 4°C. After blocking with PBS-1% BSA, plasma was incubated for 1 hr at 37°C. Bound IgG were revealed with a HRP-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Anaheim, CA, USA) and the OPD substrate. The mouse monoclonal anti-FVIII IgG mAb6 (gift from Dr J.M. Saint-Remy) was used as a standard. FVIII inhibitors were

measured by incubating heat-inactivated mouse plasma with human standard plasma for 2 hr at 37°C. FVIII residual pro-coagulant activity was measured by chromogenic assay. Results are expressed in Bethesda titers (BU/ml) that correspond to the reciprocal dilution of the mouse plasma that yields 50% residual FVIII activity.

Results

Elimination of the N239 and N2118 glycosylation sites is compatible with production and pro-coagulant function of FVIII

Mice treated by hydrodynamic injection with pLIVE encoding wild-type FVIII-ΔII ($\Delta 2\text{FVIII}^{\text{WT}}$) produced 370 ± 37 IU/ml FVIII:C or 373 ± 35 IU/ml FVIII:Ag (mean \pm SEM, Figure 1B). Mice injected with $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}}$, $\Delta 2\text{FVIII}^{2118\text{Q}}$ or $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ -encoding pLIVE produced 52 ± 5 , 193 ± 82 and 97 ± 10 IU/ml FVIII:C, or 25 ± 2 , 200 ± 72 and 69 ± 8 IU/ml FVIII:Ag, respectively, indicating a 2 to 14-fold reduction in circulation levels of FVIII in mice upon removal of either one or both glycosylation sites. The FVIII:C/FVIII:Ag ratios for the three mutants were similar to that of the wild-type molecule (Figure 1B, inset).

Half-lives of endogenously produced FVIII were evaluated following injection of activated NHS-biotin. FVIII clearance in FVIII-deficient mice followed a double-exponential distribution [21–23]. Half-lives of $\Delta 2\text{FVIII}^{\text{WT}}$ in the fast and slow phases of elimination were 30.7 and 261.4 min, respectively, with 38% of the FVIII being removed in the fast phase ($R^2=0.91$, Figure 1C). Half-lives of $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ in the fast and slow phases of elimination were 48.6 and 280.6 min respectively, with 51% of the FVIII being removed in the fast phase ($R^2=0.96$). The half-lives of $\Delta 2\text{FVIII}^{\text{WT}}$ and $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ were not statistically different.

We further analyzed the capacity of endogenously produced $\Delta 2\text{FVIII}^{\text{WT}}$ and $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ to correct blood loss in tail clip experiments. We first confirmed that wild-type non-hemophilic mice lost significantly less blood than FVIII-deficient mice ($P=0.001$, Figure 1D). The

hydrodynamic injection of $\Delta 2FVIII^{WT}$ or $\Delta 2FVIII^{239Q/2118Q}$ -encoding plasmids into FVIII-deficient mice was able to correct blood loss as compared to untreated mice ($P=0.004$ and $P=0.013$, respectively). Interestingly, blood loss in FVIII-deficient mice treated with the $\Delta 2FVIII^{239Q/2118Q}$ construct was not significantly different from that of wild-type non-hemophilic mice. The fact that FVIII-deficient mice treated with the $\Delta 2FVIII^{WT}$ -encoding plasmid bled significantly less than mice treated with the $\Delta 2FVIII^{239Q/2118Q}$ -encoding plasmid ($P=0.010$) is probably due to the fact that circulating levels of FVIII were significantly greater in the former group of mice (373 ± 35 IU/ml, mean \pm SEM, Figure 1A) than in $\Delta 2FVIII^{239Q/2118Q}$ -treated mice (69 ± 8 IU/ml).

Production and characterization of recombinant FVIII mutants lacking the N239 and N2118 glycosylation sites.

We then assessed the production of wild-type BDD FVIII (FVIII^{HSQ}) and of the FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q} and FVIII^{239Q/2118Q} mutants by stably transfected BHK-M cell clones. Rates of production of FVIII^{2118Q} (Figure 2A, FVIII:C = 0.96 ± 0.23 IU/ 10^6 cells/24 hr; FVIII:Ag = 120 ± 31 ng/ 10^6 cells/24 hr; mean \pm SEM) were not statistically different from that of FVIII^{HSQ} (FVIII:C = 1.58 ± 0.49 IU/ 10^6 cells/24 hr; FVIII:Ag = 204 ± 23 ng/ 10^6 cells/24 hr). In contrast, FVIII^{239Q} (0.17 ± 0.03 IU/ 10^6 cells/24 hr; 29 ± 11 ng/ 10^6 cells/24 hr) and FVIII^{239Q/2118Q} (0.20 ± 0.03 IU/ 10^6 cells/24 hr; 64 ± 20 ng/ 10^6 cells/24 hr) were produced at a rate 8 to 9-fold lower than FVIII^{HSQ} (Figure 2B). The absence of the N-linked glycans at positions 239 and 2118 was validated by comparing the migration profiles of thrombin-digested purified FVIII^{HSQ} and mutants on SDS-PAGE. The lower molecular weight of the A1 domain of the thrombin-digested FVIII^{239Q} mutant and of the light chain of the thrombin-digested FVIII^{2118Q} mutant, as compared to the A1 domain and light chain of the thrombin-digested FVIII^{HSQ} confirmed the removal of the N-linked glycosylation sites (Figure 2C). The purified FVIII mutants exhibited

specific activities between 4600-6200 IU/mg (Figure 2D) similar to that of FVIII^{HSQ}. Furthermore, FVIII^{HSQ} and the FVIII mutants bound similarly to immobilized VWF and phosphatidylserine (Figure 2E and 2F).

Removal of the N2118 glycosylation abrogates FVIII presentation by human dendritic cells

To investigate the potential of the purified FVIII^{HSQ} and mutants to be presented to T cells by human AgPCs, we generated a mouse T cell hybridoma specific for human FVIII and restricted to the HLA-DRB1*01:01 allele, referred to as 1G8-A2. The activation of 1G8-A2 by FVIII-loaded human DCs derived from monocytes from a HLA-DRB1*01:01 donor was evaluated by measuring IL-2 secretion (Supplemental Figure 1). 1G8-A2 is specific for the ²⁰¹³LFLVYSNKC²⁰²² core peptide, located in the C1 domain of FVIII light chain (Figure 3A and supplementary Figure 1). As previously reported [9], T cell activation was drastically reduced when MO-DCs were pre-incubated with mannan (1 mg/ml) or EDTA (5 mM) prior to incubation with FVIII^{HSQ} (Figure 3B). Likewise, removal of the N2118 glycosylation site resulted in a drastic reduction of 1G8-A2 activation by MO-DCs (39.5±13.4 pg/ml, mean±SD) as compared to the use of FVIII^{HSQ} (572.9±151.9 pg/ml, P<0.001 at 10 nM FVIII, Figure 3C). A different FVIII^{2118A} mutant also failed to activate 1G8-A2 (35.3±2.1 pg/ml, P<0.001 as compared to FVIII^{HSQ}). In contrast, co-incubation of cells with the FVIII^{239Q} mutant yielded a significant though less marked reduction in IL-2 secretion (377.7±96.8 pg/ml, P<0.001 as compared to FVIII^{HSQ}). Of note, removal of both N239 and N2118 glycosylation sites did not have an additional effect on T cell activation over the mere N2118Q/A replacement (Supplemental Figure 2A).

In a different experimental set-up, we compared the presentation of a wild-type or N2118A mutated FVIII light chain to the HLA-DRB1*15:01-restricted human D9E9 T cell line which

is specific for the $^{2144}\text{IIARYIRLHPHTHSIRST}^{2164}$ C1 domain peptide [24] (Figure 3A). As a source of AgPCs, we used HLA-matched MO-DCs or the human BO2C11 B cell line [20]. The activation of D9E9 by MO-DCs incubated with the wild-type FVIII light chain was drastically reduced in the presence of mannan (Figure 3D), thus reproducing that data obtained with complete BDD FVIII (Figure 3B). In contrast, BO2C11 activated D9E9 when incubated in the presence of either wild-type or mutated light chains (Figures 3E and 3F), indicating that the absence of the mannose-ending glycan on the C1 domain does not alter the conformation of BO2C11 target epitope on FVIII C2 domain [20]. It also confirmed that FVIII light chain endocytosis by BO2C11, which is mediated by the B cell receptor, is insensitive to the presence of mannan (Figure 3E). Importantly, while the mutated FVIII light chain was presented to D9E9 by BO2C11, it was not the case when MO-DCs were used as AgPCs (Figure 3F), thus confirming our earlier results obtained in a different HLA context and using T cells with a different epitope specificity.

The absence of N2118 mannose-ending glycan does not reduce FVIII immunogenicity in mice

We then investigated the consequence of removing the N2118 glycosylation site on FVIII immunogenicity in FVIII-deficient mice. First, we confirmed that kinetics of FVIII elimination in both the slow and fast phases did not differ statistically between FVIII^{HSQ} and FVIII^{2118Q} (Figure 4A), suggesting that the N2118 glycan does not modulate BDD FVIII catabolism in mice, and confirming the observations obtained with the endogenous expression of $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ (Figure 1C).

FVIII-deficient mice were injected with 0.5 μg FVIII^{2118Q} or FVIII^{HSQ} once a week for four weeks, and anti-FVIII IgG and inhibitory titers were measured in serum. The anti-FVIII IgG titers were similar whether mice were treated with FVIII^{2118Q} or FVIII^{HSQ} (17362 \pm 9632 AU

versus 18758 ± 3166 AU, respectively, mean \pm SEM, Figure 4B). Likewise, the inhibitory titers in the serum of FVIII^{2118Q}-treated mice were similar to that in the serum of FVIII^{HSQ}-treated mice (810 ± 527 BU/ml versus 639 ± 455 BU/ml, respectively, Figure 4C). Next, we investigated the immunogenicity of FVIII^{2118Q} and FVIII^{HSQ} in absence of VWF in double FVIII/VWF-deficient mice. As seen in the case of FVIII-deficient mice, neither anti-FVIII IgG titers nor inhibitory titers differed between double deficient mice treated with FVIII^{HSQ} (2712 ± 2599 AU; 174 ± 195 BU/ml, Figure 4D) or FVIII^{2118Q} (3979 ± 4384 AU; 180 ± 175 BU/ml, Figure 4E). Taken together, our results indicate that oligomannose carbohydrates at N2118 do not play a major role in FVIII immunogenicity, at least in mice.

Mannose-ending glycans at position 2118 do not modulate FVIII endocytosis and presentation by mouse AgPCs

We have shown earlier that mouse BM-DCs, in contrast to human MO-DCs, do not endocytose FVIII through mannose-sensitive endocytosis pathways [26]. Here, we compared the ability of mouse splenocytes to present FVIII^{HSQ} and FVIII^{2118Q} to the FVIII-specific T cell hybridoma 1G8-A2. Of note, we observed, as reported previously, that CD206 is expressed by mouse macrophages from the red pulp of the spleen [27], and by a subset of mouse splenic dendritic cells [28,29] that are present in freshly isolated splenocytes from Sure-L1 mice (data not shown). In contrast to human MO-DCs (Figure 3C), mouse splenic AgPCs activated 1G8-A2 in a similar manner irrespective of the source of FVIII used: FVIII^{HSQ}, FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q}, FVIII^{2118A} (Figure 5) or FVIII^{239Q/2118Q} (Supplementary Figure 2B).

Discussion

Our previous work has demonstrated the contribution of oligomannose carbohydrates at positions 239 and 2118 of human FVIII for its recognition and endocytosis by human DCs, and subsequent presentation to FVIII-specific T lymphocytes [9]. Our objective was to generate a FVIII mutant lacking the N239 and N2118 mannose-ending glycans, endowed with a reduced recognition by AgPCs *in vitro* and reduced immunogenicity *in vivo*.

Missense mutations in 580 (42%) of the 1384 amino acids that encompass activated FVIII lead to moderate, mild or severe hemophilia A (HAMSTeRS database November 2016, <http://www.factorviii-db.org/>). This illustrates the critical relationship between the structure and function of proteins in general, and of FVIII in particular, which prompted us to estimate the repercussion of removing N-glycosylation sites of FVIII on its pro-coagulant activity. Both the endogenously produced $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ and the exogenously administered $\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ demonstrated specific activities similar to that of their respective non-mutated counterparts. Accordingly, $\Delta 2\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ protected mice from experimentally induced blood loss, and $\text{FVIII}^{239\text{Q}/2118\text{Q}}$ bound normally to VWF and phosphatidylserine. These observations suggest that oligomannose carbohydrates at N239 and N2118 do not play a role in the pro-coagulant activity of FVIII. This is in agreement with the absence of missense mutation at positions 239 and 2118 leading to hemophilia A (HAMSTeRS database).

Circulating levels of $\Delta 2\text{FVIII}$ *in vivo* and levels of production of $\text{FVIII}^{\text{HSQ}}$ *in vitro* were 2 to 14-fold lower when the molecules were mutated at N239 and/or N2118. The half-life of $\Delta 2\text{FVIII}$ was however not affected by the removal of the latter N-glycosylation sites. Likewise, the half-life of purified $\text{FVIII}^{2118\text{Q}}$ was identical to that of $\text{FVIII}^{\text{HSQ}}$. The data suggest that the oligomannose carbohydrates at N239 and N2118 of FVIII, that bind CD206 expressed on macrophages and dendritic cells, and CLEC4M expressed by liver and lymphatic sinusoidal endothelial cells [9,13,30], or the soluble lectin Galectin-1 [31], are not involved in FVIII

catabolism, at least in mice. At the cellular level, efficient transport of FVIII from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus requires the interaction of N-linked glycosylation on FVIII with the mannose-binding lectin LMAN1 [32,33]. It is probable that the reduced *in vitro* and *in vivo* production of mutated FVIII relates to an inefficient intracellular transport of FVIII consecutive to the removal of 2 of the 4 or 5 N-glycosylation sites present on B domain-deleted FVIII^{HSQ} or on Δ 2FVIII, respectively [12,34,35]. Our data further suggest that the ER export of FVIII involves oligosaccharide structures outside the B domain, with N-glycosylation at N239 playing a predominant role, and N-glycosylation at N2118 having a minor contribution. Alternatively, the data may reflect a critical role for the N239-glycosylation in sustaining proper FVIII folding.

The first step of the primary immune response to therapeutic FVIII is its uptake by immature DCs. Our earlier work had documented the importance of mannose-ending glycans on FVIII for its recognition and internalization by MO-DCs and its subsequent presentation to CD4⁺ T cells [9]. The phenomenon was true for both full-length and B domain-deleted FVIII, thus highlighting the contribution of mannose-ending glycans outside the B domain for FVIII recognition by AgPCs. In humans, the presence of high mannose glycans is not frequent on secreted proteins [36]. The deliberate mannosylation of non-self-antigens has been shown to enhance their endocytosis by human DCs and subsequent presentation to antigen-specific T lymphocytes [37,38]. Indeed, human DCs express several endocytic C-type lectin receptors, including CD206, DC-SIGN and dectin 2, which bind exposed mannose residues on glycoproteins through their carbohydrate recognition domains [39–41]. The present work demonstrates the prevalent role of mannosylated glycans at N2118 in mediating FVIII uptake by MO-DCs, in the context of the absence of the heavily glycosylated B domain. Mutation of N2118 to a Q or A residue was sufficient to abrogate the presentation of purified recombinant BDD FVIII or FVIII light chain by MO-DCs to FVIII-specific CD4⁺ T cells. This was shown

in the case of two different sources of T cells: a mouse hybridoma that recognizes human FVIII in the context of the HLA-DRB1*01:01 allele, and a FVIII-specific human HLA-DRB1*15:01-restricted T cell line; the two model T cells recognize different epitopes on C1 that do not overlap with N2118. Importantly, the mutated FVIII light chain was still presented to CD4⁺ T cells when a human memory B cell line was used as a source of AgPCs. Mutations of N239 had only a marginal effect on T cell activation by MO-DCs, which may relate to the fact that glycans at N239 contain high-mannose, hybrid and complex structures, while glycans at N2118 exclusively contain high-mannose structures (Man 5-9) [11,12].

We and others have recently documented the crucial role played by charged residues in the C1 and C2 domains of FVIII for its recognition and endocytosis by MO-DCs [19,42]. Mutation to alanine residues of R2215 and R2220 in the protruding loops of the C2 domain of FVIII^{HSQ} (referred to as FVIII^{R2215-20A}) as well as of R2090, K2092 and F2093 in the protruding loops of C1 (referred to as FVIII^{C1}) independently reduced FVIII endocytosis by $\geq 50\%$ and presentation to T cells by $\geq 75\%$. Importantly, FVIII^{R2215-20A} and FVIII^{C1} contain the N-linked high-mannose carbohydrates at position N2118. Conversely, FVIII^{2118Q} contains the native amino acids at positions 2092, 2093, 2090, 2215 and 2220, but is not endocytosed by MO-DCs and presented to T cells. These results point towards a critical role played by the C domains, and particularly the C1 domain, in the recognition and internalization of FVIII by MO-DCs. They also suggest that the engagement of the three FVIII entities – charged residues in the C1 domain, charged residues in the C2 domain and glycans at N2118, is required for FVIII uptake, and pave the way towards the identification of the surface receptors involved in the process.

Removal of the N-linked glycosylation site at position 2118 did not reduce the immunogenicity of FVIII in FVIII-deficient mice. This is reminiscent of the lack of reduced immunogenicity of the FVIII^{R2215-20A} and FVIII^{C1} in hemophilic mice, despite a drastic reduction in endocytosis by DCs [19]. Interestingly, the immunogenicity of FVIII^{C1} was reduced as compared to that of

FVIII^{HSQ} in double FVIII/VWF-deficient mice, thus highlighting a role for VWF in impairing the potential beneficial effect of mutations in C1 on a reduction of FVIII immunogenicity *in vivo* [19]. We had previously identified CD206 as one of the receptors implicated in the mannose-sensitive uptake of FVIII by MO-DCs [9,10]. The activation of T cells was partially blocked when MO-DCs and FVIII were incubated in the presence of an anti-CD206 antibody, and FVIII was demonstrated to interact with soluble and immobilized CD206. Importantly, the interaction between FVIII and CD206 was inhibited in a dose-dependent manner by VWF [25]. A role for endogenous VWF in preventing the reduction of FVIII^{218Q} immunogenicity in FVIII-deficient mice is however not probable owing to the fact that there was no reduction in FVIII^{218Q} immunogenicity in double FVIII/VWF-deficient mice.

The mutation of charged residues in the C1 and C2 domains inhibit endocytosis both by human MO-DCs and by mouse bone marrow-derived DCs [19,43]. In contrast, we have previously demonstrated that mouse bone marrow-derived DCs do not internalize FVIII through mannose-sensitive pathways [26]. Accordingly, FVIII^{218Q} and FVIII^{HSQ} were presented to a similar extent to T cells when mouse splenocytes or purified mouse splenic DCs were used as a source of AgPCs. Importantly, DCs from C57BL/6 mice have been reported to express low levels of CD206 [44], in drastic contrast with human MO-DCs [45,46]. Furthermore, the tissue distribution of C-type lectin receptors such as CD206 is very different between human and rodents. In the mouse spleen, CD206 is predominantly expressed by red pulp macrophages and by a subset of dendritic cells [27,28], while CD206 expression is lacking in human splenic macrophages [47,48]. This is of importance in view of the fact that we have previously shown the accumulation of exogenously administered FVIII at the level of metallophilic macrophages in the marginal zone of the spleen of FVIII-deficient mice [22]. Of note, in the human spleen, CD206 is expressed by lining venous sinus cells [48]. The identification of preclinical animal models that better mimic the distribution of C-type lectin receptors in the human is necessary

to confirm the reduced immunogenicity of FVIII^{2118Q} *in vivo*, and its potential safety for replacement therapy in patients with hemophilia A.

Acknowledgements

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, by Centre National de la Recherche Scientifique, by Université Pierre et Marie Curie, by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-MRAR-028-01, ANR-07-JCJC-0100-01, ANR-07-RIB-002-02) and by grants from LFB (Les Ulis, France). cDNA encoding a partially B domain-deleted FVIII (FVIII-ΔII) were gifts from LFB. FVIII^{HSQ} in the ReNeo plasmid and BHK-M cells were kind gifts from Prof Pete Lollar (Aflac Cancer and Blood Disorders Center, Department of Pediatrics, Emory University, Atlanta, GA, USA). D9E9, BO2C11 and mAb6 were gifts from JM Saint-Remy and M Jacquemin (CMVB, KUL, Belgium). Overlapping peptides of the C1 domain were gifts from Kate Pratt (University of Washington Seattle, Washington, USA). We would like to extend our acknowledgments to Samy Chtourou and Jean-Luc Plantier (LFB) for advice and support, and to the Centre d'Explorations Fonctionnelles (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for assistance.

Authors' contributions

Designed research: SDe, SDa, CVD, ODC, SLD

Performed research: SDe, JR, SDa, BG, MI, ODC

Analyzed data: SDe, JR, SVK, SLD

Wrote the paper: SDe, SLD

Authors declare no conflict of interest, with the exception of SDa, SVK and SLD who are inventors on a patent related to the research.

References

- 1 Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Kornhuber B. Factor VIII inhibitors in haemophiliacs. *Lancet Lond Engl* 1992; **340**: 253.
- 2 Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, Schwarz J, Menius ED, Pavlova A, Oldenburg J, Kessing B, DiMichele DM, Shapiro AD, Winkler CA, Berntorp E, Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* 2013; **121**: 1446–54.
- 3 Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost JTH* 2009; **7**: 2006–15.
- 4 Dimitrov JD, Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S, Repesse Y, Meslier Y, Planchais C, Teyssandier M, Motterlini R, Bayry J, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 2010; **115**: 2682–5.
- 5 Hu G, Guo D, Key NS, Conti-Fine BM. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb Haemost* 2007; **97**: 788–94.
- 6 James EA, Kwok WW, Ettinger RA, Thompson AR, Pratt KP. T-cell responses over time in a mild hemophilia A inhibitor subject: epitope identification and transient immunogenicity of the corresponding self-peptide. *J Thromb Haemost JTH* 2007; **5**: 2399–407.
- 7 Lacroix-Desmazes S, Navarrete A-M, André S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 2008; **112**: 240–9.
- 8 van Haren SD, Herczenik E, ten Brinke A, Mertens K, Voorberg J, Meijer AB. HLA-DR-presented peptide repertoires derived from human monocyte-derived dendritic cells pulsed with blood coagulation factor VIII. *Mol Cell Proteomics MCP* 2011; **10**: M110.002246.
- 9 Dasgupta S, Navarrete A-M, Bayry J, Delignat S, Wootla B, André S, Christophe O, Nascimbeni M, Jacquemin M, Martinez-Pomares L, Geijtenbeek TBH, Moris A, Saint-Remy J-M, Kazatchkine MD, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 8965–70.
- 10 Repessé Y, Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 1172-1173-1175.
- 11 Kannicht C, Ramström M, Kohla G, Tiemeyer M, Casademunt E, Walter O, Sandberg H. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. *Thromb Res* 2013; **131**: 78–88.

- 12 Medzihradzky KF, Besman MJ, Burlingame AL. Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; **69**: 3986–94.
- 13 Delignat S, Repessé Y, Gilardin L, Dimitrov JD, Lone YC, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 2014; **20**: 486–92.
- 14 Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, Feizi T, Langen H, Nussenzweig MC. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 2002; **295**: 1898–901.
- 15 Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet* 1995; **10**: 119–21.
- 16 Pajot A, Michel M-L, Fazilleau N, Pancré V, Auriault C, Ojcius DM, Lemonnier FA, Lone Y-C. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 3060–9.
- 17 Meulien P, Faure T, Mischler F, Harrer H, Ulrich P, Bouderbala B, Dott K, Sainte Marie M, Mazurier C, Wiesel ML. A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII. *Protein Eng* 1988; **2**: 301–6.
- 18 Marx I, Lenting PJ, Adler T, Pendu R, Christophe OD, Denis CV. Correction of bleeding symptoms in von Willebrand factor-deficient mice by liver-expressed von Willebrand factor mutants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 419–24.
- 19 Gangadharan B, Ing M, Delignat S, Peyron I, Teyssandier M, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica* 2016; .
- 20 Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, Vander Elst L, Hoylaerts MF, Bakkus M, Thielemans K, Arnout J, Peerlinck K, Gilles JG, Vermynen J, Saint-Remy JM. Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* 1998; **92**: 496–506.
- 21 Mordenti J, Osaka G, Garcia K, Thomsen K, Licko V, Meng G. Pharmacokinetics and interspecies scaling of recombinant human factor VIII. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; **136**: 75–8.
- 22 Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, Caligiuri G, Christophe OD, Bayry J, Nicoletti A, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost JTH* 2009; **7**: 1816–23.
- 23 Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37685–92.

- 24 Jacquemin M, Vantomme V, Buhot C, Lavend'homme R, Burny W, Demotte N, Chaux P, Peerlinck K, Vermynen J, Maillere B, van der Bruggen P, Saint-Remy J-M. CD4+ T-cell T cell clones specific for wild-type factor VIII: a molecular mechanism responsible for a higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate hemophilia A. *Blood* 2003; **101**: 1351–8.
- 25 Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete A-M, Wootla B, Delignat S, Irinopoulou T, Kamaté C, Saint-Remy J-M, Jacquemin M, Lenting PJ, Borel-Derlon A, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* 2007; **109**: 610–2.
- 26 Delignat S, Repessé Y, Navarrete A-M, Meslier Y, Gupta N, Christophe OD, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 2012; **18**: 248–54.
- 27 Linehan SA, Martínez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med* 1999; **189**: 1961–72.
- 28 Burgdorf S, Lukacs-Kornek V, Kurts C. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006; **176**: 6770–6.
- 29 Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 2007; **316**: 612–6.
- 30 Rydz N, Swystun LL, Notley C, Paterson AD, Riches JJ, Sponagle K, Boonyawat B, Montgomery RR, James PD, Lillicrap D. The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood* 2013; **121**: 5228–37.
- 31 O'Sullivan JM, Jenkins PV, Rawley O, Gegenbauer K, Chion A, Lavin M, Byrne B, O'Kennedy R, Preston RJS, Brophy TM, O'Donnell JS. Galectin-1 and Galectin-3 Constitute Novel-Binding Partners for Factor VIII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; **36**: 855–63.
- 32 Neerman-Arbez M, Johnson KM, Morris MA, McVey JH, Peyvandi F, Nichols WC, Ginsburg D, Rossier C, Antonarakis SE, Tuddenham EG. Molecular analysis of the ERGIC-53 gene in 35 families with combined factor V-factor VIII deficiency. *Blood* 1999; **93**: 2253–60.
- 33 Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CE, Wheatley MA, Moussalli MJ, Hauri HP, Ciavarella N, Kaufman RJ, Ginsburg D. Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* 1998; **93**: 61–70.
- 34 Bihoreau N, Paolantonacci P, Bardelle C, Fontaine-Aupart MP, Krishnan S, Yon J, Romet-Lemonne JL. Structural and functional characterization of Factor VIII-delta II, a new recombinant Factor VIII lacking most of the B-domain. *Biochem J* 1991; **277** (Pt 1): 23–31.

- 35 Moussalli M, Pipe SW, Hauri HP, Nichols WC, Ginsburg D, Kaufman RJ. Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32539–42.
- 36 Lee LY, Lin C-H, Fanayan S, Packer NH, Thaysen-Andersen M. Differential site accessibility mechanistically explains subcellular-specific N-glycosylation determinants. *Front Immunol* 2014; **5**: 404.
- 37 Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2417–25.
- 38 Lam JS, Mansour MK, Specht CA, Levitz SM. A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005; **175**: 7496–503.
- 39 Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 33–54.
- 40 Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2012; **92**: 1177–86.
- 41 Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 901–44.
- 42 Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, Kaijen P, van den Biggelaar M, Meijer AB, Martinez-Pomares L, ten Brinke A, Voorberg J. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 501–9, 509-5.
- 43 Wroblewska A, van Haren SD, Herczenik E, Kaijen P, Ruminska A, Jin S-Y, Zheng XL, van den Biggelaar M, ten Brinke A, Meijer AB, Voorberg J. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood* 2012; **119**: 5294–300.
- 44 Autenrieth SE, Autenrieth IB. Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* 2009; **127**: 523–9.
- 45 Menges M, Baumeister T, Rössner S, Stoitzner P, Romani N, Gessner A, Lutz MB. IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J Leukoc Biol* 2005; **77**: 535–43.
- 46 Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 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* 1995; **182**: 389–400.
- 47 Martinez-Pomares L, Hanitsch LG, Stillion R, Keshav S, Gordon S. Expression of mannose receptor and ligands for its cysteine-rich domain in venous sinuses of human spleen. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2005; **85**: 1238–49.

- 48 Pack M, Trumfheller C, Thomas D, Park CG, Granelli-Piperno A, Münz C, Steinman RM. DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology* 2008; **123**: 438–46.
- 49 Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, Lubin IM, Shima M, Scandella D, Lollar P. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood* 1998; **92**: 3701–9.
- 50 Saenko EL, Shima M, Gilbert GE, Scandella D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem* 1996; **271**: 27424–31.
- 51 Doering C, Parker ET, Healey JF, Craddock HN, Barrow RT, Lollar P. Expression and characterization of recombinant murine factor VIII. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 450–8.

Legends

Figure 1. *In vivo* production of wild-type and mutated B domain-deleted FVIII lacking the N-glycosylation sites at 239 and 2118. Panel A. Human B domain-deleted FVIII was modified by site-directed mutagenesis. Four constructs were generated from the $\Delta 2$ FVIII sequence: $\Delta 2$ FVIII wild-type FVIII ($\Delta 2$ FVIII^{WT}), single N239Q mutant ($\Delta 2$ FVIII^{239Q}), single N2118Q mutant ($\Delta 2$ FVIII^{2118Q}) and double mutant FVIII ($\Delta 2$ FVIII^{239Q/2118Q}). Panel B. The different pLIVE constructs (100 μ g in 2 ml of 0.9% NaCl) were injected intravenously to FVIII-deficient mice (4 to 11 mice per group) and blood was recovered after 4 days. The graph depicts as boxes and whiskers the levels of FVIII in plasma, as measured by ELISA (FVIII:Ag, empty bars) and by functional chromogenic assay (FVIII:C, full bars) using normal human plasma as a standard. The inset depicts the FVIII:C/FVIII:Ag ratio for each of the four recombinant FVIII proteins. Results are a pool of two independent experiments. Panel C. FVIII-deficient mice received hydrodynamic injections of pLIVE constructs encoding wild-type (6 mice, empty squares) and double mutant FVIII (6 mice, empty triangles) FVIII. Six days later, activated NHS-biotin (500 μ g) was injected to each mouse, and residual biotinylated FVIII was measured at indicated time points. Data represent the percentage of residual biotinylated FVIII quantified at t=0 (15 min after biotin injection) which was set at 100% for each mouse. For calculation of half-life, the best fit was obtained with nonlinear regression with two exponential decay (Prism v5.0b, GraphPad Software, Inc.). Panel D. Four days after hydrodynamic injections of pLIVE constructs encoding wild-type (5 mice, empty squares) and double mutants FVIII (5 mice, empty triangles), FVIII deficient mice were subjected to tail clip experiments and blood loss was measured as explained in Material and Methods. Untreated FVIII-deficient mice (8 mice, empty circles) and wild-type C57BL/6 mice (8 mice, full circles) were used as controls.

Figure 2. Production of recombinant wild-type and of mutated B domain-deleted FVIII lacking the N-glycosylation sites at 239 and/or 2118. Levels of FVIII:C (Panel A) and FVIII:Ag (Panel B) produced from BHK-M cells transfected with either the FVIII^{HSQ}, FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q}, or FVIII^{239Q/2118Q} transgenes. FVIII:C and FVIII:Ag were measured after 24 hours in serum-free media by functional chromogenic assay and sandwich Elisa respectively, and are expressed relative to 1.10⁶ cells. Statistical comparisons between cells transfected with mutants and FVIII^{HSQ} were made using the Mann-Whitney unpaired t-test. Error bars indicate SEM. Results are representatives of 2 independent experiments. Panel C. SDS PAGE of FVIII^{HSQ}, FVIII^{239Q}, and FVIII^{2118Q} with and without exposure to thrombin (FIIa). SC, single chain FVIII; HC, FVIII heavy chain (A1-A2 domains); LC, FVIII light chain; LCIIa, thrombin-cleaved light chain; A1, A1 domain; A2, A2 domain. Panel D. FVIII activity was measured by chromogenic assay and protein concentration was evaluated by absorbance at 280nm as explained in material and methods. *FVIII^{239Q} and FVIII^{239Q/2118Q} were purified and tested only once. Panel E and F. Elisa plates were coated with human VWF (E), or phosphatidyl serine – PS (F). The different recombinant B-domain deleted FVIII were incubated at different concentrations and revealed with a biotinylated anti-human FVIII antibody (GMA-8015), streptavidine-HRP and the peroxidase substrate. The binding of FVIII is depicted as the optical density measured at 492 nm in arbitrary units (AU).

Figure 3. Removal of N-glycosylation at 2118 site alters FVIII presentation by human dendritic cells. Panel A. Sites of mutations of FVIII and epitope specificity of FVIII specific T and B cells used in assays. The figure depicts the structure of human FVIII and the determined sites of N-glycosylation as reported in [12], represented as open circles. The nature of oligosaccharides expressed at N239 and N2118 is emphasized: while N2118 carries only Man5-

>Man9 oligomannose carbohydrates, N239 bears an heterogenous population of oligomannose- and complex-type carbohydrates. The graph also depicts the epitopes for 1G8-A2, a FVIII-specific mouse CD4⁺ T cell hybridoma (epitope L²⁰¹²-C²⁰²¹), D9E9, a human FVIII-specific T cell line (epitope: I²¹⁴⁴-T²¹⁶¹), and for BO2C11, a human FVIII-specific B cell line (epitope: 2170-2332) [20,24]. Panel B. HLA-matched human MO-DCs were pre-incubated 30min at 37°C with mannan or EDTA prior incubation with FVIII and a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted T cell hybridoma. Panel C. Activation of the FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted T cell hybridoma by FVIII-loaded HLA-matched human MO-DCs with FVIII^{HSQ}, FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q}, or FVIII^{2118A}. Activation of the FVIII-specific T cell hybridoma was evaluated by quantification of secreted Il-2 in the supernatant by Elisa. Representative of three experiments (mean±SD). Panels D, E and F. Presentation of wild-type or mutant FVIII light chain to the FVIII-specific human CD4⁺ T cell clone D9E9. Five-day-old monocyte-derived human DCs (Panel D) or BO2C11 (Panel E) were incubated in medium alone or in the presence of mannan (1 mg/ml) for 30 min at 37°C. Cells were then co-cultured with the FVIII-specific CD4⁺T cell clone D9E9 in presence of increasing concentrations of wild-type FVIII light chain (LCh) for 20 hr. Human MO-DCs (Panel F) were incubated with increasing concentrations of wild-type (full squares) or mutated N2118A (full triangles) light chain (LCh). Activation of D9E9 was assessed after 20 hr by measuring IFN-gamma in the culture supernatant by ELISA (mean ± SD). Representative of two independent experiments.

Figure 4. Removal of 2118 mannose ending glycans does not modulate FVIII immunogenicity in FVIII-deficient mice, neither in double VWF/FVIII-deficient mice.
 Panel A. Half-life of wild type and N2118Q mutated FVIII. FVIII^{HSQ} and FVIII^{2118Q} were administered to FVIII-deficient mice and the residual FVIII:Ag was measured at different time

points (n=3 mice per time point) using a sandwich Elisa with a C2 FVIII domain specific mAb for coating and an anti-A2 FVIII mAb for detection. The data is plotted as percentage of initial FVIII activity (measured 5 minutes after administration) versus time (mean±SEM). Representative of 2 independent experiments. Experimental data were fitted using a two-phase decay curve to determine the fast and slow phase of FVIII clearance *in vivo*. **Inset.** The slow phase and fast phases of FVIII clearance were determined by fitting the clearance data depicted in the figure to a double exponential two phase decay curve. FVIII-deficient mice (Panel B and C) and VWF/FVIII double-deficient mice (Panel D and E) were injected intravenously 4 times at weekly interval with 0.5µg of FVIII^{HSQ} or FVIII^{2118Q}. One week after the last injection, blood samples were collected and anti-FVIII IgG titers (Panel A and C) quantified based on standard curves generated using a purified mouse monoclonal anti-FVIII IgG (Mab6) serially diluted on FVIII-coated ELISA plates. Results are defined as arbitrary unit. Inhibitory titers towards FVIII (Panel B and D) were measured by chromogenic assay. Results are representative of 3 independent experiment for FVIII-deficient mice (21 and 24 mice for FVIII^{HSQ} and FVIII^{2118Q} group respectively), and 2 independent experiments for double VWF/FVIII-deficient mice (16 and 14 mice for FVIII^{HSQ} and FVIII^{2118Q} group respectively).

Figure 5. Removal of N-glycosylation at 2118 does not alter FVIII presentation by mouse AgPCs. Splenocytes from SureL1 mice were treated with mitomycin C prior incubation with FVIII^{HSQ}, FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q} or FVIII^{2118A} and the FVIII specific T cell hybridoma. Activation of the FVIII-specific T cell hybridoma was evaluated by quantification of secreted Il-2 in the supernatant by Elisa. Representative of three experiments (mean±SD).

Supplemental methods

Cloning of wild-type and mutant B domain-deleted FVIII for in vivo gene transfer.

A 4389-base pair fragment was amplified by PCR from a cDNA encoding a partially B domain-deleted FVIII (FVIII-ΔII) [17] and introduced into the pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). FVIII-ΔII contains the 30 N-terminal amino-acids of the B domain of FVIII, and hence the N-glycosylation site NAT at position 757-759 [34]. The pcDNA3.1-FVIII-ΔII plasmid containing the FVIII-ΔII cDNA was mutated using the QuickChange II XL mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). N239 and/or N2118 were mutated to Q, using the protocol provided by Stratagene. The wild-type and mutated FVIII-ΔII cDNA were inserted into the pLIVE vector (Mirus, Madison, WI, USA).

Cloning, production and purification of wild-type and mutant B domain-deleted FVIII.

cDNA encoding human B domain-deleted FVIII (HSQ), containing the 14-amino acid segment SFSQNPPVLKRHR in place of the B domain, cloned in the ReNeo plasmid [49] was used as a template to generate the FVIII^{239Q}, FVIII^{2118Q}, FVIII^{2118A} and FVIII^{239Q/2118Q} mutants by splicing-by-overlap extension mutagenesis. Presence of the mutations was confirmed by standard sequencing analysis. BHK-M cells (a kind gift from Prof P Lollar, Emory University, Atlanta, Ga, USA) were transfected and selected for neomycin resistant clones using Geneticin® G418 (500 µg/ml). Screening of FVIII producing clones was performed by sandwich ELISA using an anti-FVIII light chain specific mAb (Clone ESH-8, Hyphen Biomed, Neuville sur Oise, France), and a biotinylated anti-FVIII heavy chain mAb (Clone GMA-8015, Green mountain antibodies, Burlington, USA), as capture and detection antibodies, and by chromogenic assay®. The stable expression of wild-type and mutated FVIII by baby hamster kidney-derived cells, and FVIII purification were performed as previously described [19]. Purified FVIII and mutants were analyzed by 4-12% gradient SDS PAGE (1 µg per lane) with

and without prior activation by bovin thrombin (Sigma-Aldrich) and silver stained to allow proteins detection. Specific activity of purified WT and FVIII mutants were evaluated by chromogenic assay® and absorbance at 280nm with molar extinction coefficient of 256,300 M⁻¹cm⁻¹.

Cloning and site-directed mutagenesis of the light chain of FVIII.

A N2118A mutated light chain of human recombinant FVIII was amplified using appropriate primers from the commercially available cDNA (pSP64-VIII, ATCC, Manassas, VA). The mutated light chain fragment was cloned in the pNUT vector, with the signal sequence of human IgG kappa. The mutated light chain was produced in DMEM/F12, 5% FCS by CHO K1 stably transfected, and purified by ion-exchange chromatography. Briefly, a Resource S column (GE Healthcare) was equilibrated with 10 mM histidine-HCl, 5 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 0.01% tween 80 (pH 6.0). The culture supernatant in 10 mM MES, 5 mM EDTA, 0.01% tween 80, pH 6.0 was injected on the column. The recombinant light chain was eluted with a NaCl gradient, dialyzed in RPMI for 2 hr at 4°C and quantified by sandwich ELISA using the human monoclonal anti-C2 conformational epitope-specific IgG (clone BO2C11, gift from Jean-Marie Saint Rémy, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium), and ESH8 antibody. Human recombinant FVIII was used as a standard. The wild-type light chain was a kind gift from Dr E Saenko and had been prepared from human FVIII as described [50].

Expression of wild-type and mutated FVIII by BHK-M cells

BHK-M cells (gift from Dr P Lollar, Emory University, Atlanta, GA, USA) were transfected using Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Transfected cells were cultured onto 10 cm² dishes at a density of 1000, 500 and 100 cells/ml in the presence of 500 µg/ml geneticin sulphate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). After 10 days,

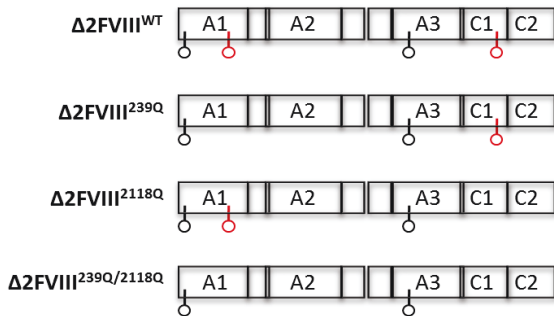
geneticin-resistant clones were picked and harvested in flat-bottom 96-well plates, and screened at confluency for FVIII production by sandwich ELISA using an anti-FVIII light chain specific mAb (Clone ESH-8, Hyphen Biomed, Neuville sur Oise, France), and a biotinylated anti-FVIII heavy chain mAb (Clone GMA-8015, Green mountain antibodies, Burlington, USA), as capture and detection antibodies. The highest expressing clones for each FVIII was selected according to the quantity of FVIII:C produced by 1.10^6 millions cells/ml in 24 hours. The selected clones were scaled up to near confluency before switching the medium to serum-free AIM-V medium (Life Technologies). Medium was collected every 24 hr and cells were replenished with fresh AIM-V medium. FVIII purification was performed by affinity chromatography on VIII select column (GE Healthcare, UppsA, Sweden), followed by anion-exchange chromatography on HiTrap Resource Q column (GE Healthcare), as previously described [19,51].

Supplemental Figure 1. Screening of FVIII peptide specificity of T cell hybridoma 1G8-A2. Specificity of the FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted T cell hybridoma 1G8-A2 was screened against light chain (LC), heavy chain (HC) and C2 domain of FVIII (C2) by FVIII-loaded HLA-matched human MO-DCs (Panel A). Overlapping peptide of the C1 domain were further tested with loaded HLA-matched human MO-DCs (Panel B). Table 1. Prediction of peptides binding to HLA DRB1*0101 with IEDB database shows that C1.1 and C1.3 sequence share only one common core peptide.

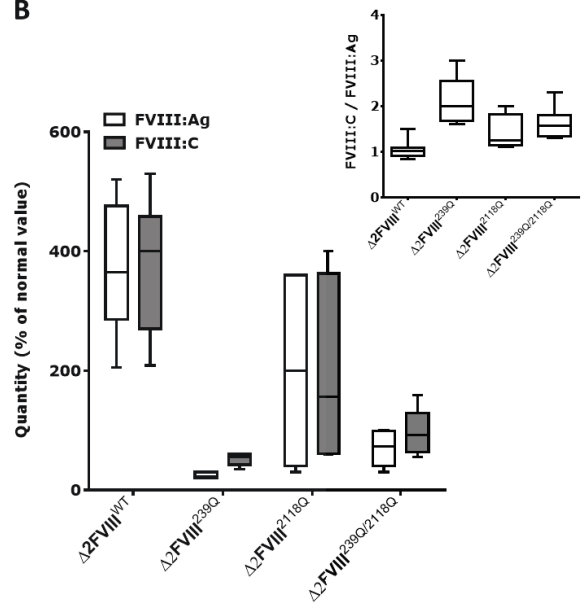
Supplemental Figure 2. Removal of N2118 alters FVIII presentation by human DCs but not by mouse DCs. The FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted T cell hybridoma, 1G8-A2, was incubated with human MO-DCs (Panel A) or mouse splenic DCs (Panel B) with a ratio 10 for 1, with 10nM of wild type FVIII (FVIII^{HSQ}), FVIII^{2118Q} or the double mutant FVIII^{239Q/2118Q}. Activation of FVIII T cells was assessed by measure of secreted Il-2, with 100% of activation corresponding to Il-2 concentrations secreted with FVIII^{HSQ}.

Figure 1

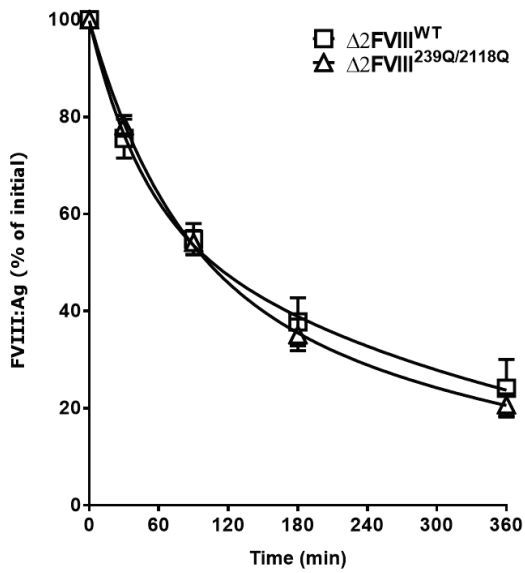
A



B



C



D

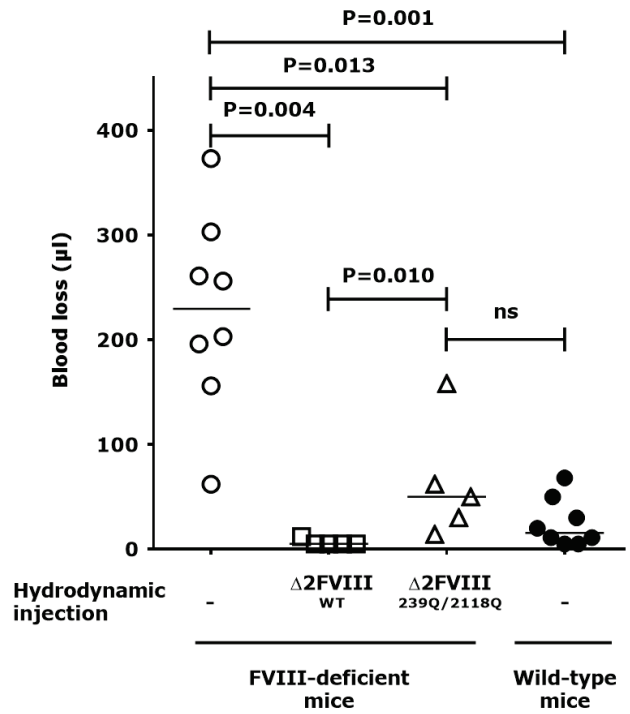


Figure 2

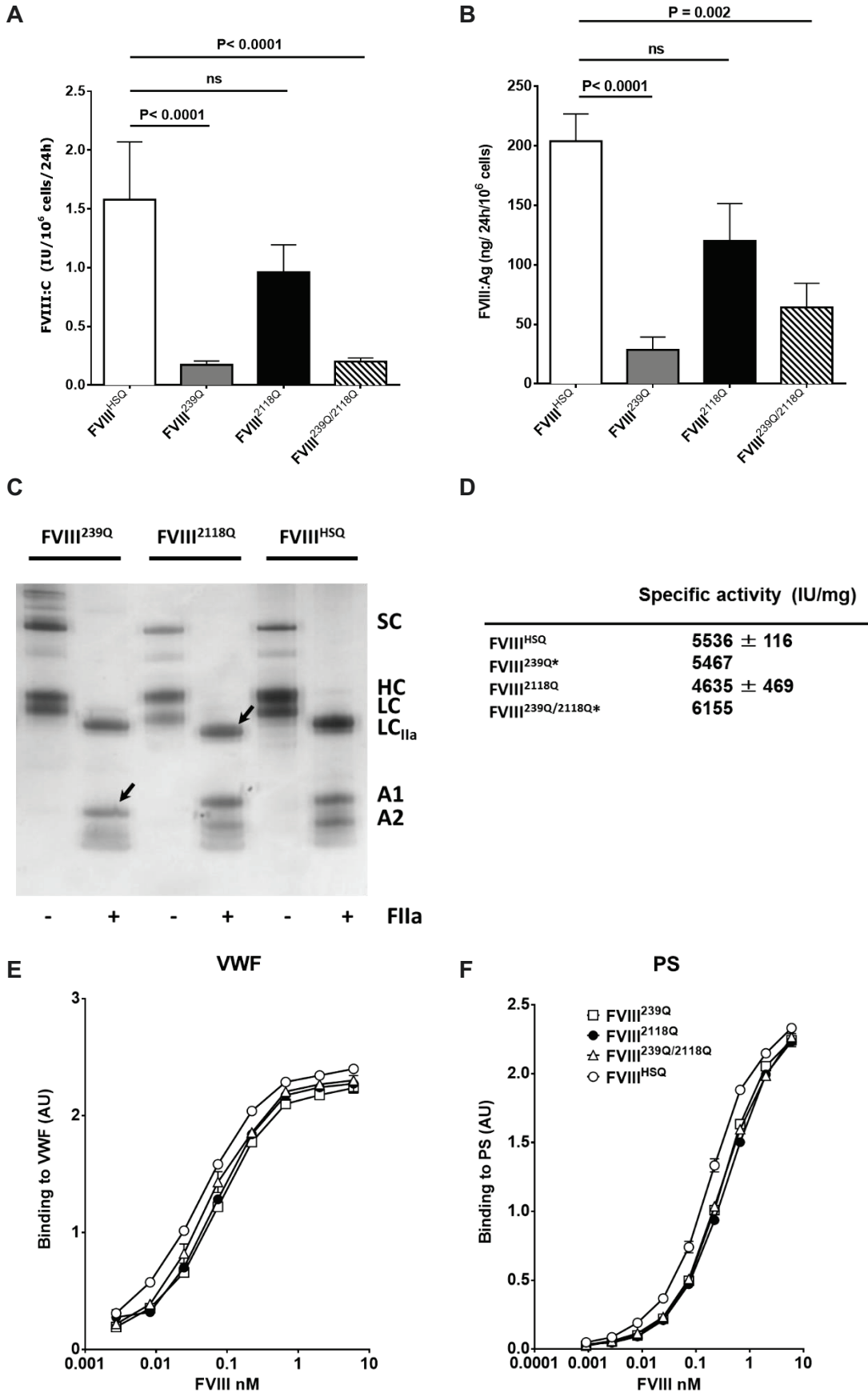


Figure 3

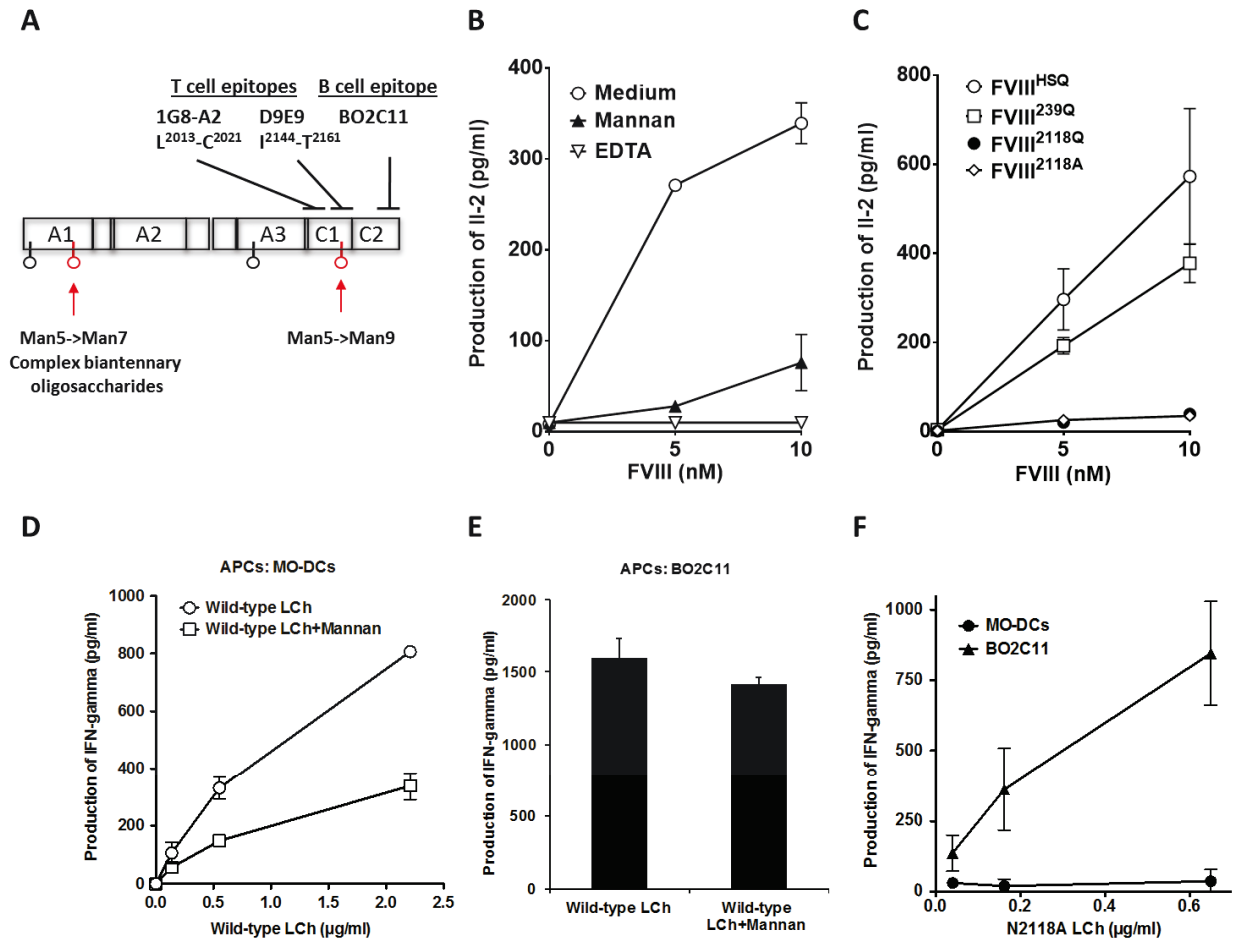


Figure 4

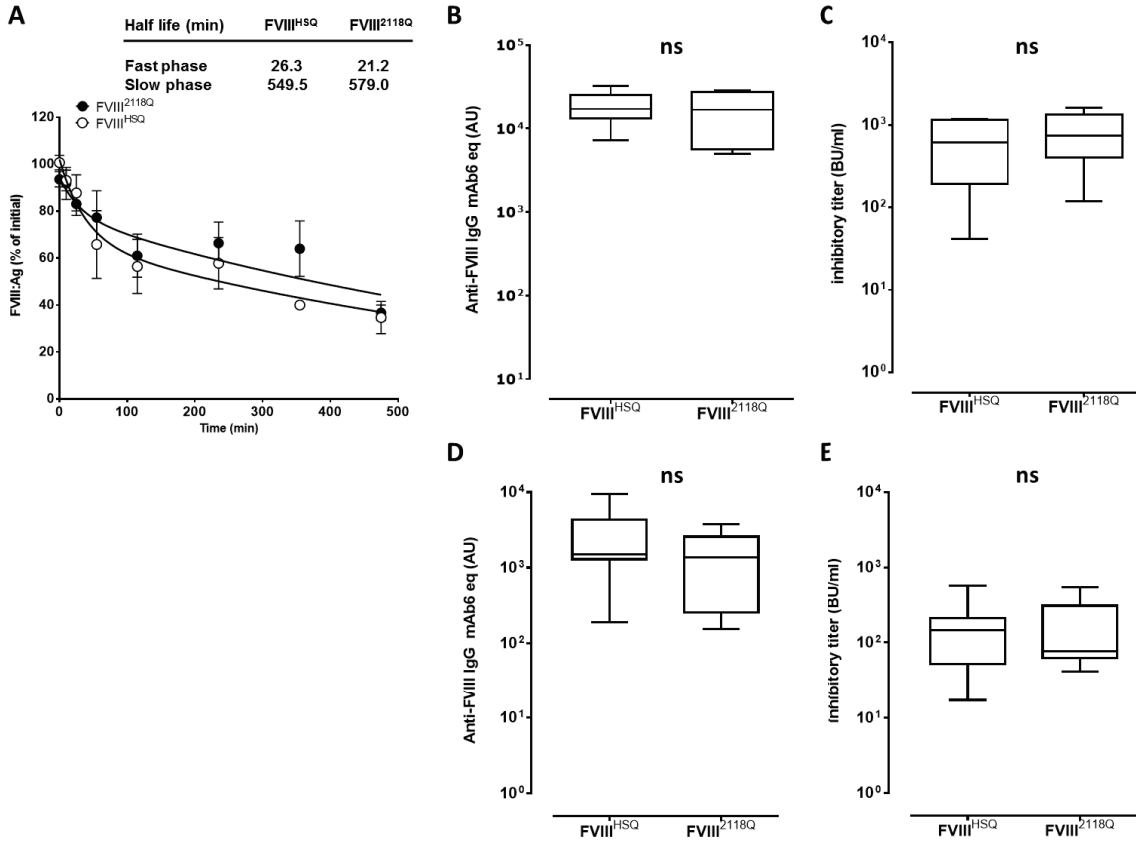
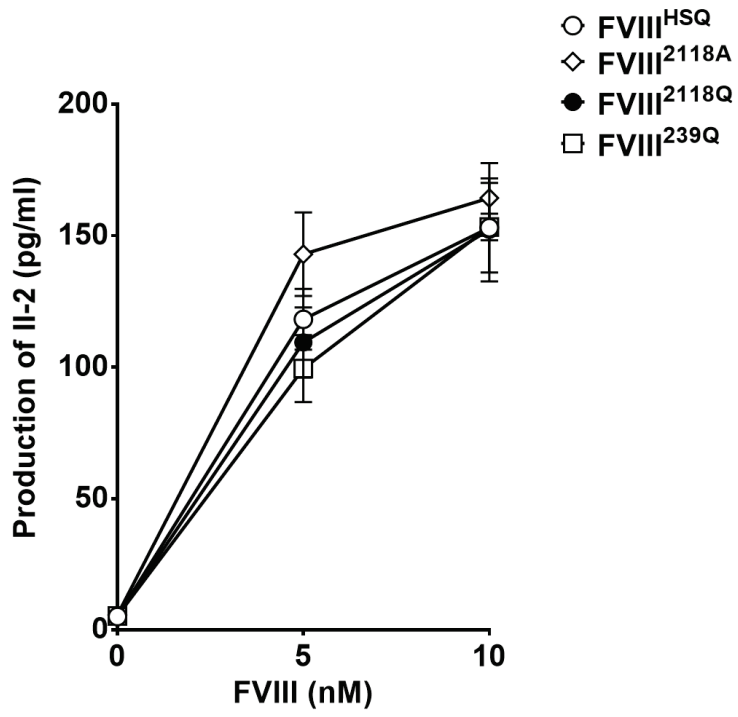
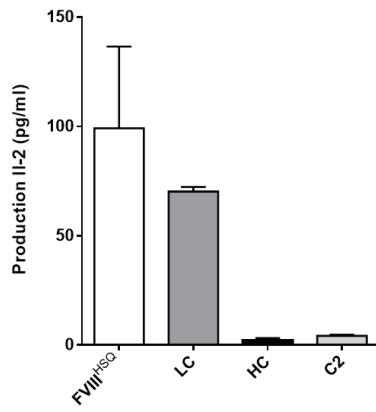


Figure 5

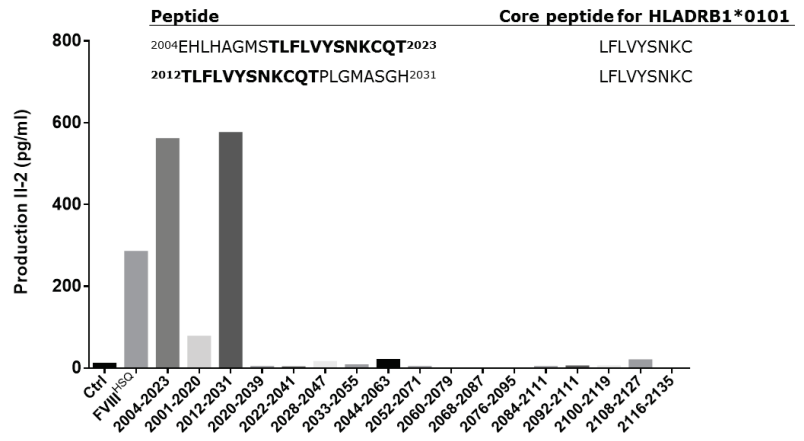


Supplementary Figure 1

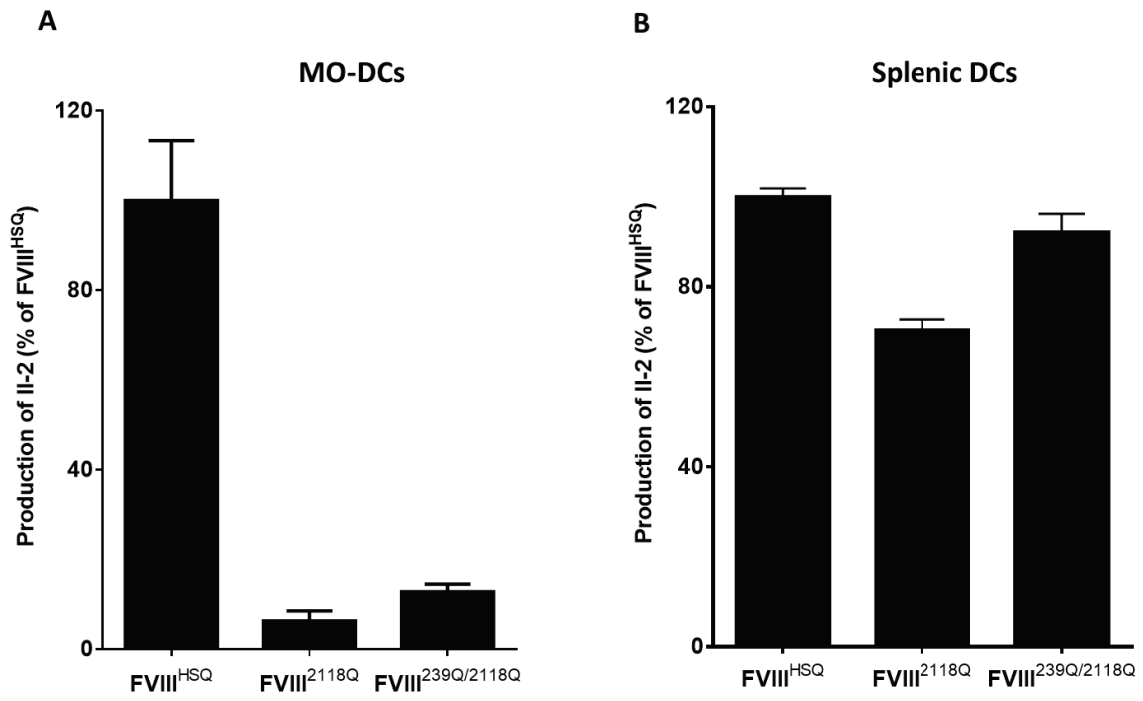
A



B



Supplementary Figure 2



III- L'inhibition de la tyrosine kinase de Bruton altère la réponse lymphocytaire B mémoire anti-FVIII chez la souris déficiente en FVIII

Le problème majeur du développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII chez les patients hémophiles A est la production d'IgG anti-FVIII inhibitrices. Après l'apparition d'inhibiteurs du FVIII, les patients hémophiles A suivent des protocoles d'induction de tolérance immunitaire (ITI) qui consistent en l'administration quotidienne de fortes doses de FVIII, sur une période allant de plusieurs mois à plusieurs années. Ces protocoles en plus d'être coûteux, affectent la qualité de vie du patient et ne fonctionnent que dans 60% à 80% des cas. Les mécanismes impliqués dans l'éradication des inhibiteurs sont mal connus, mais des facteurs associés au succès de l'ITI ont été identifiés tel qu'un pic de titre inhibiteur plus faible au cours des premières semaines de l'ITI (Hay et al., 2012). Les LB anti-FVIII naïfs et mémoires représentent une cible stratégique dans la prévention et l'éradication des inhibiteurs du FVIII (Hausl et al., 2004; Macauley et al., 2013). Comme évoqué en introduction (section III.3.3.4), la liaison de l'antigène au BCR des LB entraîne une cascade de signalisation impliquant la Bruton's tyrosine kinase (BTK). La BTK est une cible thérapeutique dans le traitement des proliférations lymphoïdes B malignes, mais aussi dans le cas de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé, ou la polyarthrite rhumatoïde (Puri et al., 2013), et de nombreux inhibiteurs de la BTK ont été développés (Hendriks et al., 2014).

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la possibilité de prévenir l'apparition de la réponse anti-FVIII, ou l'activation de la réponse mémoire anti-FVIII en bloquant la signalisation du BCR des LB par un inhibiteur de la BTK. Pour cela, j'ai utilisé un inhibiteur de la BTK récemment produit par la société Pfizer, le PF-06250112 qui inhibe la BTK par liaison covalente à la cystéine 481 située au niveau de son domaine kinase. Après avoir validé l'inhibition de l'activation des LB par le PF-06250112 *in vitro* et *in vivo*. J'ai étudié l'effet préventif de l'inhibition de la BTK par le PF-06250112 sur le développement des anticorps anti-FVIII. Pour cela, j'ai administré le PF-06250112 aux souris déficientes en FVIII par gavage. Les 4 injections de FVIII ont été réalisées 2 heures après le premier gavage hebdomadaire. En prenant en compte la demi-vie du PF-06250112 et du FVIII dans la circulation (7 et 8 heures respectivement), j'ai réduit le nombre de gavages à 5 par semaine (traitement PF-06250112 > 10 fois la $\frac{1}{2}$ vie du FVIII). J'ai ainsi observé que l'inhibition de la BTK par le PF-06250112 affecte les populations B spléniques sans pour autant réduire la réponse humorale anti-FVIII. J'ai par la suite étudié le potentiel thérapeutique du PF-06250112 dans un contexte où le BCR a une forte affinité pour

l'antigène : la réponse B mémoire. En effet, il a été démontré par Benson *et al* que si l'inhibition chronique de BTK a peu d'impact sur les réponses T dépendantes pour des Ag de faibles affinité pour le BCR, il a un effet plus important sur des réponses T dépendantes dans un contexte de forte affinité de l'Ag pour le BCR (Benson et al., 2014). J'ai donc étudié l'effet du PF-06250112 sur la réponse anti-FVIII chez des souris ayant développé une réponse humorale anti-FVIII. J'ai mis en évidence que l'inhibition de la BTK diminue significativement la synthèse d'IgG anti-FVIII lors d'une réponse mémoire. Afin de confirmer cette observation, j'ai adopté une seconde stratégie dans laquelle j'ai transféré des splénocytes déplétés en cellules CD138+ (plasmocytes) issus de souris sensibilisées au FVIII à des souris naïves. Le lendemain, les souris ont reçu une injection de FVIII 2 heures après le premier traitement au PF-06250112. Ce modèle m'a permis de m'affranchir de la présence de plasmocytes à longue durée de vie, et d'anticorps anti-FVIII circulants (Hausl et al., 2005). Deux semaines après transfert, j'ai observé une abrogation de la réponse mémoire anti-FVIII chez le groupe de souris traitées au PF-06250112 comparé au groupe de souris contrôle.

Mes résultats montrent que l'inhibition de la BTK n'empêche pas l'activation d'une réponse lymphocytaire B anti-FVIII naïves. Ces résultats confirment que la voie de la BTK n'est pas essentielle au développement d'une réponse naïve T-dépendante pour un antigène de faible affinité pour le BCR (Khan et al, 1995, Benson et al, 2014), ce qui est vraisemblablement le cas du FVIII lors de la première injection. En revanche, j'ai montré la possibilité de prévenir significativement l'augmentation de la synthèse d'IgG anti-FVIII dans le cadre d'une réponse secondaire en inhibant la BTK. Ainsi, l'inhibition de la BTK au cours des premières semaines d'ITI pourrait être une alternative thérapeutique intéressante pour augmenter les chances de réussite de l'ITI, puisqu'il semble qu'une réponse inhibitrice plus faible (c'est à dire une réponse B-mémoire plus faible) au début de l'ITI augmente les chances d'induction de tolérance.

Inhibition of the Bruton's tyrosine kinase alters the anti-FVIII memory B-cell response in mice with severe hemophilia A

Sandrine Delignat, Jules Russick, Bagirath Gangadharan, Mathieu Ing, Srinivas V Kaveri, Sébastien Lacroix Desmazes

Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S 1138, Paris, F-75006 France; Université Paris Descartes, UMR S 1138, Paris, F-75006 France; INSERM, U1138, Paris, F-75006 France

Corresponding author: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France - Tel: 01 44 27 82 02 - Fax: 01 44 27 81 93. Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count for text: 1887

Word count for abstract: 244

Number of figures: 3

Number of tables: 0

Number of references: 20

Abstract

Background. Hemophilia A is a rare hemorrhagic disorder due to the lack of functional pro-coagulant factor VIII (FVIII). Upon FVIII replacement therapy, 30% of severe hemophilia A patients develop inhibitory anti-FVIII IgG. Immune tolerance induction (ITI) upon daily injection of large amounts of FVIII is to date the only treatment to eradicate FVIII inhibitors. It is efficient in only 60-80% of the patients. Recently, the success of ITI was associated with a lower recall humoral response at the beginning of the treatment.

Objectives. We evaluated whether blocking B-cell receptor (BCR) signalisation by the inhibition of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) reduces the anti-FVIII immune response in a mouse model of severe hemophilia A.

Methods. A new highly selective inhibitor of BTK, (R)-5-amino-1-(1-cyanopiperidin-3-yl)-3-(4-[2,4-difluorophenoxy] phenyl)-1H pyrazole-4-carboxamide (PF-06250112) was administered to FVIII-deficient mice by gavage to inhibit BCR signaling. A preventive 4-weeks treatment of naive mice was first evaluated. We also assessed the efficiency of BTK inhibition on ongoing anti-FVIII immune responses in FVIII-sensitized mice and on the differentiation of adoptively-transferred memory B cells.

Results. Inhibition of BTK during the initiation phase of the anti-FVIII immune response did not prevent the occurrence of anti-FVIII antibodies in mice. However, the anti-FVIII memory B-cell response was drastically reduced in PF-06250112-treated mice as compared to untreated mice.

Conclusion. We propose that the inhibition of BTK using PF-06250112 at the time of initiation of ITI may prevent the reactivation of FVIII-specific memory B cells and increase the chances for ITI success.

Introduction

Hemophilia A is a rare X-linked hemorrhagic disorder characterized by a deficiency in factor VIII (FVIII). Bleedings are managed by the administration of exogenous therapeutic FVIII, which restores coagulation. However, in up to 30% of patients, replacement therapy is complicated by the development of a T-cell-dependent immune response, leading to the production of anti-FVIII IgG, referred to as “inhibitors”, that neutralize FVIII pro-coagulant activity. In inhibitor-positive patients, two strategies are used to eradicate inhibitors. Immune tolerance induction (ITI), that relies on repeated injections of high-dose FVIII, is a costly protocol, requiring compliance from the patients and efficient in 60-80% of the patients [1]. Alternatively, depletion of B cells with the anti-CD20 antibody Rituximab can be used [2]. This strategy is however less efficient and not specific for FVIII. The mechanisms of action of ITI include the inhibition of the FVIII-specific memory B-cell response by elevated doses of FVIII, as demonstrated in a mouse model of severe hemophilia A [3]. Several factors have also been associated with ITI success, in particular the inhibitor peak titer reached after initiation of ITI [4].

Naive B cells and FVIII-specific memory B cells are potential targets to prevent the development of [5] or eradicate existing [6] anti-FVIII antibodies. Engagement of the surface exposed B-cell receptor (BCR) by its cognate antigen leads to the formation of an intracellular signaling complex which enhances downstream signaling through the phosphorylation and ubiquitination of cellular proteins. The Bruton’s tyrosine kinase (BTK) is a key proximal component of this signaling cascade that regulates B-cell activation, proliferation and survival [7]. This cytosolic Tec kinase is activated when BCR signaling promotes its recruitment at the inner cell membrane. Activated BTK then phosphorylates the phospholipase C γ 2, which leads to the downstream production of inositol triphosphate and diacylglycerol, resulting in calcium flux, and finally to the activation of NF- κ B and NFAT-dependent pathways [8]. BTK thus

appears as a strategic therapeutic target in B-cell malignancies, but also in autoimmune diseases associated with the presence of pathogenic autoantibodies such as rheumatoid arthritis or lupus [9]. Several small-molecule inhibitors of BTK have been developed [10]. PF-06250112 has recently been described as a potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitor of BTK. PF-06250112 forms a covalent but reversible adduct with BTK through binding to a cysteine residue (Cys481) proximal to the ATP-binding pocket [11].

Here, we evaluated the therapeutic potential of BTK inhibition by PF-06250112 on the development of the anti-FVIII immune response, and on the FVIII-specific memory B-cell response in FVIII-deficient mice.

Material and methods

Formulation of the drug

For *in vitro* studies, PF-06250112 (Pfizer, New York, NY, USA) was solubilized at 1 mg/ml in dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). For *per os* administration, PF-06250112 was prepared in 0.5% of methylcellulose, 0.5% of hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate H grade, “Fine particule size” and 20 mM Tris at pH 7.4.

Treatment of FVIII-deficient mice

Exon 16 FVIII-deficient mice on C57Bl/6 background (gift from Prof H.H. Kazazian, Department of Genetics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia) were used at 7-11 weeks old. Animals were handled in agreement with ethical authority guidelines (authorization #23BA53). FVIII-deficient mice were fed for 5 consecutive days every week with PF-06250112 or vehicle. For the preventive use, mice were injected intravenously with 0.5 µg of human recombinant FVIII (Refacto, Pfizer) once a week, 2 hours after the first feeding of PF-06250112, for 4 weeks. Mice were bled 5 days after the third and/or fourth injections of FVIII, and sacrificed 5 days after the fourth injection. For adoptive transfer experiments,

splenocytes from mice injected intravenously once a week for 4 weeks with 1 µg of human recombinant FVIII or from naive mice, were isolated by mechanical dilaceration. After lysis of erythrocytes, plasma cells were depleted using a goat anti-mouse CD138 polyclonal antibody (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), conjugated to anti-goat IgG coated Dynabeads (Thermofisher, Waltham, MA, USA) as previously described [6]. Naive FVIII-deficient mice were then injected intravenously with $10 \cdot 10^6$ CD138-depleted splenocytes in 200 µl saline buffer. Feeding of adoptively transferred mice with PF-06250112 was initiated the day after and 1 µg of human recombinant FVIII or PBS were injected intravenously 2 hours after the first feeding. Mice were bled 7 days and 14 days after the injection of FVIII.

Flow cytometric analysis

For drug validation, splenocytes were labelled with anti-CD86-FITC (Clone GL1, BD Pharmingen), and anti-B220-PE (Clone RA3-6BE, Biolegend, San Diego, CA, USA). For phenotypic analysis, anti-CD4-Alexa 700 (clone GK1.5, Biolegend), anti-CD19-Pacific Blue (Clone 6D5, Biolegend), anti-CD45-APC (Clone 30-F11, eBiosciences); anti-CD3e-FITC (Clone 145-2C11, BD Pharmingen), anti-CD11b-PE (Clone M1/70, BD Pharmingen), anti-CD21-APC Cy7 (clone 7E9), anti-CD23-PE Cy7 (clone B3B4) and anti-GL7 Alexa 488 (clone GL7) from Biolegend were used. In all the cases, cells were labeled with the fixable viability dye eFluor 506 (eBiosciences, Santa Clara, USA). FACS analysis were done on live cells using BD LSR II and FACSDiva software.

Evaluation of the anti-FVIII immune response

Anti-FVIII IgG in mouse serum were measured by ELISA and FVIII inhibitory titers were measured with a chromogenic assay (Siemens, Marburg, Germany), as previously described [12]. For proliferation assays, splenocytes were incubated in 96-well plates ($0.25 \cdot 10^6$ cells/well) with increasing concentrations of concanavalin A (Sigma) or recombinant FVIII for 72 hours,

as described [13]. Cell proliferation was measured by incorporation of [³H]-thymidine (0.5 µCi/well) for an additional 18 hours, using a beta counter (Microbeta 1450, Perkin Elmer).

Results and discussion

BCR engagement initiates an intracellular signaling cascade that induces BTK-dependent activation of B cells [7]. We first confirmed the inhibitory effect of PF-06250112 on BCR-mediated B-cell activation. Pre-treatment of purified splenic B cells by PF-06250112 prevented in a dose-dependent manner the induction of CD86 expression on B cells following incubation with anti-IgM F(ab')₂ fragments (Figure 1A). It however marginally impacted CD86 expression upon stimulation with an anti-CD40 antibody. The calculated IC₅₀ was 1.1±0.6 nM (data not shown), which is in agreement with a previous observation [11]. Similarly, treatment of mice with PF-06250112 2 hours prior to the injection of anti-IgD antisera prevented anti-IgD-mediated CD86 induction, as measured by *ex vivo* analysis (Figure 1B), and only marginally affected anti-CD40-mediated CD86 induction. A dose of 15 mg/kg of PF-06250112 was sufficient to prevent induction of CD86 expression in the mice. Of note, the poor CD86 induction observed following anti-IgD stimulation may reflect the fact that splenic B cells from C57Bl/6 mouse are less prone to stimulation than that of Balb/c mice [14].

We then investigated the potential of PF-06250112 to prevent the development of an anti-FVIII immune response in FVIII-deficient mice. Mice were fed with 15 mg/kg of PF-06250112, 5 days a week during 4 weeks, and injected intravenously with FVIII on the second day of feeding. Such a schedule in mice covers about 10 FVIII half-lives [15], the half-life of PF-06250112 being 7 hours [11]. Four weeks of inhibition of BTK with PF-06250112 resulted in an increase in CD11b-positive cells (P=0.040, Figure 2A), which include monocytes, macrophages and natural killer cells, and in a significantly decrease in CD4+ T cells (P=0.031) and in different B-cell subsets namely, follicular and marginal zone B cells (P=0.038, Figure 2B), as reported [11,16]. In contrast to a previous report [11], the chronic administration of PF-

06250112 did not affect germinal center B cells, possibly owing to the use of a different antigen and of a different disease model. A modulation of splenic T cells in BTK-deficient mice has not been reported [7]. PF-06250112 is 10,000-fold more specific for BTK than for ITK (interleukin-2-inducible T cell kinase) [11]. Thus, the decrease in the T-cell percentage may not reflect a direct effect of PF-06250112 on T cells, but rather a modulation of T-cell homeostasis consecutive to a decrease in splenic follicular and marginal zone B cells. The anti-FVIII IgG titers in PF-06250112-treated mice (565 ± 170 AU, mean \pm SEM, Figure 2C) were not statistically different from that in vehicle-treated mice (1133 ± 376 AU). Similarly, inhibitory titers did not differ between PF-06250112-treated mice (123 ± 88 , Figure 2D) and control mice (457 ± 219). Accordingly, the proliferation of splenic T cells in the presence of FVIII was similar for the two groups of mice (Figure 2F). A marginally slower increase in anti-FVIII IgG titers was observed in PF-06250112-treated mice between the third and fourth weeks of treatment as compared to control mice (Figure 2E). Taken together, the data suggest that inhibiting BTK during the primary immune response does not prevent the onset of the anti-FVIII IgG response in FVIII-deficient mice. This is in agreement with the fact that the invalidation or inhibition of BTK has been reported to block immune responses to T-dependent antigens merely when the BCR has a strong affinity for the target antigen [7,16].

The BCR of memory B cells is known for a strong affinity for its cognate antigen [17]. The rare human monoclonal anti-FVIII IgG studied to date, obtained following immortalization of memory B cells from inhibitor-positive patients, presents with high affinity for FVIII (Kd of 10^{-11} M⁻¹, in the case of BO2C11) [18]. Accordingly, the apparent affinity of circulating polyclonal IgG of inhibitor-positive patients was estimated to range from 10^{-9} to 10^{-12} M⁻¹ [19]. We thus hypothesized that inhibition of BTK may be more efficient in preventing the activation of FVIII-specific B cells in the context of a recall response to the antigen. To test this hypothesis, mice were injected with FVIII once a week for four weeks, and then left untouched

for 90 days to allow the spontaneous elimination of FVIII-specific short-lived plasmocytes [20]. FVIII-sensitized mice were then fed with vehicle or PF-06250112 at 15 mg/kg, five consecutive days per week for 2 weeks. Mice received one FVIII injection 2 hours after the first feeding. Anti-FVIII IgG titers were measured 7 and 14 days after the injection of FVIII, and for each individual mouse, were normalized according to the initial levels, measured before FVIII injection (Figure 3A). Feeding mice with PF-06250112 drastically dampened the increase of anti-FVIII IgG titers, as compared to control mice ($P=0.045$, Figure 3B). Further, splenocytes from FVIII-treated mice or naive mice were depleted of CD138-positive plasmocytes and adoptively transferred to naive FVIII-deficient mice [6]. Feeding of the recipient mice with PF-06250112 or vehicle was initiated on the next day, and one injection of FVIII was performed 2 hours after the first feeding. This alternative model allows studying the effect of PF-06250112 in the absence of long-lived plasmocytes and circulating anti-FVIII IgG. The treatment of mice with PF-06250112 prevented the production of anti-FVIII IgG as compared to control mice (1.0 ± 0.3 versus 124.0 ± 115.7 , $P=0.010$). Anti-FVIII IgG titers of PF-06250112-treated mice were similar to that of control mice (adoptively transferred with splenocytes from naive or FVIII-sensitized mice, injected or not with FVIII). Recently, the suppression of memory B-cell clonal expansion and of the antibody-secreting cell burst was observed upon BTK neutralization in the case of phycoerythrin used as a model T-dependent antigen [16]. Our results show that BTK inhibition is able to prevent the memory B-cell response in the case of a therapeutic protein such as FVIII.

We propose that our result may be relevant in the context of ITI. Indeed, the intensity of the peak inhibitory titer during ITI, which generally occurs within the two weeks that follow ITI initiation, is inversely correlated to ITI success [4]. Inhibition of BTK-dependent BCR signaling as an adjunct therapy in patients starting ITI could increase the chances for ITI success by preventing the reactivation of FVIII-specific memory B cells.

Acknowledgements

This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by a grant from Pfizer (Aspire Haemophilia research award 2014 WI185623). JR and MI were recipients of fellowships from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. PF-06250112 was a gift from Pfizer. BO2C11 and mAb6 were gifts from JM Saint-Remy and M Jacquemin (CMVB, KUL, Belgium). We would like to acknowledge Carole Lasne for technical assistance and the Centre d'Explorations Fonctionnelles (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for technical support.

Authors' contributions

Designed research: SD, BG

Performed research: SD, JR, BG, MI

Analyzed data: SD, JR, SVK, SLD

Wrote the paper: SD, SLD

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Coppola A, Di Minno MND, Santagostino E. Optimizing management of immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A and inhibitors: towards evidence-based approaches. *Br J Haematol* 2010; **150**: 515–28.
- 2 Leissinger C, Josephson CD, Granger S, Konkle BA, Kruse-Jarres R, Ragni MV, Journeycake JM, Valentino L, Key NS, Gill JC, McCrae KR, Neufeld EJ, Manno C, Raffini L, Saxena K, Torres M, Marder V, Bennett CM, Assmann SF. Rituximab for treatment of inhibitors in haemophilia A. A Phase II study. *Thromb Haemost* 2014; **112**: 445–58.
- 3 Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, Doering CB, Lollar P, Richter G, Schwarz HP, Turecek PL, Reipert BM. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* 2005; **106**: 3415–22.
- 4 Hay CRM, DiMichele DM, International Immune Tolerance Study. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 2012; **119**: 1335–44.
- 5 Macauley MS, Pfrengle F, Rademacher C, Nycholat CM, Gale AJ, von Drygalski A, Paulson JC. Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. *J Clin Invest* 2013; **123**: 3074–83.
- 6 Hausl C, Ahmad RU, Schwarz HP, Muchitsch EM, Turecek PL, Dorner F, Reipert BM. Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood* 2004; **104**: 115–22.
- 7 Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G, Davidson L, Müller S, Kantor AB, Herzenberg LA. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 1995; **3**: 283–99.
- 8 Antony P, Petro JB, Carlesso G, Shinnors NP, Lowe J, Khan WN. B-cell antigen receptor activates transcription factors NFAT (nuclear factor of activated T-cells) and NF-kappaB (nuclear factor kappaB) via a mechanism that involves diacylglycerol. *Biochem Soc Trans* 2004; **32**: 113–5.
- 9 Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, Li S, Pan Z, Thamm DH, Miller RA, Buggy JJ. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 13075–80.
- 10 Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 219–32.
- 11 Rankin AL, Seth N, Keegan S, Andreyeva T, Cook TA, Edmonds J, Mathialagan N, Benson MJ, Syed J, Zhan Y, Benoit SE, Miyashiro JS, Wood N, Mohan S, Peeva E, Ramaiah SK, Messing D, Homer BL, Dunussi-Joannopoulos K, Nickerson-Nutter CL, et al. Selective inhibition of BTK prevents murine lupus and antibody-mediated glomerulonephritis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013; **191**: 4540–50.
- 12 Delignat S, Dasgupta S, André S, Navarrete A-M, Kaveri SV, Bayry J, André M-H, Chtourou S, Tellier Z, Lacroix-Desmazes S. Comparison of the immunogenicity of

- different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica* 2007; **92**: 1423–6.
- 13 Dimitrov JD, Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S, Repesse Y, Meslier Y, Planchais C, Teyssandier M, Motterlini R, Bayry J, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 2010; **115**: 2682–5.
 - 14 Pellegrini A, Guiñazú N, Aoki MP, Calero IC, Carrera-Silva EA, Girones N, Fresno M, Gea S. Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *Int Immunol* 2007; **19**: 1395–402.
 - 15 Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, Sakorafas P, Fraley C, Drager D, Reidy T, McCue J, Franck HWG, Merricks EP, Nichols TC, Bitonti AJ, Pierce GF, Jiang H. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood* 2012; **119**: 3024–30.
 - 16 Benson MJ, Rodriguez V, von Schack D, Keegan S, Cook TA, Edmonds J, Benoit S, Seth N, Du S, Messing D, Nickerson-Nutter CL, Dunussi-Joannopoulos K, Rankin AL, Ruzek M, Schnute ME, Douhan J. Modeling the clinical phenotype of BTK inhibition in the mature murine immune system. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014; **193**: 185–97.
 - 17 Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**: 149–59.
 - 18 Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, Vander Elst L, Hoylaerts MF, Bakkus M, Thielemans K, Arnout J, Peerlinck K, Gilles JG, Vermynen J, Saint-Remy JM. Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* 1998; **92**: 496–506.
 - 19 Hofbauer CJ, Kepa S, Schemper M, Quehenberger P, Reitter-Pfoertner S, Mannhalter C, Reipert BM, Pabinger I. FVIII-binding IgG modulates FVIII half-life in patients with severe and moderate hemophilia A without inhibitors. *Blood* 2016; **128**: 293–6.
 - 20 Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**: 160–71.

Legends to figures

Figure 1. Inhibition of splenic B-cell activation by PF-06250112. Panel A. Splenic B cells from C57Bl/6 mice, purified by negative selection using the Pan B cell Isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) were plated ($2 \cdot 10^6$ cells/ml) in RPMI, 10% FCS and treated with PF-06250112 or vehicle (DMSO) for 2 hours. F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse IgM (10 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) or a monoclonal hamster anti-mouse CD40 (5 µg/ml, clone HM40-3, BD Pharmingen) were added. After 24 hours, expression of CD86 by alive B220-positive cells was analyzed by flow cytometry. Results are representative of two independent experiments performed in triplicates (mean±SD). Panel B. C57Bl/6 mice were fed with PF-06250112 or vehicle. After 2 hours, goat anti-IgD antisera (400 µl, eBiosciences), or rat anti-mouse CD40 (100 µg, clone 1C10, Biolegend), were injected intraperitoneally. Eighteen hours later, mice were sacrificed and the expression of CD86 by alive splenic B220-positive B cells was analyzed by flow cytometry. Representative of two independent experiments performed with 3 mice per group (mean±SD).

Figure 2. Treatment with PF-06250112 does not prevent the onset of a primary anti-FVIII immune response. Panel A and B. FVIII-deficient mice were fed for 5 days a week, during 4 weeks with PF-06250112 (15 mg/kg) or vehicle, and injected with FVIII (0.5 µg Refacto) once a week, 2 hours after the first feeding of the week. Mice were sacrificed 5 days after the last injection of FVIII. The isolated splenocytes were labeled with anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD3 and anti-CD4 antibodies (% of live CD45-positive cells, Panel A). Follicular B cells (Fo) were identified as CD19⁺CD23^{high}CD21^{low}, marginal zone B cells (MZ) as CD19⁺CD21^{high}CD23^{low}, germinal center B cells (GC) as CD19⁺GL7⁺ (% of live cells, Panel B). Data are representative of 2 independent experiments with 9 mice per group, and depict mean±SEM. Panels C, D and E. After 4 weeks of treatment with PF-06250112 or vehicle and FVIII, the anti-FVIII IgG titers (panel C) and inhibitory titers (panel D) were measured in the

serum of the mice by ELISA with the mouse monoclonal anti-FVIII IgG mAb6 as a standard, and chromogenic assay, respectively. The evolution of anti-FVIII IgG titers between the 3rd (day 26) and 4th (day 33) injections of FVIII is depicted on Panel E. Data are representative of 2 independent experiments with 9 mice per group. The two lines depict the means of each group at each time point (vehicle: dotted line; PF-06250112: full line). Panels F and G. Splenocytes (2.5×10^5 cells/well) from mice treated with vehicle or PF-06250112 (15 mg/kg) for 4 weeks were incubated for 72 hours with FVIII (panel F) or with concanavalin A (ConA, panel G). The incorporation of tritiated thymidine is depicted as count per minute (CPM) after an additional 18 hours of incubation (9 mice per group, mean \pm SEM). Statistical differences were assessed with the two-tailed Mann-Whitney test (ns: not significant).

Figure 3. Treatment with PF-06250112 controls the anti-FVIII memory B-cell response.

Panels A and B. FVIII-deficient mice were injected with FVIII once a week for 4 weeks. After 90 days, the levels of anti-FVIII IgG were assessed by ELISA using the mouse monoclonal anti-FVIII antibody, mAb6 as a standard (Panel A). Mice were then randomly attributed to two groups and were fed for two weeks 5 days a week, with either PF-06250112 (15mg/kg) or the vehicle. Levels of anti-FVIII IgG 7 and 14 days after a final FVIII injection were normalized with respect to the initial levels of anti-FVIII IgG of each respective mouse (Panel B). Results depict mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA, using the Bonferroni post-test. Panel C. CD138-depleted splenocytes ($10 \cdot 10^6$ cells/mouse) from FVIII-treated or naive hemophilic mice were adoptively transferred to naive FVIII-deficient mice. From the next day onwards, host FVIII-deficient mice were fed during 2 weeks with 15 mg/kg of PF-061250112 or vehicle, daily for 5 days. A control group consisted in mice adoptively transferred with CD138-depleted splenocytes from naive FVIII-deficient mice. Mice were

injected with FVIII or PBS once a week for 4 weeks. Statistical differences were assessed with the two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 1

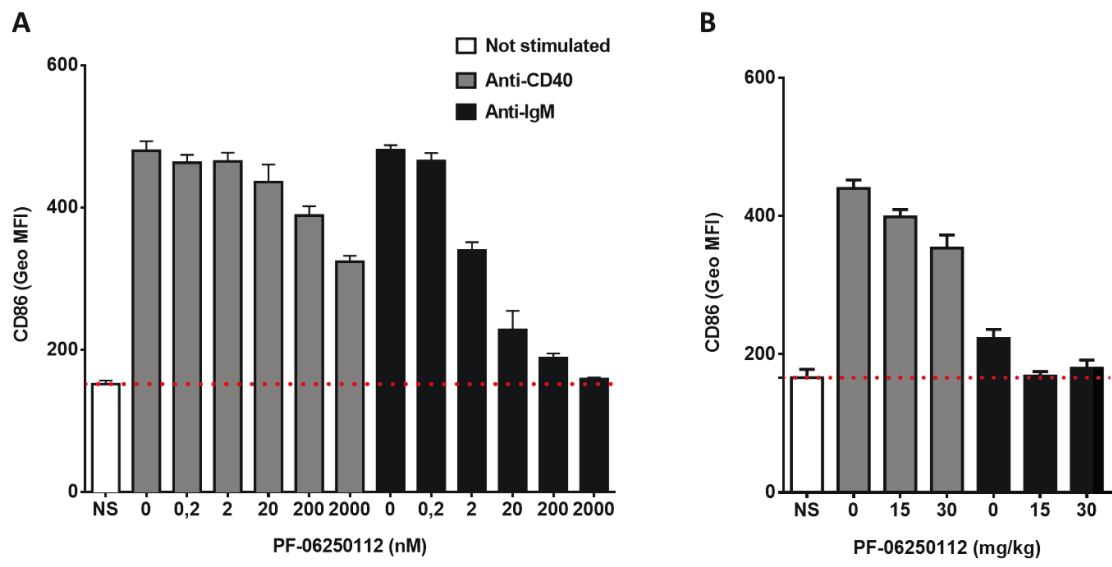


Figure 2

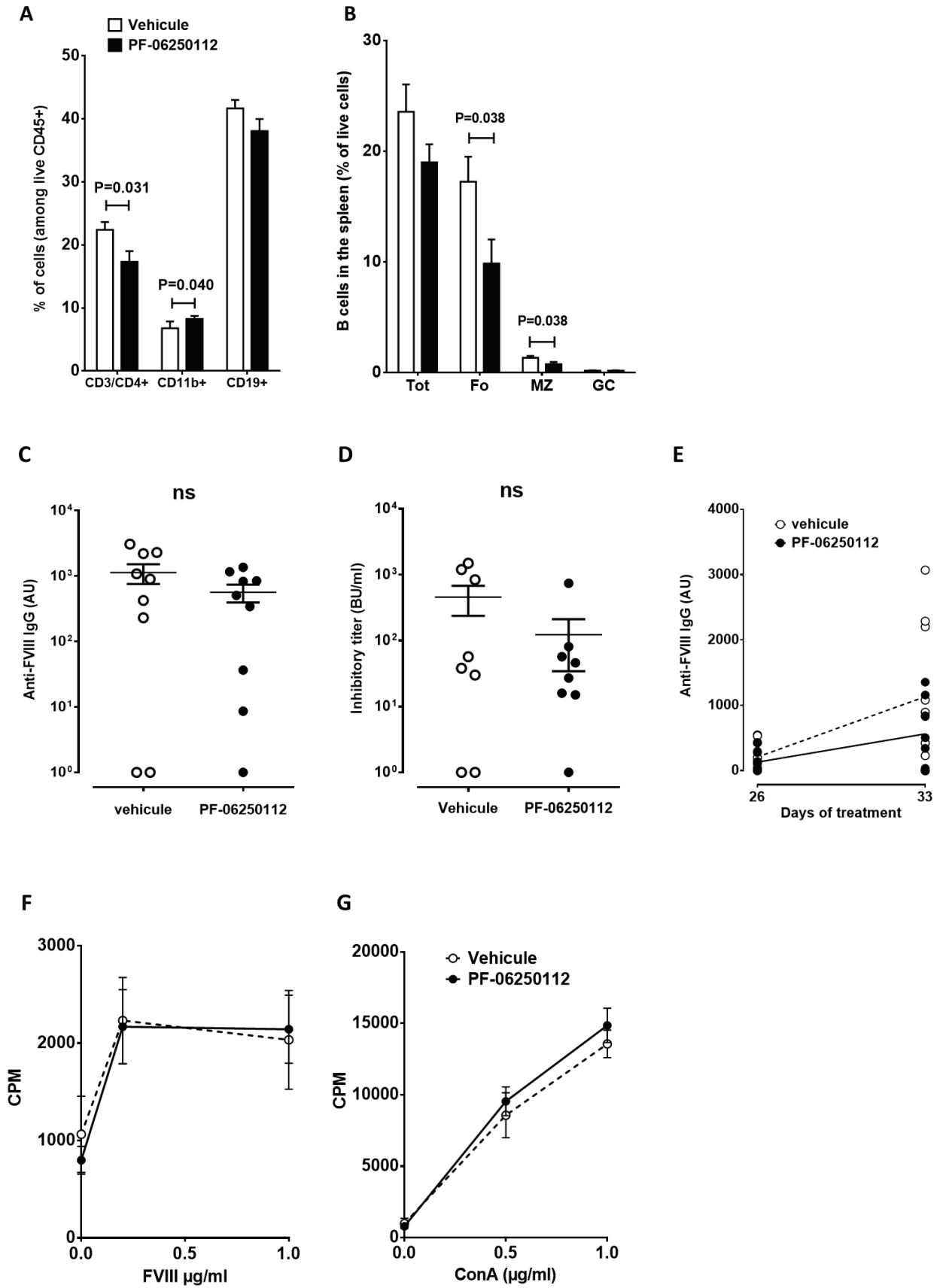
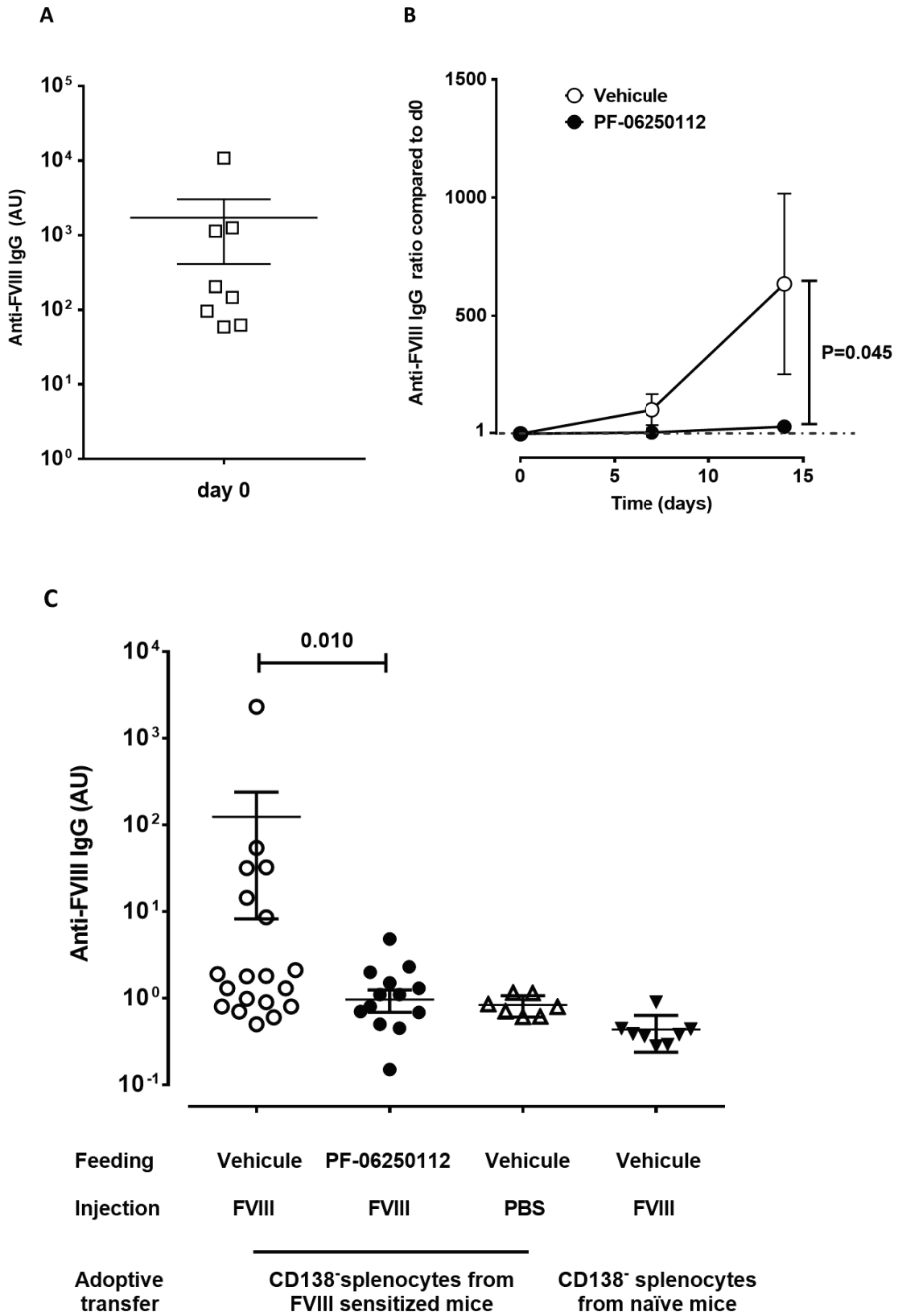


Figure 3



DISCUSSION

L'apparition d'une réponse immunitaire spécifique du FVIII demeure la complication la plus redoutée chez le patient hémophile A. La neutralisation du FVIII par les anticorps inhibiteurs mène à une impasse thérapeutique. Actuellement, il n'existe pas de stratégie thérapeutique pour contrer l'apparition de cette réponse immunitaire. Différentes méthodologies visant à empêcher l'apparition de cette réponse, et décrites en introduction (section IV.4.2), ont été élaborées et testées dans un modèle préclinique. Elles ciblent soit directement un acteur de la réponse immunitaire, soit indirectement l'émergence de cellules T régulatrices par manipulation du système immunitaire. Seules des stratégies « curative » après apparition de l'inhibiteur sont actuellement proposées au patient. Il s'agit d'un protocole d'ITI qui repose sur l'injection répétée de fortes doses de FVIII thérapeutique sur une longue période, ou d'un protocole de déplétion des LB par l'anticorps anti-CD20 Rituximab. Ces deux stratégies présentent néanmoins des limites. L'ITI, en plus d'être extrêmement coûteuse, est contraignante pour le patient. La thérapie par Rituximab a le désavantage de ne pas cibler spécifiquement la réponse anti-FVIII, mais tous les LB, sans altérer les plasmocytes, responsables de la sécrétion d'inhibiteurs. Aussi, durant ma thèse, j'ai eu pour objectif de développer deux méthodologies thérapeutiques différentes. D'une part, j'ai exploré la possibilité de prévenir l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII en jouant sur la structure du FVIII afin d'empêcher l'endocytose et l'apprêtement antigénique du FVIII par les CPAs (article 2). En amont de ce travail, j'ai mis en place des outils nécessaires à l'analyse de prédiction de l'immunogénicité du FVIII sauvage et muté (article 1). D'autre part, j'ai étudié le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la BTK, molécule impliquée dans la signalisation du BCR des LB, sur la réponse immunitaire anti-FVIII chez la souris hémophile A (article 3).

I- Prévention de l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII par modification de la structure du FVIII

Précédemment, il avait été montré au laboratoire que les deux structures exposant des mannoses au niveau des Asparagines 239 et 2118 sont impliquées dans la capture et l'apprêtement antigénique du FVIII par un modèle de CPA humaine, les MO-DCs (Dasgupta et al., 2007b). La présence de glycanes exposant des mannoses est inhabituelle pour des protéines sécrétées. Lee *et al* ont récemment montré par spectrométrie de masse que la signature glycomique des protéines diffère selon leur localisation intra ou extra-cellulaire (Lee et al., 2014). De manière générale, les protéines sécrétées présentent des structures complexes hautement fucosylées et sialylées, tandis que les protéines membranaires exposent des structures hybrides composées

de chaînes oligosaccharidiques hautement mannosylées, et peu sialylées et fucosylées. Enfin, les protéines intracellulaires présentent une majorité de structures hautement mannosylées, qui ont subi peu ou pas de processus de maturation. Ainsi a-t-il été suggéré que la libération de glycoprotéines intracellulaires hautement mannosylées pouvait constituer un signal de danger lors de lésions tissulaires, au cours desquelles les récepteurs de la famille lectines de type C exprimés à la surface des CPAs pourraient reconnaître ces structures et initier la réponse du système immunitaire (Lee et al., 2014; Rachmilewitz, 2010). Comme indiqué en introduction (section III.3.1.4), le fait que le FVIII seul ne soit pas capable d'induire la maturation des MO-DCs exclut la possibilité que l'exposition des glycanes hautement mannosylés en 239 et 2118 soit à l'origine du signal de danger impliqué dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII (Pfistershammer et al., 2006). Néanmoins, ces structures sont reconnues par des récepteurs lectines de type C tels que le CD206, exprimés par différentes sous-population de DC et de macrophages (Dasgupta et al., 2007b), et le CLEC4M, exprimés par les cellules endothéliales sinusoidales (Rydz et al., 2013). A ce jour, le CD206 est le seul récepteur d'endocytose identifié capable de mener le FVIII à l'apprêtement antigénique par les MO-DCs (Dasgupta et al., 2007b; Navarrete et al., 2010). J'ai donc au cours de ma thèse généré des mutants du FVIII dépourvus de glycosylations en 239 et/ou 2118 par mutagenèse dirigée, afin d'abroger la capture et l'apprêtement antigénique du FVIII par les CPAs, et réduire ainsi l'immunogénicité du FVIII thérapeutique.

I.1- Maintien de l'activité pro-coagulante du FVIII après élimination des glycosylations en 239 et 2118

La base de données HAMSTeRS qui recouvre toutes les mutations du gène *F8* conduisant à l'hémophilie A comporte 580 mutations ponctuelles au sein des 1384 acides aminés du FVIIIa. Cette observation montre la relation étroite entre la structure et la fonction de la protéine FVIII. De plus, les modifications post-traductionnelles telles que les N-glycosylations pouvant jouer un rôle dans le repliement, la sécrétion, la stabilité, et la fonction des protéines (Sinclair and Elliott, 2005), il était essentiel de valider la fonction pro-coagulante du FVIII muté en Asn239Gln et/ou Asn2118Gln, de même que sa demi-vie. Ainsi, avons-nous montré que l'élimination des glycosylations en 239 et 2118 n'affecte pas l'activité pro-coagulante du FVIII lorsqu'il est exprimé de manière endogène chez la souris hémophile A. Par ailleurs, l'observation d'une activité spécifique et d'une capacité de liaison au VWF similaires des FVIII mutés en 239 et/ou 2118 comparé au FVIII sauvage a confirmé que l'élimination des

glycosylations sur ces sites n'affecte pas la structure macromoléculaire du FVIII. Cependant, l'élimination de la glycosylation en 239 a entraîné une diminution significative de la production du FVIII comparé au FVIII sauvage ou muté en 2118, qu'il soit produit de façon endogène ou par des lignées cellulaires *in vitro*. De manière intéressante, il a récemment été décrit dans le cas du FVIII recombinant produit par des cellules humaines que la chaîne oligosaccharidique en 2118 se termine toujours par des mannoses, tandis que celle située en position 239 présente des structures hybrides (Kannicht et al., 2013). La présence d'oligosaccharides hautement mannosylés n'ayant pas subi d'étapes de maturation peut refléter le manque d'accessibilité de ce site aux glycosidases et glycosyltransférases du RE et de l'appareil de Golgi (Lee et al., 2014). Cette observation pourrait donc suggérer que le site de glycosylation sur l'Asn2118 est moins accessible que le site de glycosylation sur l'Asn239. L'observation d'une réduction de production du FVIII, suite à l'élimination de la glycosylation en 239, et dans une moindre mesure à celle de la glycosylation en 2118, suggère que la N-glycosylation en 239 pourrait être nécessaire au repliement correct de la chaîne polypeptidique FVIII, ou jouer un rôle dans la sécrétion du FVIII via l'interaction avec la protéine LMAN1.

En outre, l'élimination des glycosylations en 239 et 2118 n'altère pas la demi-vie du FVIII chez la souris hémophile A comparé au FVIII sauvage. Aussi, bien qu'il ait été montré que le FVIII seul, non complexé au VWF, interagit avec le CD206, le CLEC4M et la galectine-1 via ces deux structures hautement mannosylées (Dasgupta et al., 2007b; O'Sullivan et al., 2016; Rydz et al., 2013), ces interactions ne semblent pas jouer de rôle dans la clairance du FVIII en présence de VWF.

I.2- L'élimination de la glycosylation en 2118 abroge l'apprêtement antigénique du FVIII par les MO-DCs

L'immunogénicité des mutants Asn239Gln et Asn2118Gln a d'abord été évaluée *in vitro*, dans un modèle développé au cours de l'étude 1. Afin de prédire l'immunogénicité d'un nouveau FVIII thérapeutique (RefactoAF), j'ai produit un hybridome T murin spécifique du FVIII, restreint au HLA-DRB1*0101. Cet hybridome présente l'avantage par rapport à un clone T humain d'être « flexible », car il peut être activé par des MO-DCs issues de donneurs HLA-DRB1*0101, ou des CPAs murines isolées à partir de souris exprimant le HLA-DRB1*0101. A noter, que l'hybridome 1G8-A2 utilisé dans ces expériences reconnaît un épitope situé dans le domaine C1 du FVIII (cœur peptidique ²⁰¹³LFLVYSNKC²⁰²¹) distant de l'Asn2118. Bien que le risque de développer des inhibiteurs n'ait pas été associé à l'allèle HLA-DRB1*0101, l'épitope reconnu par cet hybridome T est également un épitope reconnu par les LT anti-FVIII

chez la souris hémophile A transgénique pour le HLA-DRB1*1501, allèle associé au risque de développer des inhibiteurs (Hay et al., 1997; Oldenburg et al., 1997; Steinitz et al., 2012). L'étude de prédiction d'immunogénicité du Refacto AF a montré que l'avantage d'un tel modèle est qu'il permet d'observer l'apprêtement antigénique du FVIII par les CPAs avec des concentrations de FVIII plus faibles et plus proches des doses thérapeutiques que les concentrations utilisées dans un test d'endocytose. Dans ce modèle expérimental, l'élimination de la glycosylation en 2118 s'est révélée suffisante pour abroger la présentation du FVIII par les MO-DCs aux LT, tandis que l'élimination de la glycosylation en 239 n'a réduit que modérément l'activation des LT par les MO-DCs. Ces résultats sont surprenants d'autant que la pré-incubation des MO-DCs avec le mannane n'inhibait pas complètement l'activation des LT ($\geq 80\%$). Nous avons néanmoins confirmé ces résultats en utilisant une autre lignée T humaine spécifique d'un épitope situé également au niveau du domaine C1 ($^{2144}\text{IIARYIRLHPTHYSIRST}^{2164}$) et une chaîne légère recombinante du FVIII mutée en 2118. De manière intéressante, les travaux du groupe de Voorberg, et des études menées au laboratoire ont montré l'implication des résidus Arg2090, Lys2092 et Phe2093 du domaine C1 (Wroblewska et al., 2012), et des résidus Arg2215/2220 du domaine C2 (Gangadharan et al., 2016) dans l'endocytose et l'apprêtement antigénique du FVIII par les MO-DCs. Les mutations des résidus du domaine C1 abrogent l'activation des LT par les MO-DCs, tandis que les mutations des résidus du domaine C2 inhibent l'activation des LT d'environ 80%. L'ensemble de ces observations suscite une interrogation quant à la séquence des événements qui permet l'endocytose et l'apprêtement antigénique du FVIII. En effet, alors que la glycosylation en 2118 est bien présente, elle ne permet pas à elle seule de mener à l'endocytose et l'apprêtement antigénique du FVIII par les MO-DCs lorsque celui-ci est muté au niveau des résidus Arg2090, Lys2092 et Phe2093 du domaine C1. De même, lorsque le FVIII est muté au niveau des résidus Arg2215/2220 du domaine C2, il ne semble pas y avoir de compensation par une capture du FVIII via son domaine C1. Rappelons que ces observations ont été réalisées au laboratoire avec le même système expérimental (mutant C1, mutant C2 et mutant 2118 testés avec les MO-DCs et 1G8-A2). Ce phénomène pourrait être inhérent à des modifications micromoléculaires affectant un des domaines C lorsque l'autre est muté au niveau de 1 à 3 résidus, ou pourrait refléter la nécessité d'un co-engagement des domaines C1 et C2 pour la capture et l'apprêtement antigénique du FVIII par les CPAs. L'implication des domaines C1 et C2 dans la liaison du FVIII aux phospholipides membranaires a été suggérée à l'aide de différents systèmes expérimentaux utilisant des anticorps monoclonaux pour masquer certaines régions des domaines C (Meems et al., 2009), des mutants du FVIII (Lü et al., 2011), ou encore par

cryomicroscopie électronique (Parmenter et al., 2008). Il est donc probable que les résidus des domaines C coopèrent dans la liaison du FVIII à la surface des CPAs. Conformément aux travaux de Dasgupta *et al*, j'ai observé que la pré-incubation des MO-DCs avec l'EDTA abroge la présentation du FVIII aux LT (Dasgupta et al., 2007b). Ceci confirme que l'endocytose et l'apprêtement antigénique du FVIII font intervenir des récepteurs d'endocytose dépendants d'ions divalents, tel que le CD206. Ainsi, pourrions-nous imaginer une endocytose du FVIII en deux étapes (figure 13), avec une étape initiale de fixation et concentration de FVIII à la surface cellulaire, puis un transfert du FVIII à un récepteur d'endocytose comme le CD206 via la reconnaissance de la structure hautement mannosylée en 2118. Un tel modèle a déjà été décrit dans le cadre du catabolisme du FVIII, dans lequel les HSPGs retrouvés dans la matrice extracellulaire des cellules 'scavengers' se lient au FVIII et le concentrent à la surface cellulaire pour faciliter sa dissociation du VWF et son transfert au récepteur d'endocytose LRP (Sarafanov et al., 2001).

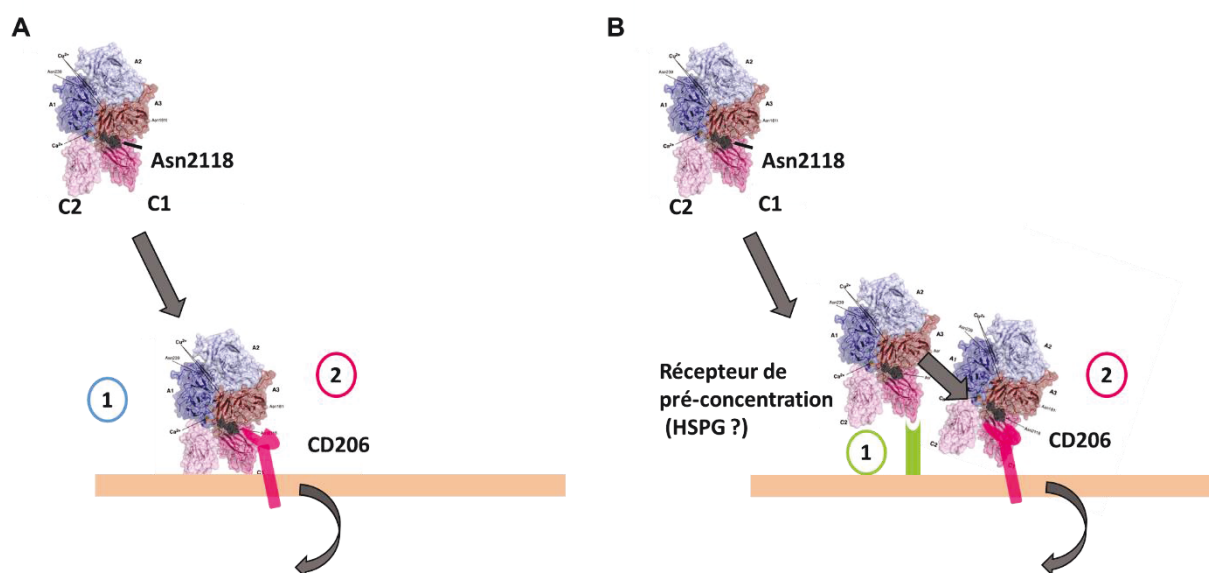


Figure 13 : Modélisation de la capture et de l'internalisation du FVIII par les MO-DCs. Selon un premier modèle (A) la liaison initiale du FVIII via ses domaines C1 et C2 à la surface membranaire des MO-DCs favoriserait la reconnaissance du FVIII par un récepteur lectine de type C comme le CD206 via ses mannoses exposés en 2118. Les travaux de Herczenik *et al* ont montré que la lactadhérine n'affecte pas l'endocytose du FVIII et suggère donc que la liaison directe des domaines C aux phospholipides membranaires ne joue pas de rôle (Herczenik et al., 2012). Un deuxième modèle est donc proposé (B) qui mettrait en scène un co-récepteur. Le FVIII interagirait dans un premier temps avec un récepteur de pré-concentration type HSPG à la surface des MO-DCs via ses domaines C1 et C2. Puis, le FVIII serait transféré au récepteur lectine de type C qui déclencherait l'endocytose du FVIII.

I.3- MO-DCs et CPAs murines : Des voies d'endocytose du FVIII différentes ?

Cependant, alors que la mutation des résidus du domaine C1, et du domaine C2 altère de manière similaire l'activation des LT par les MO-DCs et les BM-DCs murines dans notre système expérimental (Gangadharan et al., 2016), l'élimination de la glycosylation en 2118 n'a pas d'effet sur l'activation des LT par les CPAs spléniques murines. Ces résultats confirment que les DCs murines n'endocytent pas le FVIII par des voies sensibles aux mannoses (Delignat et al., 2012; Herczenik et al., 2012). L'ensemble de ces expériences a été réalisé avec des souris de fond-génétique C57Bl/6. Or les souris C57Bl/6 expriment des taux plus faibles de CD206 (Autenrieth and Autenrieth, 2009) comparé à des souris C3H/HeN, et de fait internalisent peu d'antigènes par la voie du CD206 (He et al., 2007). Il est donc plausible que le modèle d'endocytose en deux étapes décrit précédemment faisant intervenir les résidus des domaines C1 et C2 soit valable pour les CPAs murines, mais ne fasse pas intervenir la glycosylation en 2118 via un récepteur sensible aux mannoses tel que le CD206, mais un autre récepteur d'endocytose. De manière intéressante, les résidus Lys2092 et Phe2093 du domaine C1 ont été impliqués dans la liaison du FVIII à la surface des cellules U87-MG (cellules de glioblastome) exprimant le LRP, mais également dans l'interaction du FVIII au LRP (Meems et al., 2011). Cependant, l'implication du LRP dans l'endocytose du FVIII par les DCs murines *in vitro* a également été écarté (Delignat et al., 2012; Herczenik et al., 2012).

Conformément aux résultats *in vitro*, l'élimination de la glycosylation en 2118 n'a pas diminué la réponse humorale anti-FVIII chez la souris hémophile A comparé au FVIII sauvage. Afin d'éliminer une interférence potentielle liée à la présence de VWF endogène, des investigations ont été menées chez la souris déficiente en VWF et FVIII. En effet, lorsque le FVIII humain est injecté chez la souris, il est rapidement capté par le VWF murin endogène (Meeks et al., 2012). Plusieurs travaux ont montré que le VWF inhibe l'endocytose du FVIII par les MO-DCs et les CPAs murines (Dasgupta et al., 2007a; Delignat et al., 2012; Herczenik et al., 2012). De plus, la liaison du FVIII au CD206 est inhibée par le VWF (Dasgupta et al., 2007a). Néanmoins, le FVIII muté en 2118 a induit une réponse anti-FVIII similaire au FVIII sauvage chez la souris déficiente en VWF et FVIII. La glycosylation en 2118 ne joue donc pas de rôle dans l'immunogénicité du FVIII en présence ou en absence de VWF chez la souris hémophile A.

I.4- Les limites du modèle murin hémophile A

L'utilisation d'un modèle murin pour l'étude de l'immunogénicité de molécules humaines peut introduire un biais (Reipert et al., 2003). Aussi, alors que chez les patients hémophiles A sévères, seulement 30% des patients développent une réponse inhibitrice, chez la souris déficiente en FVIII, une réponse anti-FVIII est observée chez 80 à 100% des souris. Ceci peut être expliqué par le fait que toutes les souris partagent le même CMH et la même mutation du gène *F8*, puisqu'elles appartiennent à une même lignée congénique. Néanmoins, le développement d'une réponse anti-FVIII chez les souris sauvages, même si elle est de moindre amplitude, révèle les limites du modèle murin pour l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII (Reipert et al., 2000). Dans notre cas particulier, une autre limite à l'utilisation de ce modèle est la différence de distribution de récepteurs d'endocytose tel que le CD206 chez la souris, comparée à l'homme. Bien qu'assez peu documenté chez l'homme, l'étude de la distribution du CD206 au sein de la rate laisse apparaître des différences importantes. Alors que le CD206 est majoritairement exprimé par les macrophages de la pulpe rouge chez la souris, seules les cellules endothéliales sinusoidales l'expriment chez l'homme (Martinez-Pomares, 2012). Par ailleurs, bien que le CD206 soit exprimé par les MO-DCs et les BM-DCs, l'expression de CD206 fonctionnel par des sous-populations de DC spléniques murines en conditions physiologiques reste controversée (Burgdorf et al., 2010; Segura et al., 2009).

I.5. Les limites du modèle *in vitro*

Les DC différenciées *in vitro* à partir de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4 ne sont pas une sous-population de DC physiologiques normales. Néanmoins, plusieurs études ont démontré qu'elles présentent de nombreuses homologies avec une sous-population de MO-DCs retrouvées dans des conditions inflammatoires (Robbins et al., 2008; Segura et al., 2013). L'observation que les MO-DCs ne sont pas capables d'apprêter le FVIII muté en 2118 est donc intéressante dans la mesure où l'état inflammatoire du patient hémophile A est suspecté d'être un facteur de risque environnemental associé au développement d'inhibiteurs du FVIII. Cependant, l'hybridome T murin et la lignée T humaine utilisés dans le modèle *in vitro* sont issus de LT matures/mémoires. Ils n'ont donc pas besoin de recevoir les 3 signaux d'activation évoqués en introduction (section III.1.1); seul le signal correspondant à la présentation du peptide FVIII associé au CMH II suffit à activer les LT dans ce système. En d'autres termes, les limites de ce modèle sont qu'il ne permet pas de rendre compte des conséquences de l'apprêtement antigénique : induction d'une réponse immunitaire ou induction de tolérance ?

Par ailleurs, au laboratoire, la mutation des résidus des domaines C n'a pas réduit l'immunogénicité du FVIII chez la souris hémophile A (Gangadharan et al., 2016). Cependant, une diminution de l'immunogénicité du mutant C1 a pu être observée chez la souris déficiente en VWF et FVIII. Cette observation révèle une autre limite de ce système expérimental : les expériences d'endocytose et d'apprêtement antigénique sont généralement réalisées sans ajout de sérum et dans des conditions statiques. Il fait donc abstraction des interactions possibles du FVIII avec d'autres protéines plasmatiques telle que le VWF pouvant interférer dans la capture du FVIII par les CPAs. Aussi, malgré une diminution de l'endocytose du FVIII en présence de VWF par les MO-DCs, Sorvillo *et al* ont détecté une présence significative de peptides du FVIII en association au CMH II dans les vésicules endosomales par spectrométrie de masse (Sorvillo et al., 2016). De manière intéressante, la présence de VWF semble moduler le répertoire des peptides issus du FVIII et associés aux molécules CMH II.

I.6. Précaution quant à l'élimination de N-glycosylation sur de potentiels épitopes T

La prédiction d'épitopes T *in silico* à l'aide des algorithmes du site IEDB (Immune epitope database and analysis resource) indique que le remplacement de l'asparagine 2118 par une glutamine réduit la probabilité que les peptides 2106-2110 soient des épitopes T (score IEDB « rank percentile » passant au-dessus du seuil de 11), alors que le score des peptides 2117 et 2118 reste inchangé (figure 14). Un FVIII muté en position 2118 ne devrait donc pas posséder de nouveaux épitopes T et, finalement, être plus immunogène que le FVIII sauvage.

Toutefois, sept épitopes T comportant le résidu N2118 présentent une forte prédiction de liaison au HLA-DRB1*1501 (figure 14). Ces épitopes n'ont pas été détectés à l'aide des hybridomes T produits à partir de la souris hémophile A transgénique pour le HLA-DRB1*1501 (Steinitz et al., 2012). De même, les différentes investigations menées à partir de PBMC de patients hémophiles A ou de donneurs sains n'ont pas non plus mis en évidence une réponse T contre ces peptides (Wroblewska et al., 2013). Il est possible que la présence d'un glycane en position 2118 empêche l'apprêtement de ces peptides et leur liaison au CMH II. En effet, il a été décrit dans le cas d'antigènes du virus de la grippe A, que la présence d'une glycosylation influence la génération d'épitope T (Wood and Elliott, 1998). De plus, la présence d'une glycosylation ralentit le processus de digestion et d'assemblage de peptide avec les molécules de classe II du collagène de type II (CII) et ferait intervenir des protéases différentes (von Delwig et al., 2006). Il est donc possible qu'en modifiant l'Asn2118, et donc en absence d'un glycane à cette position, nous favorisons en fait l'émergence de nouveaux épitopes T possédant une bonne d'affinité pour le HLA-DRB1. Du point de vue de ses épitopes T, un tel FVIII muté serait donc

potentiellement aussi immunogène, voire plus, que le FVIII sauvage, mais pour des raisons différentes. Toutefois, la réduction/abolition de son endocytose par les CPAs, consécutive à l'absence du glycane mannosylé en 2118, pourrait compenser l'émergence de ces nouveaux épitopes T.

| Début | Fin | Séquence | Rank percentile | |
|-------|------|-------------------|-----------------|-------|
| | | | N2118 | Q2118 |
| 2104 | 2118 | MYSLDGKKWQTYRGN/Q | 38.48 | 37.64 |
| 2105 | 2119 | YSLDGKKWQTYRGN/QS | 48.79 | 45.77 |
| 2106 | 2120 | SLDGKKWQTYRGN/QST | 7.55 | 13.32 |
| 2107 | 2121 | LDGKKWQTYRGN/QSTG | 7.9 | 13.95 |
| 2108 | 2122 | DGKKWQTYRGN/QSTGT | 7.9 | 14.06 |
| 2109 | 2123 | GKKWQTYRGN/QSTGTL | 7.35 | 11.69 |
| 2110 | 2124 | KKWQTYRGN/QSTGTLM | 7.65 | 11.85 |
| 2111 | 2125 | KWQTYRGN/QSTGTLMV | 20.31 | 21.32 |
| 2112 | 2126 | WQTYRGN/QSTGTLMV | 20.65 | 21.15 |
| 2113 | 2127 | QTYRGN/QSTGTLMVFF | 46.75 | 27.76 |
| 2114 | 2128 | TYRGN/QSTGTLMVFFG | 52.68 | 43.24 |
| 2115 | 2129 | YRGN/QSTGTLMVFFGN | 53.03 | 44.91 |
| 2116 | 2130 | RGN/QSTGTLMVFFGNV | 53.77 | 54.4 |
| 2117 | 2131 | GN/QSTGTLMVFFGNVD | 8.45 | 8.45 |
| 2118 | 2132 | N/QSTGTLMVFFGNVDS | 3.28 | 3.28 |

Figure 14. Prédiction de la liaison au HLA-DRB1*1501 des peptides de 15 aa comportant les résidus N et Q en position 2118. Cette analyse prédictive a été réalisée pour l'allèle HLA-DRB1*1501 avec la base de données IEDB (<http://tools.iedb.org/mhci/>) en utilisant la méthode IEDB consensus. La probabilité de liaison définie sous le terme « Rank percentile » est comprise entre 0 et 100. Plus cette valeur est faible, plus la probabilité pour le peptide de se lier au CMH II est haute. Un seuil de 11 est généralement considéré comme discriminant les peptides susceptibles d'être des épitopes T des peptides ne l'étant pas.

II- Potentiel thérapeutique de l'inhibition de la BTK sur la réponse immunitaire anti-FVIII

Chez le patient hémophile A sévère, CRM-négatif, comme dans notre modèle murin, les précurseurs T et B spécifiques du FVIII ne sont pas éliminés durant leur ontogénie dans les organes lymphoïdes primaires. Les LB étant les précurseurs des plasmocytes sécréteurs d'anticorps anti-FVIII, ils représentent une cible stratégique dans la prévention et l'éradication des inhibiteurs du FVIII (Hausl et al., 2004; Macauley et al., 2013). Durant ma thèse, j'ai eu pour objectif d'explorer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la BTK, molécule clé de la signalisation du BCR. La liaison de l'antigène au BCR entraîne une cascade de signalisation impliquant rapidement l'intervention de la BTK. La BTK étant essentielle à la survie, la prolifération et l'activation des LB, elle est devenue une cible de choix dans le traitement des proliférations lymphoïdes B malignes, et de certaines maladies auto-immunes (Puri et al., 2013). De nombreux inhibiteurs de la BTK ont été développés ces dernières années (Hendriks et al., 2014). Parmi ceux-ci, le PF-06250112 qui inhibe la BTK de manière réversible a été récemment décrit (Rankin et al., 2013). Au cours de ma thèse, j'ai évalué le potentiel thérapeutique de cet inhibiteur sur la réponse immunitaire anti-FVIII chez le modèle murin hémophile A. Dans un premier temps, j'ai testé l'effet préventif de l'inhibition de la BTK sur l'apparition de la réponse humorale anti-FVIII.

II.1- L'inhibition de la BTK ne permet pas de prévenir l'activation des LB naïfs

Le PF-06250112 en se liant à la cystéine 481 du domaine de liaison à l'ATP empêche l'autophosphorylation de la BTK sur sa tyrosine 223 (Rankin et al., 2013). De fait, l'augmentation d'expression des marqueurs d'activation des LB tel le CD69 ou le CD86 est abrogée lorsque l'activité kinase de la BTK est inhibée (Benson et al., 2014; Rankin et al., 2013). J'ai donc validé la capacité du PF-06250112 à inhiber la signalisation du BCR des LB *in vitro* et *in vivo* par mesure de l'expression du CD86 à la surface des LB suite à la stimulation du BCR avec un anticorps anti-Ig membranaire. Le PF-06250112 inhibe l'activation des LB de manière dose dépendante suite à leur stimulation via le BCR. Cependant, un effet marginal du PF-06250112 a été observé sur l'activation des LB lorsqu'ils sont activés via une voie indépendante du BCR : la voie CD40. Une altération modérée de la voie de signalisation du CD40 a également été décrite avec un autre inhibiteur de la BTK : l'ibrutinib (Herman et al.,

2011). Il semble que l'ibrutinib interfère avec la signalisation NF κ B induite par le CD40. Néanmoins, j'ai calculé une IC₅₀ de 1.1nM du PF-06250112 sur l'expression du CD86 suite à la stimulation du BCR. Cette IC₅₀ de l'ordre du nM est similaire à celle décrite dans l'article princeps (Rankin et al., 2013) et démontre une forte spécificité du PF-06250112 pour la signalisation du BCR, puisque des doses de cet ordre n'ont pas eu d'effet sur la signalisation CD40. En raison de la présence d'IgM dans la circulation, un sérum anti-IgD a été utilisé pour valider le PF-06250112 *in vivo*. Une faible activation des LB suite à l'administration de ce sérum a été observée. Ceci est probablement lié au potentiel plus faible du sérum anti-IgD à activer les LB comparé à un anticorps monoclonal anti-IgM, ou au fait que les LB spléniques des souris C57Bl/6 sont moins sensibles à l'activation via leur IgD de surface, de même qu'à certains antigènes, en comparaison aux souris Balb/c ou CBA (Pellegrini et al., 2007; Strait et al., 2015). Néanmoins, l'activation observée après stimulation avec le sérum anti-IgD a été abrogée dès 15 mg/kg de PF-06250112, dose que j'ai utilisée par la suite.

Les inhibiteurs de la BTK ont une demi-vie d'environ 7 heures. Ils ont donc été administrés quotidiennement par voie orale. Cependant, le traitement au PF-06250112 a été adapté dans le cas de la souris hémophile A car l'administration quotidienne du traitement par gavage présente le risque d'induire des hémorragies dans le tractus gastro-intestinal, et soulève un problème éthique. J'ai donc adapté ce traitement afin de couvrir 10 fois la demi-vie du FVIII, soit un traitement de 5 jours/semaine.

Les inhibiteurs de la BTK classiques (par exemple l'ibrutinib), bien que hautement sélectifs pour la BTK, ont souvent été décrits comme interférant dans la signalisation des LT en inhibant l'ITK (Il-2 inducible T-cell kinase). Ainsi, avons-nous observé une diminution du pourcentage des LT spléniques suite à l'inhibition chronique de la BTK avec le PF-06250112. Néanmoins, l'observation d'une capacité de prolifération similaire des splénocytes issus de souris traitées avec le PF-06250112 comparé au groupe de souris traitées avec le véhicule suggère que le PF-06250112 n'altère pas l'activation des LT. Cette diminution pourrait être le reflet d'une perturbation de l'homéostasie des LT suite à l'effet du PF-06250112 sur les LB. En effet, conformément aux données publiées, l'inhibition chronique de la BTK a entraîné une diminution des LB folliculaires et des LB de la zone marginale au sein de la rate (Benson et al., 2014; Bonami et al., 2014; Rankin et al., 2013). Benson *et al* ont par ailleurs montré que l'inhibition chronique de la BTK entraîne la disparition des LB transitionnels T3 (Benson et al., 2014). Ces différentes observations sont probablement liées à l'implication de la signalisation de la BTK dans la migration des LB en réponse au CXCL13 (de Gorter et al., 2007). Cependant,

nous n'avons pas observé d'effet du PF-06250112 sur les LB des CG contrairement à ce qui avait été décrit précédemment (Rankin et al., 2013). Ceci pourrait être lié à l'utilisation d'un modèle expérimental représentant une pathologie, concernant un antigène et impliquant des souris de fonds génétiques différents.

Aussi, alors que l'inhibition chronique de la BTK semble perturber les populations B périphériques chez la souris hémophile A, nous n'avons pas observé d'effet du PF-06250112 sur l'apparition de la réponse humorale anti-FVIII. Bien que ces résultats soient décevants, ils ne sont pas surprenants dans un contexte de réponse à un Ag thymo-dépendant pour lequel le BCR est initialement de faible affinité. En effet, l'invalidation de la BTK chez les souris *Xid* ou déficiente en BTK a montré que la BTK est principalement impliquée dans les réponses T-indépendantes de type II (Kenny et al., 1987; Khan et al., 1995; Vinuesa et al., 2001). Dans le cas d'une réponse primaire à un Ag T-dépendant, de probables mécanismes de compensation entre la BTK et la tyrosine kinase TEC ont été précédemment décrits (Ellmeier et al., 2000). Néanmoins, l'inhibition chronique de la BTK altère les réponses T-dépendantes à des antigènes qui induisent une signalisation tonique du BCR, soit à des Ag pour lesquels le BCR a une forte affinité (Benson et al., 2014).

Par ailleurs, l'absence d'effet de l'inhibition de la BTK sur l'apparition de la réponse anti-FVIII reflète peut-être le fait que les LB naïfs qui présentent un BCR de faible affinité pour le FVIII ne jouent pas le rôle de CPA lors de l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII. De plus, Archambault *et al* ont démontré chez un modèle murin dont seuls les LB n'expriment pas le CMH II, que les LB naïfs ne jouent pas le rôle de CPA lors de l'initiation de la réponse immunitaire dirigée contre un Ag T-dépendant, l'antigène MOG ('myelin oligodendrocyte glycoprotein') (Archambault et al., 2013).

II.2- L'inhibition de la BTK altère la réponse B mémoire

Lors d'une réponse secondaire à l'antigène, les LB mémoires générés au cours de la réponse primaire présentent un BCR de forte affinité pour l'antigène (Kurosaki et al., 2015). Chez l'hémophile A, les rares lignées B humaines disponibles, immortalisées à partir de PBMC de patients avec inhibiteurs, présentent un BCR de très haute affinité ($K_d=10^{-11} M^{-1}$) pour le FVIII (Jacquemin et al., 1998). De manière similaire, l'affinité apparente des IgG anti-FVIII sériques des patients hémophiles A avec inhibiteurs avoisinent les 10^{-9} - $10^{-12} M^{-1}$, des valeurs 100 fois plus élevées que l'affinité apparente des IgG anti-FVIII d'individus sains ou de patients sans

inhibiteur (Hofbauer et al., 2016). Ces observations suggèrent donc que les LB mémoires anti-FVIII présentent des BCR de forte affinité pour le FVIII. J'ai donc fait l'hypothèse que l'inhibition de la BTK pourrait altérer la réponse B mémoire anti-FVIII. Dans un premier temps, j'ai observé l'effet du PF-06250112 sur la réponse mémoire anti-FVIII après un délai de 90 jours entre la fin de l'immunisation avec le FVIII et le début du traitement au PF-06250112 et la nouvelle injection de FVIII. Ce modèle ne permet pas de s'affranchir de la présence des plasmocytes à longue durée de vie nichées dans la moelle osseuse (Hausl et al., 2002; Meslier et al., 2011), mais permet l'élimination spontanée des plasmocytes à courte durée de vie (Slifka et al., 1998). L'analyse du rapport du titre d'IgG anti-FVIII mesuré au 7^{ème} jour et au 14^{ème} jour après l'injection de FVIII comparé au titre initial d'IgG anti-FVIII (J0) a montré que le PF-06250112 altère la réponse B mémoire. Dans ce modèle, l'augmentation des IgG anti-FVIII mesurée à J7 et J14 est consécutive à l'activation des plasmocytes à longue durée de vie, et l'activation et la différenciation des LB mémoires en plasmocytes. Les plasmocytes n'exprimant pas de BCR de surface, il a été décrit que l'expression d'ARNm codant pour la BTK est régulée négativement chez ces cellules (Smith et al., 1994). Il est donc peu probable que l'effet observé du PF-06250112 reflète une altération de la fonction des plasmocytes. Benson *et al* ont d'ailleurs montré que l'inhibition de la BTK durant une trentaine de jours suite à l'immunisation avec l'Ag NP₁₉-CGG (4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-chicken gammaglobulin, Ag T-dépendant) n'affectait pas la survie des plasmocytes à longue durée de vie spécifiques de cet Ag (Benson et al., 2014).

Aussi, afin de confirmer l'effet du PF-06250112 sur l'activation et la différenciation des LB mémoires anti-FVIII, j'ai utilisé une deuxième approche expérimentale, au cours de laquelle des splénocytes déplétés en cellules CD138⁺ (plasmocytes) issus de souris immunisées avec le FVIII ont été transférés à des souris hémophiles A naïves. Cette procédure permet de s'affranchir de la présence de plasmocytes et d'anticorps anti-FVIII circulants (Hausl et al., 2005). Dans ce système, les IgG anti-FVIII mesurées 7 jours et 14 jours après l'injection de FVIII proviennent de l'activation et de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes. J'ai ainsi observé que l'inhibition de la BTK avec le PF-06250112 réduit significativement la production d'IgG anti-FVIII, et donc la réponse B mémoire anti-FVIII. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés, il semble que l'inhibition de la BTK lors d'une nouvelle exposition à l'Ag inhibent la prolifération des LB mémoires et leur différenciation en plasmocytes (Benson et al., 2014).

II.3- Retombées thérapeutiques potentielles

Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la BTK en prévention de l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII ne présente-t-elle pas d'intérêt. Elle altère les populations lymphocytaires B périphériques sans réduire significativement la réponse humorale anti-FVIII. Dans un tel contexte, la stratégie de Macauley reposant sur l'inhibition spécifique des LB par l'utilisation de liposomes chargés en FVIII et en ligand de CD22 est plus pertinente (Macauley et al., 2013).

Néanmoins, le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la BTK dans le cadre d'une réponse secondaire ou mémoire au FVIII est intéressant. En effet, il a récemment été décrit que le succès de l'ITI est associé à un pic de titre inhibiteur faible (<22 UB/ml) lors des premières semaines de l'ITI (Hay et al., 2012). Cette observation suggère qu'un meilleur contrôle de la réponse B mémoire anti-FVIII au cours des premières semaines d'ITI augmenterait les chances de succès de l'ITI. Ainsi, l'inhibition de la BTK au début de l'ITI pourrait-elle contrôler la réponse B mémoire anti-FVIII et ainsi augmenter les chances de réussite de l'ITI.

Dans les protocoles d'ITI, les fortes doses de FVIII administrées peuvent entraîner la formation de complexes immuns. Il a donc été envisagé que la liaison du complexe IgG-FVIII au récepteur Fc γ RIIB (Fc γ RIIB ou CD32) exprimé à la surface des LB pourrait être à l'origine de l'inactivation des LB mémoires lors d'une ITI. En effet, le Fc γ RIIB est régulièrement décrit pour réguler négativement l'activation des LB (Espéli et al., 2016). Or, la BTK est également impliquée dans la signalisation du Fc γ RIIB (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). En effet, en cas de pontage de deux Fc γ RIIB par des complexes immuns, une signalisation dépendante de la BTK entraîne l'apoptose du LB (figure 15). Ainsi, l'inhibition de la BTK pourrait-elle altérer la signalisation du Fc γ RIIB dans l'induction d'apoptose des LB mémoires. Cependant, Werwitzke *et al* ont récemment démontré que la délétion ou l'inhibition du Fc γ RIIB chez la souris hémophile A n'augmente pas la réponse immunitaire anti-FVIII. Au contraire, l'invalidation du Fc γ RIIB altère la capacité des LB mémoires à se différencier *in vitro* en ASCs (Werwitzke et al., 2015).

Par ailleurs, la BTK étant exprimée également par les plaquettes, il a été décrit dans le cas de l'ibrutinib, un inhibiteur irréversible de la BTK, que l'ibrutinib altère la signalisation plaquettaire induite par la GpVI et l'intégrine α IIB β 3 (Bye et al., 2015). Aussi, des troubles de l'hémostase ont été rapportés chez 18 à 44% des patients traités avec l'ibrutinib (Byrd et al.,

2013, 2014). Par conséquent, des investigations concernant les effets secondaires du PF-06250112 sur l'activation plaquettaire sont nécessaires.

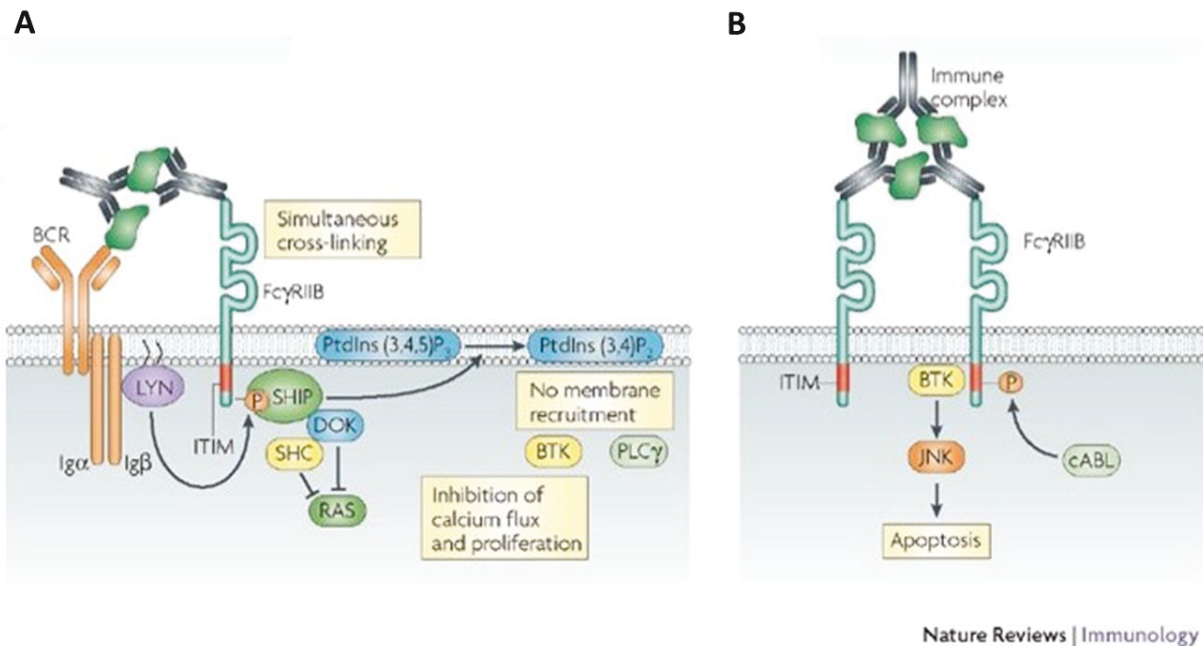


Figure 15 : Voies de signalisation du FcγRIIB. (A) La liaison simultanée du complexe immunitaire au BCR et au FcγRIIB induit la phosphorylation des motifs ITIM du domaine cytoplasmique du FcγRIIB par la tyrosine kinase LYN. Ceci entraîne le recrutement de la phosphatase SHIP et l'hydrolyse de PtdIns(3,4,5)P₃ en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂), ce qui conduit à l'inhibition du recrutement de BTK et de la phospholipase Cγ à la membrane, et donc à l'inhibition de la prolifération des LB. (B) Le pontage de deux FcγRIIB par un complexe immunitaire entraîne l'apoptose des LB via des signalisations indépendantes de LYN et SHIP, impliquant la BTK et JNK (JUN N-terminal kinase). Adaptée de Nimmerjahn *et al* (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'apparition des inhibiteurs du FVIII mène à une impasse thérapeutique chez 30% des patients hémophiles A sévères. Si les effecteurs lymphocytaires T et B de la réponse immunitaire anti-FVIII ont été assez bien décrits, les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans l'initiation de cette réponse demeurent encore mal connus. C'est sans doute la raison pour laquelle aucune stratégie n'existe actuellement pour prévenir l'apparition des inhibiteurs du FVIII. Différentes méthodologies ont été testées dans un modèle préclinique de l'hémophilie A, la souris déficiente en FVIII. Ces différentes stratégies ciblent soit la communication LT/CPA, soit les LB, ou encore l'émergence de cellules T régulatrices par manipulation du système immunitaire. Néanmoins, aucune de ces approches n'est pour le moment applicable chez l'homme.

Au cours de ma thèse, j'ai tenté de réduire l'immunogénicité du FVIII par modification de sa structure par mutagénèse dirigée. J'ai ainsi montré que l'élimination de la glycosylation au niveau du domaine C1 du FVIII en 2118 abroge sa présentation aux LT par les MO-DCs. Il avait en effet été démontré précédemment au laboratoire que les MO-DCs endocytent le FVIII via des structures hautement mannosylées présentes au niveau des domaines A1 et C1 du FVIII, par un récepteur sensible aux mannoses, le CD206 (Dasgupta et al., 2007). Néanmoins, l'élimination de la glycosylation en 2118 n'a pas réduit significativement l'immunogénicité du FVIII chez la souris hémophile A en présence ou en absence de VWF. Grâce à un hybridome T murin anti-FVIII restreint au HLA-DRB1*0101 que j'ai produit au début de ma thèse, j'ai confirmé que les CPAs murines n'utilisent pas les mêmes voies d'endocytose et d'apprêtement antigénique que les MO-DCs (Delignat et al., 2012, 2014; Herczenik et al., 2012). Ces résultats combinés à de récentes observations du laboratoire concernant le rôle de certains résidus des domaines C1 et C2, impliqués dans la liaison du FVIII aux phospholipides membranaires, permettent de proposer un modèle d'endocytose et d'apprêtement antigénique du FVIII valable pour les MO-DCs, mais pas pour les CPAs murines. Cette observation révèle, dans le cas d'investigations concernant l'initiation de la réponse anti-FVIII, une des limites du modèle murin d'hémophilie A. En effet, la distribution de récepteurs tels que le CD206 diffère entre l'homme et la souris, en particulier au niveau des organes lymphoïdes secondaires tel que la rate (Martinez-Pomares, 2012), et l'expression de CD206 fonctionnel par des sous-populations de DC spléniques murines en conditions physiologiques reste controversée (Burgdorf et al., 2010; Segura et al., 2009).

Par conséquent, de futures investigations dans des modèles plus représentatifs de la situation chez l'homme, tels que la souris transgénique pour le CD206 humain (He et al., 2007), ou des

modèles de souris humanisées (Villaudy et al., 2014) pourraient apporter des éléments de réponse quant au potentiel thérapeutique de l'élimination de la glycosylation en 2118 du FVIII.

En parallèle à ce travail, j'ai exploré une autre approche thérapeutique en utilisant un inhibiteur d'une molécule impliquée dans la signalisation du BCR : la BTK. J'ai ainsi montré que l'inhibition de la BTK ne permet pas de prévenir l'apparition des inhibiteurs du FVIII. Ces résultats confirment que l'inhibition de la BTK n'affecte pas les réponses T-dépendantes pour des Ag ayant initialement une faible affinité pour le BCR (Benson et al., 2014), et renforcent l'hypothèse que les LB ne jouent pas le rôle de CPA dans l'initiation de la réponse anti-FVIII.

Néanmoins, j'ai montré que l'inhibition de la BTK abroge la réponse B mémoire anti-FVIII chez la souris hémophile A. De futures investigations sont nécessaires afin d'explorer les mécanismes d'inhibition de la prolifération et/ou différenciation des LB mémoires en plasmocytes par l'inhibiteur de la BTK : est-ce que ceux-ci induisent un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des LB, ou anergise de manière réversible les LB ? Par ailleurs, cette stratégie n'étant pour le moment pas spécifique de la réponse anti-FVIII, il serait intéressant de concevoir et de tester des formulations de l'inhibiteur de BTK avec des nanoparticules liposomales contenant du FVIII, tout en s'assurant que l'inhibition de la BTK n'affecte pas les fonctions plaquettaires.

Bibliographie

- Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 149–157.
- Amano, K., Sarkar, R., Pemberton, S., Kembell-Cook, G., Kazazian, H.H., and Kaufman, R.J. (1998). The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII. *Blood* *91*, 538–548.
- Ananyeva, N.M., Lacroix-Desmazes, S., Hauser, C.A.E., Shima, M., Ovanesov, M.V., Khrenov, A.V., and Saenko, E.L. (2004). Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* *15*, 109–124.
- Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H., Gitschier, J., Hutter, P., de Moerloose, P., and Morris, M.A. (1995). Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Adv. Exp. Med. Biol.* *386*, 19–34.
- Antun, A., Monahan, P.E., Manco-Johnson, M.J., Callaghan, M.U., Kanin, M., Knoll, C., Carpenter, S.L., Davis, J.A., Guerrero, M.F., Kruse-Jarres, R., et al. (2015). Inhibitor recurrence after immune tolerance induction: a multicenter retrospective cohort study. *J. Thromb. Haemost. JTH* *13*, 1980–1988.
- Archambault, A.S., Carrero, J.A., Barnett, L.G., McGee, N.G., Sim, J., Wright, J.O., Raabe, T., Chen, P., Ding, H., Allenspach, E.J., et al. (2013). Cutting edge: Conditional MHC class II expression reveals a limited role for B cell antigen presentation in primary and secondary CD4 T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 545–550.
- Astermark, J. (2015). FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood* *125*, 2045–2051.
- Astermark, J., Oldenburg, J., Pavlova, A., Berntorp, E., Lefvert, A.-K., and MIBS Study Group (2006a). Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* *107*, 3167–3172.
- Astermark, J., Oldenburg, J., Carlson, J., Pavlova, A., Kavakli, K., Berntorp, E., and Lefvert, A.-K. (2006b). Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* *108*, 3739–3745.
- Astermark, J., Wang, X., Oldenburg, J., Berntorp, E., Lefvert, A.-K., and MIBS Study Group (2007). Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* *5*, 263–265.
- Astermark, J., Donfield, S.M., Gomperts, E.D., Schwarz, J., Menius, E.D., Pavlova, A., Oldenburg, J., Kessing, B., DiMichele, D.M., Shapiro, A.D., et al. (2013). The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* *121*, 1446–1454.
- Autenrieth, S.E., and Autenrieth, I.B. (2009). Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* *127*, 523–529.
- Aznar, J.A., Jorquera, J.I., Peiró, A., and Garcia, I. (1984). The importance of corticoids added to continued treatment with Factor VIII concentrates in the suppression of inhibitors in haemophilia A. *Thromb. Haemost.* *51*, 217–221.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.
- Batsuli, G., Deng, W., Healey, J.F., Parker, E.T., Baldwin, W.H., Cox, C., Nguyen, B., Kahle, J., Königs, C., Li, R., et al. (2016). High-affinity, non-inhibitory pathogenic C1 domain antibodies are present in patients with hemophilia A and inhibitors. *Blood*.

- Becker, S., Simpson, J.C., Pepperkok, R., Heinz, S., Herder, C., Grez, M., Seifried, E., and Tonn, T. (2004). Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells. *Thromb. Haemost.* *92*, 23–35.
- Behrmann, M., Pasi, J., Saint-Remy, J.-M.R., Kotitschke, R., and Kloft, M. (2002). Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb. Haemost.* *88*, 221–229.
- Benson, M.J., Rodriguez, V., von Schack, D., Keegan, S., Cook, T.A., Edmonds, J., Benoit, S., Seth, N., Du, S., Messing, D., et al. (2014). Modeling the clinical phenotype of BTK inhibition in the mature murine immune system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 185–197.
- Berntorp, E. (2003). Prophylactic therapy for haemophilia: early experience. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *9 Suppl 1*, 5–9; discussion 9.
- Bi, L., Lawler, A.M., Antonarakis, S.E., High, K.A., Gearhart, J.D., and Kazazian, H.H. (1995). Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat. Genet.* *10*, 119–121.
- Bi, L., Sarkar, R., Naas, T., Lawler, A.M., Pain, J., Shumaker, S.L., Bedian, V., and Kazazian, H.H. (1996). Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood* *88*, 3446–3450.
- de Biasi, R., Rocino, A., Papa, M.L., Salerno, E., Mastrullo, L., and De Biasi, D. (1994). Incidence of factor VIII inhibitor development in hemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates. *Thromb. Haemost.* *71*, 544–547.
- van der Bom, J.G., Mauser-Bunschoten, E.P., Fischer, K., and van den Berg, H.M. (2003). Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia. *Thromb. Haemost.* *89*, 475–479.
- Bonami, R.H., Sullivan, A.M., Case, J.B., Steinberg, H.E., Hoek, K.L., Khan, W.N., and Kendall, P.L. (2014). Bruton's tyrosine kinase promotes persistence of mature anti-insulin B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 1459–1470.
- Bontempo, F.A., Lewis, J.H., Gorenc, T.J., Spero, J.A., Ragni, M.V., Scott, J.P., and Starzl, T.E. (1987). Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* *69*, 1721–1724.
- Bovenschen, N., Herz, J., Grimbergen, J.M., Lenting, P.J., Havekes, L.M., Mertens, K., and van Vlijmen, B.J.M. (2003a). Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* *101*, 3933–3939.
- Bovenschen, N., Boertjes, R.C., van Stempvoort, G., Voorberg, J., Lenting, P.J., Meijer, A.B., and Mertens, K. (2003b). Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* *278*, 9370–9377.
- Bovenschen, N., Mertens, K., Hu, L., Havekes, L.M., and van Vlijmen, B.J.M. (2005a). LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood* *106*, 906–912.
- Bovenschen, N., Rijken, D.C., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J.M., and Mertens, K. (2005b). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J. Thromb. Haemost. JTH* *3*, 1257–1265.
- Bovenschen, N., van Stempvoort, G., Voorberg, J., Mertens, K., and Meijer, A.B. (2006). Proteolytic cleavage of factor VIII heavy chain is required to expose the binding-site for low-density lipoprotein receptor-related protein within the A2 domain. *J. Thromb. Haemost. JTH* *4*, 1487–1493.
- Brackmann, H.H., Oldenburg, J., and Schwaab, R. (1996). Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' "bonn protocol." *Vox Sang.* *70 Suppl 1*, 30–35.

- Bray, G.L., Kroner, B.L., Arkin, S., Aledort, L.W., Hilgartner, M.W., Eyster, M.E., Ragni, M.V., and Goedert, J.J. (1993). Loss of high-responder inhibitors in patients with severe hemophilia A and human immunodeficiency virus type 1 infection: a report from the Multi-Center Hemophilia Cohort Study. *Am. J. Hematol.* *42*, 375–379.
- Brinkhous, K.M., and Graham, J.B. (1950). Hemophilia in the female dog. *Science* *111*, 723–724.
- Brooks, M. (1999). A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *J. Hered.* *90*, 112–118.
- Brusko, T.M., Wasserfall, C.H., Agarwal, A., Kapturczak, M.H., and Atkinson, M.A. (2005). An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 5181–5186.
- Burgdorf, S., Schuette, V., Semmling, V., Hochheiser, K., Lukacs-Kornek, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2010). Steady-state cross-presentation of OVA is mannose receptor-dependent but inhibitable by collagen fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, E48-49-51.
- Bye, A.P., Unsworth, A.J., Vaiyapuri, S., Stainer, A.R., Fry, M.J., and Gibbins, J.M. (2015). Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 2326–2335.
- Byrd, J.C., Furman, R.R., Coutre, S.E., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K.A., Grant, B., Sharman, J.P., Coleman, M., Wierda, W.G., et al. (2013). Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *369*, 32–42.
- Byrd, J.C., Brown, J.R., O'Brien, S., Barrientos, J.C., Kay, N.E., Reddy, N.M., Coutre, S., Tam, C.S., Mulligan, S.P., Jaeger, U., et al. (2014). Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *371*, 213–223.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* *197*, 179–191.
- Casademunt, E., Martinelle, K., Jernberg, M., Winge, S., Tiemeyer, M., Biesert, L., Knaub, S., Walter, O., and Schröder, C. (2012). The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur. J. Haematol.* *89*, 165–176.
- Chiu, P.-L., Bou-Assaf, G.M., Chhabra, E.S., Chambers, M.G., Peters, R.T., Kulman, J.D., and Walz, T. (2015). Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood* *126*, 935–938.
- Choi, B.-M., Pae, H.-O., Jeong, Y.-R., Kim, Y.-M., and Chung, H.-T. (2005). Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *327*, 1066–1071.
- Church, W.R., Jernigan, R.L., Toole, J., Hewick, R.M., Knopf, J., Knutson, G.J., Nesheim, M.E., Mann, K.G., and Fass, D.N. (1984). Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 6934–6937.
- Coppola, A., Di Minno, M.N.D., and Santagostino, E. (2010). Optimizing management of immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A and inhibitors: towards evidence-based approaches. *Br. J. Haematol.* *150*, 515–528.
- Cousens, L.P., Najafian, N., Mingozzi, F., Elyaman, W., Mazer, B., Moise, L., Messitt, T.J., Su, Y., Sayegh, M., High, K., et al. (2013). In vitro and in vivo studies of IgG-derived Treg epitopes (Tregitopes): a promising new tool for tolerance induction and treatment of autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* *33 Suppl 1*, S43-49.

- Cunningham, M.A., Pipe, S.W., Zhang, B., Hauri, H.-P., Ginsburg, D., and Kaufman, R.J. (2003). LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* 1, 2360–2367.
- Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *Lancet Lond. Engl.* 355, 1627–1632.
- Darby, S.C., Keeling, D.M., Spooner, R.J.D., Wan Kan, S., Giangrande, P.L.F., Collins, P.W., Hill, F.G.H., Hay, C.R.M., and UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (2004). The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J. Thromb. Haemost. JTH* 2, 1047–1054.
- Dargaud, Y., Béguin, S., Lienhart, A., Al Dieri, R., Trzeciak, C., Bordet, J.C., Hemker, H.C., and Negrier, C. (2005). Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb. Haemost.* 93, 475–480.
- Dasgupta, S., Repessé, Y., Bayry, J., Navarrete, A.-M., Wootla, B., Delignat, S., Irinopoulou, T., Kamaté, C., Saint-Remy, J.-M., Jacquemin, M., et al. (2007a). VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* 109, 610–612.
- Dasgupta, S., Navarrete, A.-M., Bayry, J., Delignat, S., Wootla, B., André, S., Christophe, O., Nascimbeni, M., Jacquemin, M., Martinez-Pomares, L., et al. (2007b). A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8965–8970.
- Dasgupta, S., Navarrete, A.M., André, S., Wootla, B., Delignat, S., Repessé, Y., Bayry, J., Nicoletti, A., Saenko, E.L., d'Oiron, R., et al. (2008). Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica* 93, 83–89.
- Davie, E.W., Fujikawa, K., and Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 10363–10370.
- De Groot, A.S., Moise, L., McMurry, J.A., Wambre, E., Van Overtvelt, L., Moingeon, P., Scott, D.W., and Martin, W. (2008). Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes." *Blood* 112, 3303–3311.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630–1634.
- Delignat, S., Dasgupta, S., André, S., Navarrete, A.-M., Kaveri, S.V., Bayry, J., André, M.-H., Chtourou, S., Tellier, Z., and Lacroix-Desmazes, S. (2007). Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica* 92, 1423–1426.
- Delignat, S., Repessé, Y., Navarrete, A.-M., Meslier, Y., Gupta, N., Christophe, O.D., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2012). Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 18, 248–254.
- Delignat, S., Repessé, Y., Gilardin, L., Dimitrov, J.D., Lone, Y.C., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2014). Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 20, 486–492.
- von Delwig, A., Altmann, D.M., Isaacs, J.D., Harding, C.V., Holmdahl, R., McKie, N., and Robinson, J.H. (2006). The impact of glycosylation on HLA-DR1-restricted T cell recognition of type II collagen in a mouse model. *Arthritis Rheum.* 54, 482–491.

- Do, H., Healey, J.F., Waller, E.K., and Lollar, P. (1999). Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19587–19592.
- Dorner, A.J., Wasley, L.C., and Kaufman, R.J. (1990). Protein dissociation from GRP78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7429–7432.
- Eckhardt, C.L., van der Bom, J.G., van der Naald, M., Peters, M., Kamphuisen, P.W., and Fijnvandraat, K. (2011). Surgery and inhibitor development in hemophilia A: a systematic review. *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 1948–1958.
- Eckhardt, C.L., van Velzen, A.S., Peters, M., Astermark, J., Brons, P.P., Castaman, G., Cnossen, M.H., Dors, N., Escuriola-Ettingshausen, C., Hamulyak, K., et al. (2013). Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood* 122, 1954–1962.
- Ehrenforth, S., Kreuz, W., Scharrer, I., and Kornhuber, B. (1992). Factor VIII inhibitors in haemophiliacs. *Lancet Lond. Engl.* 340, 253.
- Espéli, M., Smith, K.G.C., and Clatworthy, M.R. (2016). FcγRIIB and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 269, 194–211.
- Everett, L.A., Cleuren, A.C.A., Khoriaty, R.N., and Ginsburg, D. (2014). Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells. *Blood* 123, 3697–3705.
- Ewenstein, B.M., Hoots, W.K., Lusher, J.M., DiMichele, D., White, G.C., Adelman, B., and Nadeau, K. (2000). Inhibition of CD40 ligand (CD154) in the treatment of factor VIII inhibitors. *Haematologica* 85, 35–39.
- Fay, P.J., and Smudzin, T.M. (1989). Intersubunit fluorescence energy transfer in human factor VIII. *J. Biol. Chem.* 264, 14005–14010.
- Fay, P.J., and Smudzin, T.M. (1992). Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* 267, 13246–13250.
- Fay, P.J., Smudzin, T.M., and Walker, F.J. (1991). Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J. Biol. Chem.* 266, 20139–20145.
- Figueiredo, M.S., and Brownlee, G.G. (1995). cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J. Biol. Chem.* 270, 11828–11838.
- Fijnvandraat, K., Berntorp, E., ten Cate, J.W., Johnsson, H., Peters, M., Savidge, G., Tengborn, L., Spira, J., and Stahl, C. (1997). Recombinant, B-domain deleted factor VIII (r-VIII SQ): pharmacokinetics and initial safety aspects in hemophilia A patients. *Thromb. Haemost.* 77, 298–302.
- Franchini, M., Mengoli, C., Lippi, G., Targher, G., Montagnana, M., Salvagno, G.L., Zaffanello, M., and Cruciani, M. (2008). Immune tolerance with rituximab in congenital haemophilia with inhibitors: a systematic literature review based on individual patients' analysis. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 14, 903–912.
- Franchini, M., Tagliaferri, A., Mengoli, C., and Cruciani, M. (2012). Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: a critical systematic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 81, 82–93.
- Furie, B., and Furie, B.C. (1992). Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl. J. Med.* 326, 800–806.

- Gaitonde, P., Peng, A., Straubinger, R.M., Bankert, R.B., and Balu-Iyer, S.V. (2012). Downregulation of CD40 signal and induction of TGF- β by phosphatidylinositol mediates reduction in immunogenicity against recombinant human Factor VIII. *J. Pharm. Sci.* *101*, 48–55.
- Gaitonde, P., Purohit, V.S., and Balu-Iyer, S.V. (2015). Intravenous administration of Factor VIII-O-Phospho-L-Serine (OPLS) complex reduces immunogenicity and preserves pharmacokinetics of the therapeutic protein. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *66*, 157–162.
- Gangadharan, B., Delignat, S., Ollivier, V., Gupta, N., Mackman, N., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2014). Role of coagulation-associated processes on factor VIII immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* *12*, 2065–2069.
- Gangadharan, B., Ing, M., Delignat, S., Peyron, I., Teyssandier, M., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2016). The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica*.
- Gaucher, C., Jorieux, S., Mercier, B., Oufkir, D., and Mazurier, C. (1991). The “Normandy” variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. *Blood* *77*, 1937–1941.
- Gautier, P., Sultan, Y., Parquet-Gernez, A., Meriane, F., Guerois, C., and Derlon, A. (1996). Detection and IgG subclass analysis of antibodies to factor VIII in multitransfused haemophiliacs and healthy individuals. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *2*, 88–94.
- Giles, A.R., Tinlin, S., Hoogendoorn, H., Greenwood, P., and Greenwood, R. (1984). Development of factor VIII:C antibodies in dogs with hemophilia A (factor VIII:C deficiency). *Blood* *63*, 451–456.
- Gill, J.C. (1999). The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* *82*, 500–504.
- Gilles, J.G. (2010). Role of anti-idiotypic antibodies in immune tolerance induction. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *16*, 80–83.
- Gilles, J.G., Arnout, J., Vermynen, J., and Saint-Remy, J.M. (1993). Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood* *82*, 2452–2461.
- Gilles, J.G., Desqueper, B., Lenk, H., Vermynen, J., and Saint-Remy, J.M. (1996). Neutralizing anti-idiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients with hemophilia A. *J. Clin. Invest.* *97*, 1382–1388.
- Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., and Lawn, R.M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* *312*, 326–330.
- Glennie, M.J., French, R.R., Cragg, M.S., and Taylor, R.P. (2007). Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* *44*, 3823–3837.
- Goodeve, A.C., and Peake, I.R. (2003). The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin. Thromb. Hemost.* *29*, 23–30.
- Goodeve, A.C., Preston, F.E., and Peake, I.R. (1994). Factor VIII gene rearrangements in patients with severe haemophilia A. *Lancet Lond. Engl.* *343*, 329–330.
- Gorski, M.M., Blighe, K., Lotta, L.A., Pappalardo, E., Garagiola, I., Mancini, I., Mancuso, M.E., Fasulo, M.R., Santagostino, E., and Peyvandi, F. (2016). Whole-exome sequencing to identify genetic risk variants underlying inhibitor development in severe hemophilia A patients. *Blood* *127*, 2924–2933.

- de Gorter, D.J.J., Beuling, E.A., Kersseboom, R., Middendorp, S., van Gils, J.M., Hendriks, R.W., Pals, S.T., and Spaargaren, M. (2007). Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 26, 93–104.
- Gouw, S.C., van der Bom, J.G., Auerswald, G., Ettinghausen, C.E., Tedgård, U., and van den Berg, H.M. (2007a). Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 109, 4693–4697.
- Gouw, S.C., van den Berg, H.M., le Cessie, S., and van der Bom, J.G. (2007b). Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 5, 1383–1390.
- Gouw, S.C., van den Berg, H.M., Oldenburg, J., Astermark, J., de Groot, P.G., Margaglione, M., Thompson, A.R., van Heerde, W., Boekhorst, J., Miller, C.H., et al. (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 119, 2922–2934.
- Gouw, S.C., van der Bom, J.G., Ljung, R., Escuriola, C., Cid, A.R., Claeysens-Donadel, S., van Geet, C., Kenet, G., Mäkipernaa, A., Molinari, A.C., et al. (2013a). Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 368, 231–239.
- Gouw, S.C., van den Berg, H.M., Fischer, K., Auerswald, G., Carcao, M., Chalmers, E., Chambost, H., Kurnik, K., Liesner, R., Petrini, P., et al. (2013b). Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood* 121, 4046–4055.
- Graw, J., Brackmann, H.-H., Oldenburg, J., Schneppenheim, R., Spannagl, M., and Schwaab, R. (2005). Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat. Rev. Genet.* 6, 488–501.
- Gringeri, A., Mantovani, L.G., Scalone, L., Mannucci, P.M., and COCIS Study Group (2003). Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* 102, 2358–2363.
- Groth, C.G., Hathaway, W.E., Gustafsson, A., Geis, W.P., Putnam, C.W., Björkén, C., Porter, K.A., and Starzl, T.E. (1974). Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. *Surgery* 75, 725–733.
- Gupta, N., Culina, S., Meslier, Y., Dimitrov, J., Arnoult, C., Delignat, S., Gangadharan, B., Lecerf, M., Justesen, S., Gouilleux-Gruart, V., et al. (2015). Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance. *Sci. Transl. Med.* 7, 275ra21.
- Han, S., Asoyan, A., Rabenstein, H., Nakano, N., and Obst, R. (2010). Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20453–20458.
- van Haren, S.D., Herczenik, E., ten Brinke, A., Mertens, K., Voorberg, J., and Meijer, A.B. (2011). HLA-DR-presented peptide repertoires derived from human monocyte-derived dendritic cells pulsed with blood coagulation factor VIII. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M110.002246.
- Hausl, C., Maier, E., Schwarz, H.P., Ahmad, R.U., Turecek, P.L., Dorner, F., and Reipert, B.M. (2002). Long-term persistence of anti-factor VIII antibody-secreting cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII. *Thromb. Haemost.* 87, 840–845.
- Hausl, C., Ahmad, R.U., Schwarz, H.P., Muchitsch, E.M., Turecek, P.L., Dorner, F., and Reipert, B.M. (2004). Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood* 104, 115–122.

- Hausl, C., Ahmad, R.U., Sasgary, M., Doering, C.B., Lollar, P., Richter, G., Schwarz, H.P., Turecek, P.L., and Reipert, B.M. (2005). High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* 106, 3415–3422.
- Hay, C.R. (1998). Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 4, 558–563.
- Hay, C.R., Ollier, W., Pepper, L., Cumming, A., Keeney, S., Goodeve, A.C., Colvin, B.T., Hill, F.G., Preston, F.E., and Peake, I.R. (1997). HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb. Haemost.* 77, 234–237.
- Hay, C.R.M., DiMichele, D.M., and International Immune Tolerance Study (2012). The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 119, 1335–1344.
- He, L.-Z., Crocker, A., Lee, J., Mendoza-Ramirez, J., Wang, X.-T., Vitale, L.A., O'Neill, T., Petromilli, C., Zhang, H.-F., Lopez, J., et al. (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6259–6267.
- Healey, J.F., Parker, E.T., Barrow, R.T., Langley, T.J., Church, W.R., and Lollar, P. (2007). The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* 5, 512–519.
- van Helden, P.M.W., Kaijen, P.H.P., Fijnvandraat, K., van den Berg, H.M., and Voorberg, J. (2007). Factor VIII-specific memory B cells in patients with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 5, 2306–2308.
- van Helden, P.M.W., Van Haren, S.D., Fijnvandraat, K., van den Berg, H.M., and Voorberg, J. (2010). Factor VIII-specific B cell responses in haemophilia A patients with inhibitors. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 16, 35–43.
- Hendriks, R.W., Yuvaraj, S., and Kil, L.P. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 14, 219–232.
- Herczenik, E., van Haren, S.D., Wroblewska, A., Kaijen, P., van den Biggelaar, M., Meijer, A.B., Martinez-Pomares, L., ten Brinke, A., and Voorberg, J. (2012). Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 501–509, 509-5.
- Herman, S.E.M., Gordon, A.L., Hertlein, E., Ramanunni, A., Zhang, X., Jaglowski, S., Flynn, J., Jones, J., Blum, K.A., Buggy, J.J., et al. (2011). Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 117, 6287–6296.
- Hironaka, T., Furukawa, K., Esmon, P.C., Fournel, M.A., Sawada, S., Kato, M., Minaga, T., and Kobata, A. (1992). Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.* 267, 8012–8020.
- Hofbauer, C.J., Whelan, S.F.J., Hirschler, M., Allacher, P., Horling, F.M., Lawo, J.-P., Oldenburg, J., Tiede, A., Male, C., Windyga, J., et al. (2015). Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. *Blood* 125, 1180–1188.
- Hofbauer, C.J., Kepa, S., Schemper, M., Quehenberger, P., Reitter-Pfoertner, S., Mannhalter, C., Reipert, B.M., and Pabinger, I. (2016). FVIII-binding IgG modulates FVIII half-life in patients with severe and moderate hemophilia A without inhibitors. *Blood* 128, 293–296.
- Hough, C., Kamisue, S., Cameron, C., Notley, C., Tinlin, S., Giles, A., and Lillicrap, D. (2002). Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A: similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia. *Thromb. Haemost.* 87, 659–665.

- Hu, G., Guo, D., Key, N.S., and Conti-Fine, B.M. (2007). Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb. Haemost.* 97, 788–794.
- Hu, G.-L., Okita, D.K., and Conti-Fine, B.M. (2004). T cell recognition of the A2 domain of coagulation factor VIII in hemophilia patients and healthy subjects. *J. Thromb. Haemost. JTH* 2, 1908–1917.
- Iorio, A., Halimeh, S., Holzhauser, S., Goldenberg, N., Marchesini, E., Marcucci, M., Young, G., Bidlingmaier, C., Brandao, L.R., Ettingshausen, C.E., et al. (2010). Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J. Thromb. Haemost. JTH* 8, 1256–1265.
- Ironside, J.W. (2010). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 16 *Suppl* 5, 175–180.
- Jacquemin, M., Benhida, A., Peerlinck, K., Desqueper, B., Vander Elst, L., Lavend'homme, R., d'Oiron, R., Schwaab, R., Bakkus, M., Thielemans, K., et al. (2000). A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* 95, 156–163.
- Jacquemin, M., Neyrinck, A., Hermanns, M.I., Lavend'homme, R., Rega, F., Saint-Remy, J.-M., Peerlinck, K., Van Raemdonck, D., and Kirkpatrick, C.J. (2006). FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood* 108, 515–517.
- Jacquemin, M.G., Desqueper, B.G., Benhida, A., Vander Elst, L., Hoylaerts, M.F., Bakkus, M., Thielemans, K., Arnout, J., Peerlinck, K., Gilles, J.G., et al. (1998). Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* 92, 496–506.
- James, E.A., van Haren, S.D., Ettinger, R.A., Fijnvandraat, K., Liberman, J.A., Kwok, W.W., Voorberg, J., and Pratt, K.P. (2011). T-cell responses in two unrelated hemophilia A inhibitor subjects include an epitope at the factor VIII R593C missense site. *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 689–699.
- Jellusova, J., and Nitschke, L. (2011). Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors siglec-G and CD22. *Front. Immunol.* 2, 96.
- Jones, T.D., Phillips, W.J., Smith, B.J., Bamford, C.A., Nayee, P.D., Baglin, T.P., Gaston, J.S.H., and Baker, M.P. (2005). Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 991–1000.
- Kallas, A., Kuuse, S., Maimets, T., and Pooga, M. (2007). von Willebrand factor and transforming growth factor-beta modulate immune response against coagulation factor VIII in FVIII-deficient mice. *Thromb. Res.* 120, 911–919.
- Kannicht, C., Ramström, M., Kohla, G., Tiemeyer, M., Casademunt, E., Walter, O., and Sandberg, H. (2013). Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. *Thromb. Res.* 131, 78–88.
- Kaufman, R.J., Wasley, L.C., and Dorner, A.J. (1988). Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 263, 6352–6362.
- Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R.B., Sachs, D.H., and Cosimi, A.B. (2000). Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat. Med.* 6, 114.
- Kazatchkine, M.D., Sultan, Y., Burton-Kee, E.J., and Mowbray, J.F. (1980). Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A. *Clin. Exp. Immunol.* 39, 315–320.

- Kenny, J.J., Guelde, G., Hansen, C., and Mond, J.J. (1987). Synergistic effects of the *xid* gene in X chromosome congenic mice. I. Inability of C3.CBA/N mice to respond to thymus-dependent antigens in adoptive transfer assays. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *138*, 1363–1371.
- Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Müller, S., Kantor, A.B., and Herzenberg, L.A. (1995). Defective B cell development and function in *Btk*-deficient mice. *Immunity* *3*, 283–299.
- Kim, Y.C., Zhang, A.-H., Su, Y., Rieder, S.A., Rossi, R.J., Ettinger, R.A., Pratt, K.P., Shevach, E.M., and Scott, D.W. (2015). Engineered antigen-specific human regulatory T cells: immunosuppression of FVIII-specific T- and B-cell responses. *Blood* *125*, 1107–1115.
- Knöbl, P., and Derfler, K. (1999). Extracorporeal immunoabsorption for the treatment of haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX. *Vox Sang.* *77 Suppl 1*, 57–64.
- Koedam, J.A., Meijers, J.C., Sixma, J.J., and Bouma, B.N. (1988). Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* *82*, 1236–1243.
- Koedam, J.A., Hamer, R.J., Beeser-Visser, N.H., Bouma, B.N., and Sixma, J.J. (1990). The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur. J. Biochem.* *189*, 229–234.
- Koestenberger, M., Raith, W., and Muntean, W. (2000). High titre inhibitor after continuous factor VIII administration for surgery in a young infant. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *6*, 120.
- Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., and Kurosaki, T. (2013). Repression of the transcription factor *Bach2* contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* *39*, 136–147.
- Kurnik, K., Bidlingmaier, C., Engl, W., Chehadeh, H., Reipert, B., and Auerswald, G. (2010). New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *16*, 256–262.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 149–159.
- Lacroix-Desmazes, S., Moreau, A., Sooryanarayana, null, Bonnemain, C., Stieltjes, N., Pashov, A., Sultan, Y., Hoebeke, J., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (1999). Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat. Med.* *5*, 1044–1047.
- Lacroix-Desmazes, S., Misra, N., Bayry, J., Villard, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2002). Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A. *J. Immunol. Methods* *269*, 251–256.
- Lacroix-Desmazes, S., Navarrete, A.-M., André, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., and Dasgupta, S. (2008). Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* *112*, 240–249.
- Lafeber, F.P.J.G., Miossec, P., and Valentino, L.A. (2008). Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *14 Suppl 4*, 3–9.
- Lai, J.D., Moorehead, P.C., Sponagle, K., Steinitz, K.N., Reipert, B.M., Hough, C., and Lillicrap, D. (2016a). Concurrent influenza vaccination reduces anti-FVIII antibody responses in murine hemophilia A. *Blood* *127*, 3439–3449.
- Lai, J.D., Georgescu, M.T., Hough, C., and Lillicrap, D. (2016b). To clear or to fear: An innate perspective on factor VIII immunity. *Cell. Immunol.* *301*, 82–89.

- Lavergne, J.M., Meyer, D., and Reisner, H. (1976). Characterization of human anti-factor VIII antibodies purified by immune complex formation. *Blood* 48, 931–939.
- Lawson, J.H., Kalafatis, M., Stram, S., and Mann, K.G. (1994). A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J. Biol. Chem.* 269, 23357–23366.
- Lee, L.Y., Lin, C.-H., Fanayan, S., Packer, N.H., and Thaysen-Andersen, M. (2014). Differential site accessibility mechanistically explains subcellular-specific N-glycosylation determinants. *Front. Immunol.* 5, 404.
- Lee, S.J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A.F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y.C., Feizi, T., Langen, H., and Nussenzweig, M.C. (2002). Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295, 1898–1901.
- Leissingner, C., Josephson, C.D., Granger, S., Konkle, B.A., Kruse-Jarres, R., Ragni, M.V., Journeycake, J.M., Valentino, L., Key, N.S., Gill, J.C., et al. (2014). Rituximab for treatment of inhibitors in haemophilia A. A Phase II study. *Thromb. Haemost.* 112, 445–458.
- Lenting, P.J., Donath, M.J., van Mourik, J.A., and Mertens, K. (1994). Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J. Biol. Chem.* 269, 7150–7155.
- Lenting, P.J., Neels, J.G., van den Berg, B.M., Clijsters, P.P., Meijerman, D.W., Pannekoek, H., van Mourik, J.A., Mertens, K., and van Zonneveld, A.J. (1999). The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 274, 23734–23739.
- Lenting, P.J., Christophe, O.D., and Guéguen, P. (2010). The disappearing act of factor VIII. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 16, 6–15.
- Linehan, S.A., Martínez-Pomares, L., Stahl, P.D., and Gordon, S. (1999). Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189, 1961–1972.
- Liu, C.L., Ye, P., Lin, J., Djukovic, D., and Miao, C.H. (2014). Long-term tolerance to factor VIII is achieved by administration of interleukin-2/interleukin-2 monoclonal antibody complexes and low dosages of factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* 12, 921–931.
- Lollar, P., Hill-Eubanks, D.C., and Parker, C.G. (1988). Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 263, 10451–10455.
- Lorenzo, J.I., López, A., Altisent, C., and Aznar, J.A. (2001). Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *Br. J. Haematol.* 113, 600–603.
- Lövgren, K.M., Søndergaard, H., Skov, S., Weldingh, K.N., Tranholm, M., and Wiinberg, B. (2016a). Antibody response to recombinant human coagulation factor VIII in a new rat model of severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 14, 747–756.
- Lövgren, K.M., Søndergaard, H., Skov, S., and Wiinberg, B. (2016b). Joint bleeds increase the inhibitor response to human factor VIII in a rat model of severe haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 22, 772–779.
- Lozier, J.N., and Nichols, T.C. (2013). Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin. Hematol.* 50, 175–184.
- Lü, J., Pipe, S.W., Miao, H., Jacquemin, M., and Gilbert, G.E. (2011). A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood* 117, 3181–3189.

- Macauley, M.S., Pfrengle, F., Rademacher, C., Nycholat, C.M., Gale, A.J., von Drygalski, A., and Paulson, J.C. (2013). Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. *J. Clin. Invest.* *123*, 3074–3083.
- Macleay, P.S., Richards, M., Williams, M., Collins, P., Liesner, R., Keeling, D.M., Yee, T., Will, A.M., Young, D., Chalmers, E.A., et al. (2011). Treatment related factors and inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *17*, 282–287.
- Mahlangu, J., Powell, J.S., Ragni, M.V., Chowdary, P., Josephson, N.C., Pabinger, I., Hanabusa, H., Gupta, N., Kulkarni, R., Fogarty, P., et al. (2014). Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood* *123*, 317–325.
- Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 1177–1186.
- Martinez-Pomares, L., Hanitsch, L.G., Stillion, R., Keshav, S., and Gordon, S. (2005). Expression of mannose receptor and ligands for its cysteine-rich domain in venous sinuses of human spleen. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *85*, 1238–1249.
- Matzinger, P., and Kamala, T. (2011). Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 221–230.
- Mazurier, C., Dieval, J., Jorieux, S., Delobel, J., and Goudemand, M. (1990). A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood* *75*, 20–26.
- Medzihradzky, K.F., Besman, M.J., and Burlingame, A.L. (1997). Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* *69*, 3986–3994.
- Meeks, S.L., Cox, C.L., Healey, J.F., Parker, E.T., Doshi, B.S., Gangadharan, B., Barrow, R.T., and Lollar, P. (2012). A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. *Blood* *120*, 2512–2520.
- Meems, H., Meijer, A.B., Cullinan, D.B., Mertens, K., and Gilbert, G.E. (2009). Factor VIII C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 contribute to membrane binding and cofactor activity. *Blood* *114*, 3938–3946.
- Meems, H., van den Biggelaar, M., Rondaij, M., van der Zwaan, C., Mertens, K., and Meijer, A.B. (2011). C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 are of major importance for the endocytic uptake of coagulation factor VIII. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 1114–1121.
- Mei, B., Pan, C., Jiang, H., Tjandra, H., Strauss, J., Chen, Y., Liu, T., Zhang, X., Severs, J., Newgren, J., et al. (2010). Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. *Blood* *116*, 270–279.
- Meslier, Y., André, S., Dimitrov, J.D., Delignat, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2011). Bortezomib delays the onset of factor VIII inhibitors in experimental hemophilia A, but fails to eliminate established anti-factor VIII IgG-producing cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* *9*, 719–728.
- Miller, L., Weissmüller, S., Ringler, E., Crauwels, P., van Zandbergen, G., Seitz, R., Waibler, Z., and ABIRISK consortium (2015). Danger signal-dependent activation of human dendritic cells by plasma-derived factor VIII products. *Thromb. Haemost.* *114*, 268–276.
- Moghimi, B., Sack, B.K., Nayak, S., Markusic, D.M., Mah, C.S., and Herzog, R.W. (2011). Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. *J. Thromb. Haemost. JTH* *9*, 1524–1533.

- 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. Orlando Fla* 142, 320–331.
- Moser, K., Tokoyoda, K., Radbruch, A., MacLennan, I., and Manz, R.A. (2006). Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 265–270.
- Navarrete, A., Dasgupta, S., Delignat, S., Caligiuri, G., Christophe, O.D., Bayry, J., Nicoletti, A., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2009). Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 7, 1816–1823.
- Navarrete, A.-M., Dasgupta, S., Teyssandier, M., Repesse, Y., Delignat, S., André, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2010). Endocytic receptor for pro-coagulant factor VIII: relevance to inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* 104, 1093–1098.
- Naylor, J.A., Buck, D., Green, P., Williamson, H., Bentley, D., and Giannelli, F. (1995). Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1217–1224.
- Nesheim, M., Pittman, D.D., Giles, A.R., Fass, D.N., Wang, J.H., Slonosky, D., and Kaufman, R.J. (1991). The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets. *J. Biol. Chem.* 266, 17815–17820.
- Ngo, J.C.K., Huang, M., Roth, D.A., Furie, B.C., and Furie, B. (2008). Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 597–606.
- Nichols, W.C., Seligsohn, U., Zivelin, A., Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, M.A., Moussalli, M.J., Hauri, H.P., Ciavarella, N., Kaufman, R.J., et al. (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* 93, 61–70.
- Nielsen, L.N., Wiinberg, B., Häger, M., Holmberg, H.L., Hansen, J.J., Roepstorff, K., and Tranholm, M. (2014). A novel F8 -/- rat as a translational model of human hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 12, 1274–1282.
- Nilsson, I.M., Berntorp, E., and Zettervall, O. (1988). Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N. Engl. J. Med.* 318, 947–950.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.
- Nishino, M., Girma, J.P., Rothschild, C., Fressinaud, E., and Meyer, D. (1989). New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 74, 1591–1599.
- Noe, D.A. (1996). A mathematical model of coagulation factor VIII kinetics. *Haemostasis* 26, 289–303.
- Nogami, K., Shima, M., Nishiya, K., Sakurai, Y., Tanaka, I., Giddings, J.C., Saenko, E.L., and Yoshioka, A. (2002). Human factor VIII inhibitor alloantibodies with a C2 epitope inhibit factor Xa-catalyzed factor VIII activation: a new anti-factor VIII inhibitory mechanism. *Thromb. Haemost.* 87, 459–465.
- Nogami, K., Wakabayashi, H., and Fay, P.J. (2003). Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 16502–16509.
- Nogami, K., Shima, M., Matsumoto, T., Nishiya, K., Tanaka, I., and Yoshioka, A. (2007). Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: a crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J. Biol. Chem.* 282, 5287–5295.

- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 160–171.
- Ohtsuka, S., Ogawa, S., Wakamatsu, E., and Abe, R. (2016). Cell cycle arrest caused by MEK/ERK signaling is a mechanism for suppressing growth of antigen-hyperstimulated effector T cells. *Int. Immunol.*
- Oldenburg, J., and Pavlova, A. (2006). Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *12 Suppl 6*, 15–22.
- Oldenburg, J., Picard, J.K., Schwaab, R., Brackmann, H.H., Tuddenham, E.G., and Simpson, E. (1997). HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb. Haemost.* *77*, 238–242.
- Oldenburg, J., Schwaab, R., and Brackmann, H.H. (1999). Induction of immune tolerance in haemophilia A inhibitor patients by the “Bonn Protocol”: predictive parameter for therapy duration and outcome. *Vox Sang.* *77 Suppl 1*, 49–54.
- Oldenburg, J., Ananyeva, N.M., and Saenko, E.L. (2004). Molecular basis of haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *10 Suppl 4*, 133–139.
- O’Sullivan, J.M., Jenkins, P.V., Rawley, O., Gegenbauer, K., Chion, A., Lavin, M., Byrne, B., O’Kennedy, R., Preston, R.J.S., Brophy, T.M., et al. (2016). Galectin-1 and Galectin-3 Constitute Novel-Binding Partners for Factor VIII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *36*, 855–863.
- Øvlisen, K., Kristensen, A.T., and Tranholm, M. (2008). In vivo models of haemophilia - status on current knowledge of clinical phenotypes and therapeutic interventions. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *14*, 248–259.
- Pack, M., Trumpfheller, C., Thomas, D., Park, C.G., Granelli-Piperno, A., Münz, C., and Steinman, R.M. (2008). DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology* *123*, 438–446.
- Pandey, G.S., Yanover, C., Miller-Jenkins, L.M., Garfield, S., Cole, S.A., Curran, J.E., Moses, E.K., Rydz, N., Simhadri, V., Kimchi-Sarfaty, C., et al. (2013). Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22-inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A. *Nat. Med.* *19*, 1318–1324.
- Parmenter, C.D.J., Cane, M.C., Zhang, R., and Stoilova-McPhie, S. (2008). Cryo-electron microscopy of coagulation Factor VIII bound to lipid nanotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *366*, 288–293.
- Patek, A.J., and Taylor, F.H. (1937). HEMOPHILIA. II. SOME PROPERTIES OF A SUBSTANCE OBTAINED FROM NORMAL HUMAN PLASMA EFFECTIVE IN ACCELERATING THE COAGULATION OF HEMOPHILIC BLOOD. *J. Clin. Invest.* *16*, 113–124.
- Pautard, B., D’Oiron, R., Li Thiao Te, V., Lavend’homme, R., Saint-Remy, J.-M., Peerlinck, K., and Jacquemin, M. (2011). Successful immune tolerance induction by FVIII in hemophilia A patients with inhibitor may occur without deletion of FVIII-specific T cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* *9*, 1163–1170.
- Pavlova, A., Delev, D., Lacroix-Desmazes, S., Schwaab, R., Mende, M., Fimmers, R., Astermark, J., and Oldenburg, J. (2009). Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* *7*, 2006–2015.
- Pegon, J.N., Kurdi, M., Casari, C., Odouard, S., Denis, C.V., Christophe, O.D., and Lenting, P.J. (2012). Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* *97*, 1855–1863.

- Pellegrini, A., Guiñazú, N., Aoki, M.P., Calero, I.C., Carrera-Silva, E.A., Girones, N., Fresno, M., and Gea, S. (2007). Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *Int. Immunol.* *19*, 1395–1402.
- Pergantou, H., Varela, I., Moraloglou, O., Economou, M., Spanou, K., Kapsimali, Z., Constantinidou, N., and Platokouki, H. (2013). Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *19*, 706–710.
- Pescovitz, M.D. (2006). Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *6*, 859–866.
- Peyron, I., Dimitrov, J.D., Delignat, S., Gangadharan, B., Planchais, C., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2015). Haemarthrosis and arthropathy do not favour the development of factor VIII inhibitors in severe haemophilia A mice. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *21*, e94-98.
- Peyvandi, F., Garagiola, I., and Young, G. (2016a). The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet Lond. Engl.* *388*, 187–197.
- Peyvandi, F., Mannucci, P.M., Garagiola, I., El-Beshlawy, A., Elalfy, M., Ramanan, V., Eshghi, P., Hanagavadi, S., Varadarajan, R., Karimi, M., et al. (2016b). A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* *374*, 2054–2064.
- Pfistershammer, K., Stöckl, J., Siekmann, J., Turecek, P.L., Schwarz, H.P., and Reipert, B.M. (2006). Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb. Haemost.* *96*, 309–316.
- Pinto, P., Ghosh, K., and Shetty, S. (2012). Immune regulatory gene polymorphisms as predisposing risk factors for the development of factor VIII inhibitors in Indian severe haemophilia A patients. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *18*, 794–797.
- Pipe, S.W., Morris, J.A., Shah, J., and Kaufman, R.J. (1998). Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J. Biol. Chem.* *273*, 8537–8544.
- Pittman, D.D., Wang, J.H., and Kaufman, R.J. (1992). Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 3315–3325.
- Pittman, D.D., Tomkinson, K.N., and Kaufman, R.J. (1994). Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 17329–17337.
- Pontow, S.E., Kery, V., and Stahl, P.D. (1992). Mannose receptor. *Int. Rev. Cytol.* *137B*, 221–244.
- Poole, J.C. (1964). Structural aspects of thrombosis. *Sci. Basis Med. Annu. Rev.* *55–66*.
- Poole, S., Firtel, R.A., Lamar, E., and Rowekamp, W. (1981). Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* *153*, 273–289.
- Pradeu, T., Jaeger, S., and Vivier, E. (2013). The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 764–769.
- Puri, K.D., Di Paolo, J.A., and Gold, M.R. (2013). B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Int. Rev. Immunol.* *32*, 397–427.
- Purrello, M., Alhadeff, B., Esposito, D., Szabo, P., Rocchi, M., Truett, M., Masiarz, F., and Siniscalco, M. (1985). The human genes for hemophilia A and hemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3. *EMBO J.* *4*, 725–729.

- Qadura, M., Waters, B., Burnett, E., Chegeni, R., Bradshaw, S., Hough, C., Othman, M., and Lillicrap, D. (2009). Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood* *114*, 871–880.
- Qadura, M., Waters, B., Burnett, E., Chegeni, R., Hough, C., Othman, M., and Lillicrap, D. (2011). Immunoglobulin isotypes and functional anti-FVIII antibodies in response to FVIII treatment in Balb/c and C57BL/6 haemophilia A mice. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *17*, 288–295.
- Qian, J., Borovok, M., Bi, L., Kazazian, H.H., and Hoyer, L.W. (1999). Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb. Haemost.* *81*, 240–244.
- Qian, J., Collins, M., Sharpe, A.H., and Hoyer, L.W. (2000a). Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood* *95*, 1324–1329.
- Qian, J., Burkly, L.C., Smith, E.P., Ferrant, J.L., Hoyer, L.W., Scott, D.W., and Haudenschild, C.C. (2000b). Role of CD154 in the secondary immune response: the reduction of pre-existing splenic germinal centers and anti-factor VIII inhibitor titer. *Eur. J. Immunol.* *30*, 2548–2554.
- Rachmilewitz, J. (2010). Glycosylation: An intrinsic sign of “danger.” *Self/Nonsel* *1*, 250–254.
- Rankin, A.L., Seth, N., Keegan, S., Andreyeva, T., Cook, T.A., Edmonds, J., Mathialagan, N., Benson, M.J., Syed, J., Zhan, Y., et al. (2013). Selective inhibition of BTK prevents murine lupus and antibody-mediated glomerulonephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 4540–4550.
- Rawle, F.E., Pratt, K.P., Labelle, A., Weiner, H.L., Hough, C., and Lillicrap, D. (2006). Induction of partial immune tolerance to factor VIII through prior mucosal exposure to the factor VIII C2 domain. *J. Thromb. Haemost. JTH* *4*, 2172–2179.
- Rawlings, D.J., Saffran, D.C., Tsukada, S., Largaespada, D.A., Grimaldi, J.C., Cohen, L., Mohr, R.N., Bazan, J.F., Howard, M., and Copeland, N.G. (1993). Mutation of unique region of Bruton’s tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* *261*, 358–361.
- Reding, M.T., Wu, H., Krampf, M., Okita, D.K., Diethelm-Okita, B.M., Christie, B.A., Key, N.S., and Conti-Fine, B.M. (2000). Sensitization of CD4+ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb. Haemost.* *84*, 643–652.
- Reding, M.T., Okita, D.K., Diethelm-Okita, B.M., Anderson, T.A., and Conti-Fine, B.M. (2003). Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* *1*, 1777–1784.
- Reding, M.T., Okita, D.K., Diethelm-Okita, B.M., Anderson, T.A., and Conti-Fine, B.M. (2004). Epitope repertoire of human CD4(+) T cells on the A3 domain of coagulation factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* *2*, 1385–1394.
- Reipert, B.M. (2016). B-cell memory against factor VIII. *Cell. Immunol.* *301*, 49–58.
- Reipert, B.M., Ahmad, R.U., Turecek, P.L., and Schwarz, H.P. (2000). Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. *Thromb. Haemost.* *84*, 826–832.
- Reipert, B.M., Sasgary, M., Ahmad, R.U., Auer, W., Turecek, P.L., and Schwarz, H.P. (2001). Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. *Thromb. Haemost.* *86*, 1345–1352.
- Repešé, Y., Dasgupta, S., Navarrete, A.-M., Delignat, S., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2012). Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 1172–1173–1175.

- Repeššé, 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.
- Robbins, S.H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., et al. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9, R17.
- Rosner, F. (1969). Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann. Intern. Med.* 70, 833–837.
- Rossi, G., Sarkar, J., and Scandella, D. (2001). Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood* 97, 2750–2757.
- Rowley, R.B., Burkhardt, A.L., Chao, H.G., Matsueda, G.R., and Bolen, J.B. (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 11590–11594.
- Rydz, N., Swystun, L.L., Notley, C., Paterson, A.D., Riches, J.J., Sponagle, K., Boonyawat, B., Montgomery, R.R., James, P.D., and Lillicrap, D. (2013). The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood* 121, 5228–5237.
- Saenko, E.L., and Scandella, D. (1995). A mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 270, 13826–13833.
- Saenko, E.L., and Scandella, D. (1997). The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 272, 18007–18014.
- Saenko, E.L., Shima, M., Rajalakshmi, K.J., and Scandella, D. (1994). A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 269, 11601–11605.
- Saenko, E.L., Scandella, D., Yakhyayev, A.V., and Greco, N.J. (1998). Activation of factor VIII by thrombin increases its affinity for binding to synthetic phospholipid membranes and activated platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 27918–27926.
- Saenko, E.L., Yakhyayev, A.V., Mikhailenko, I., Strickland, D.K., and Sarafanov, A.G. (1999). Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 37685–37692.
- Saint-Remy, J.M., Jacquemin, M.G., and Gilles, J.G. (1999). Anti-idiotypic antibodies: from regulation to therapy of factor VIII inhibitors. *Vox Sang.* 77 Suppl 1, 21–24.
- Sakurai, Y., Shima, M., Tanaka, I., Fukuda, K., Yoshida, K., and Yoshioka, A. (2004). Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. *Haematologica* 89, 696–703.
- Santagostino, E. (2013). More than a decade of international experience with a pdFVIII/VWF concentrate in immune tolerance. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 19 Suppl 1, 8–11.
- Sarafanov, A.G., Ananyeva, N.M., Shima, M., and Saenko, E.L. (2001). Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 276, 11970–11979.
- Sarafanov, A.G., Makogonenko, E.M., Pechik, I.V., Radtke, K.-P., Khrenov, A.V., Ananyeva, N.M., Strickland, D.K., and Saenko, E.L. (2006). Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 1829–1840.

- Scandella, D. (1996). Human anti-factor VIII antibodies: epitope localization and inhibitory function. *Vox Sang.* *70 Suppl 1*, 9–14.
- Schambeck, C.M., Grossmann, R., Zonnur, S., Berger, M., Teuchert, K., Spahn, A., and Walter, U. (2004). High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. *Thromb. Haemost.* *92*, 42–46.
- Schwaab, R., Brackmann, H.H., Meyer, C., Seehafer, J., Kirchgesser, M., Haack, A., Olek, K., Tuddenham, E.G., and Oldenburg, J. (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* *74*, 1402–1406.
- Scott, D.W. (2014). Inhibitors - cellular aspects and novel approaches for tolerance. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *20 Suppl 4*, 80–86.
- Segura, E., Albiston, A.L., Wicks, I.P., Chai, S.Y., and Villadangos, J.A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20377–20381.
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* *38*, 336–348.
- Shahani, T., Covens, K., Lavend'homme, R., Jazouli, N., Sokal, E., Peerlinck, K., and Jacquemin, M. (2014). Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* *12*, 36–42.
- Sherman, A., Su, J., Lin, S., Wang, X., Herzog, R.W., and Daniell, H. (2014). Suppression of inhibitor formation against FVIII in a murine model of hemophilia A by oral delivery of antigens bioencapsulated in plant cells. *Blood* *124*, 1659–1668.
- Sinclair, A.M., and Elliott, S. (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.* *94*, 1626–1635.
- Singer, S.T., Addiego, J.E., Reason, D.C., and Lucas, A.H. (1996). T lymphocyte proliferative responses induced by recombinant factor VIII in hemophilia A patients with inhibitors. *Thromb. Haemost.* *76*, 17–22.
- Skupsky, J., Zhang, A.-H., Su, Y., and Scott, D.W. (2009). A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* *114*, 4741–4748.
- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* *8*, 363–372.
- Smith, C.I., Baskin, B., Humire-Greiff, P., Zhou, J.N., Olsson, P.G., Maniar, H.S., Kjellén, P., Lambris, J.D., Christensson, B., and Hammarström, L. (1994). Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *152*, 557–565.
- Sorvillo, N., Hartholt, R.B., Bloem, E., Sedek, M., ten Brinke, A., van der Zwaan, C., van Alphen, F.P., Meijer, A.B., and Voorberg, J. (2016). von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica* *101*, 309–318.
- Stahl, P.D., and Ezekowitz, R.A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* *10*, 50–55.
- Steinitz, K.N., van Helden, P.M., Binder, B., Wraith, D.C., Unterthurner, S., Hermann, C., Schuster, M., Ahmad, R.U., Weiller, M., Lubich, C., et al. (2012). CD4+ T-cell epitopes associated with antibody

responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1*1501 mice. *Blood* 119, 4073–4082.

Strait, R.T., Posgai, M.T., Mahler, A., Barasa, N., Jacob, C.O., Köhl, J., Ehlers, M., Stringer, K., Shanmukhappa, S.K., Witte, D., et al. (2015). IgG1 protects against renal disease in a mouse model of cryoglobulinaemia. *Nature* 517, 501–504.

Swaroop, M., Moussalli, M., Pipe, S.W., and Kaufman, R.J. (1997). Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J. Biol. Chem.* 272, 24121–24124.

Taylor, R.P., and Lindorfer, M.A. (2007). Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease--the immune complex decoy hypothesis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3, 86–95.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 901–944.

Tiede, A., Brand, B., Fischer, R., Kavakli, K., Lentz, S.R., Matsushita, T., Rea, C., Knobe, K., and Viuff, D. (2013). Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 11, 670–678.

Tobinai, K., Kobayashi, Y., Narabayashi, M., Ogura, M., Kagami, Y., Morishima, Y., Ohtsu, T., Igarashi, T., Sasaki, Y., Kinoshita, T., et al. (1998). Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. The IDEC-C2B8 Study Group. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 9, 527–534.

Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 975–1028.

Tsukada, S., Saffran, D.C., Rawlings, D.J., Parolini, O., Allen, R.C., Klisak, I., Sparkes, R.S., Kubagawa, H., Mohandas, T., and Quan, S. (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72, 279–290.

Tsukada, S., Saffran, D.C., Rawlings, D.J., Parolini, O., Allen, R.C., Klisak, I., Sparkes, R.S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S., et al. (2012). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. 1993. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 2936–2947.

Vehar, G.A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D.P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W.I., Harkins, R.N., et al. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature* 312, 337–342.

Veltkamp, J.J., Asfaou, E., van de Torren, K., van der Does, J.A., van Tilburg, N.H., and Pauwels, E.K. (1974). Extrahepatic factor VIII synthesis. Lung transplants in hemophilic dogs. *Transplantation* 18, 56–62.

Verbruggen, B., Novakova, I., Wessels, H., Boezeman, J., van den Berg, M., and Mauser-Bunschoten, E. (1995). The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb. Haemost.* 73, 247–251.

Viel, K.R., Ameri, A., Abshire, T.C., Iyer, R.V., Watts, R.G., Lutcher, C., Channell, C., Cole, S.A., Fernstrom, K.M., Nakaya, S., et al. (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N. Engl. J. Med.* 360, 1618–1627.

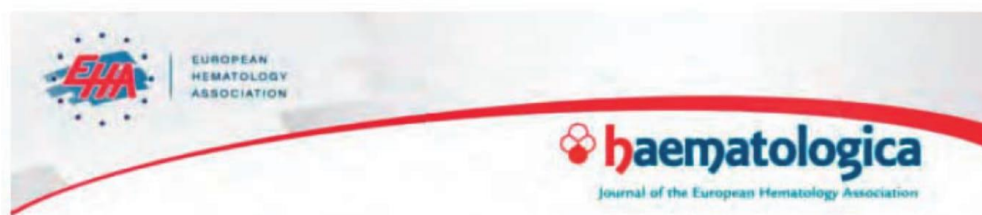
Villaudy, J., Schotte, R., Legrand, N., and Spits, H. (2014). Critical assessment of human antibody generation in humanized mouse models. *J. Immunol. Methods* 410, 18–27.

- Vinuesa, C.G., Sunners, Y., Pongracz, J., Ball, J., Toellner, K.M., Taylor, D., MacLennan, I.C., and Cook, M.C. (2001). Tracking the response of Xid B cells in vivo: T1-2 antigen induces migration and proliferation but Btk is essential for terminal differentiation. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1340–1350.
- Vormittag, R., Bencur, P., Ay, C., Tengler, T., Vukovich, T., Quehenberger, P., Mannhalter, C., and Pabinger, I. (2007). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C > T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost. JTH* *5*, 497–502.
- Wakabayashi, H., and Fay, P.J. (2008). Identification of residues contributing to A2 domain-dependent structural stability in factor VIII and factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* *283*, 11645–11651.
- Waters, B., and Lillicrap, D. (2009). The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* *7*, 1446–1456.
- Waters, B., Qadura, M., Burnett, E., Chegeni, R., Labelle, A., Thompson, P., Hough, C., and Lillicrap, D. (2009). Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response. *Blood* *113*, 193–203.
- Webster, W.P., Roberts, H.R., Thelin, G.M., Wagner, R.H., and Brinkhous, K.M. (1965). Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. *Am. J. Med. Sci.* *250*, 643–651.
- Weiss, H.J., Sussman, I.I., and Hoyer, L.W. (1977). Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* *60*, 390–404.
- Werwitzke, S., Vollack, N., von Hornung, M., Kalippke, K., Kutzschbach, J., Trummer, A., Ganser, A., and Tiede, A. (2015). Deletion or inhibition of Fc gamma receptor 2B (CD32) prevents FVIII-specific activation of memory B cells in vitro. *Thromb. Haemost.* *114*, 1127–1135.
- Whelan, S.F.J., Hofbauer, C.J., Horling, F.M., Allacher, P., Wolfsegger, M.J., Oldenburg, J., Male, C., Windyga, J., Tiede, A., Schwarz, H.P., et al. (2013). Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood* *121*, 1039–1048.
- Wight, J., and Paisley, S. (2003). The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *9*, 418–435.
- Wion, K.L., Kelly, D., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G., and Lawn, R.M. (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* *317*, 726–729.
- Wood, P., and Elliott, T. (1998). Glycan-regulated antigen processing of a protein in the endoplasmic reticulum can uncover cryptic cytotoxic T cell epitopes. *J. Exp. Med.* *188*, 773–778.
- Wood, W.I., Capon, D.J., Simonsen, C.C., Eaton, D.L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P.H., Smith, D.H., Hollingshead, P., Wion, K.L., et al. (1984). Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* *312*, 330–337.
- Wroblewska, A., van Haren, S.D., Herczenik, E., Kaijen, P., Ruminska, A., Jin, S.-Y., Zheng, X.L., van den Biggelaar, M., ten Brinke, A., Meijer, A.B., et al. (2012). Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood* *119*, 5294–5300.
- Wroblewska, A., Reipert, B.M., Pratt, K.P., and Voorberg, J. (2013). Dangerous liaisons: how the immune system deals with factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* *11*, 47–55.

- Yee, A., Oleskie, A.N., Dosey, A.M., Kretz, C.A., Gildersleeve, R.D., Dutta, S., Su, M., Ginsburg, D., and Skiniotis, G. (2015). Visualization of an N-terminal fragment of von Willebrand factor in complex with factor VIII. *Blood* *126*, 939–942.
- Zelechowska, M.G., van Mourik, J.A., and Brodniewicz-Proba, T. (1985). Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature* *317*, 729–730.
- Zhang, A.-H., Skupsky, J., and Scott, D.W. (2011). Effect of B-cell depletion using anti-CD20 therapy on inhibitory antibody formation to human FVIII in hemophilia A mice. *Blood* *117*, 2223–2226.
- Zhang, A.-H., Rossi, R.J., Yoon, J., Wang, H., and Scott, D.W. (2016). Tolerogenic nanoparticles to induce immunologic tolerance: Prevention and reversal of FVIII inhibitor formation. *Cell. Immunol.* *301*, 74–81.
- Zhang, B., Cunningham, M.A., Nichols, W.C., Bernat, J.A., Seligsohn, U., Pipe, S.W., McVey, J.H., Schulte-Overberg, U., de Bosch, N.B., Ruiz-Saez, A., et al. (2003). Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. *Nat. Genet.* *34*, 220–225.
- Zhang, F., Ren, S., and Zuo, Y. (2014). DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin: C-type lectins for infection. *Int. Rev. Immunol.* *33*, 54–66.
- Zheng, C., Liu, H., Zhou, J., and Zhang, B. (2010). EF-hand domains of MCFD2 mediate interactions with both LMAN1 and coagulation factor V or VIII. *Blood* *115*, 1081–1087.

ANNEXES

Published Ahead of Print on October 6, 2016, as doi:10.3324/haematol.2016.148502.
Copyright 2016 Ferrata Storti Foundation.



The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells

by Bagirath Gangadharan, Mathieu Ing, Sandrine Delignat, Ivan Peyron, Maud Teyssandier, Srinivas V. Kaveri, and Sébastien Lacroix-Desmazes

Haematologica 2016 [Epub ahead of print]

Citation: Gangadharan B, Ing M, Delignat S, Peyron I, Teyssandier M, Kaveri SV, and Lacroix-Desmazes S. The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells.

Haematologica. 2016; 101:xxx

doi:10.3324/haematol.2016.148502

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Title: The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells

Running title: Immunogenic factor VIII uptake

Bagirath Gangadharan,^{1,2,3*} Mathieu Ing,^{1,2,3*} Sandrine Delignat,^{1,2,3} Ivan Peyron,^{1,2,3} Maud Teyssandier,^{1,2,3} Srinivas V Kaveri,^{1,2,3} Sébastien Lacroix-Desmazes^{1,2,3}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France; ²INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France; ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France.

Corresponding author: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France - Tel: 01 44 27 82 02 - Fax: 01 44 27 81 94

Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count

Words in abstract: 254

Words in text: 4585

Number of B&W figures: 5

Number of color figure: 0

Number of supplementary figures: 5

Number of references: 48

* shared authorship

Abstract

The development of inhibitory antibodies to therapeutic FVIII is the major complication of replacement therapy in patients with hemophilia A. The first step in the initiation of the anti-FVIII immune response is FVIII interaction with receptor(s) on antigen-presenting cells followed by endocytosis and presentation to naïve CD4+ T cells. Recent studies indicate a role for the C1 domain in FVIII uptake. We investigated whether charged residues in the C2 domain participate in immunogenic FVIII uptake. Co-incubation of FVIII with BO2C11, a monoclonal C2-specific IgG, reduced FVIII endocytosis by dendritic cells and presentation to CD4+ T cells, and diminished FVIII immunogenicity in FVIII-deficient mice. Mutation of basic residues within the BO2C11 epitope of C2 replicated reduced *in vitro* immunogenic uptake, but failed to prevent FVIII immunogenicity in mice. BO2C11 prevents FVIII binding to von Willebrand factor, thus potentially biasing FVIII immunogenicity by perturbing its half-life. Interestingly, a FVIII^{Y1680C} mutant, that does not bind VWF, demonstrated unaltered endocytosis by dendritic cells as well as immunogenicity in FVIII-deficient mice. Co-incubation of FVIII^{Y1680C} with BO2C11 however resulted in decreased FVIII immunogenicity *in vivo*. Besides, a previously described triple C1 mutant showed decreased uptake *in vitro*, and reduced immunogenicity *in vivo*, but only in the absence of endogenous von Willebrand factor. Taken together, the results indicate that residues in the C1 and/or C2 domains of FVIII are implicated in immunogenic FVIII uptake, at least *in vitro*. Conversely, *in vivo*, the binding to endogenous von Willebrand factor masks the reducing effect of mutations in the C domains on FVIII immunogenicity.

Keywords: Hemophilia A, factor VIII, FVIII inhibitors, FVIII endocytosis, immunogenicity of protein therapeutics

Introduction

Hemophilia A is a monogenic disorder associated with mutations causing reductions in functional levels of coagulation factor VIII (FVIII). FVIII consists of a heavy chain (A1-a1-A2-a2-B domain) and a light chain (a3-A3-C1-C2) held together by non-covalent interactions (1). It rapidly associates with von Willebrand factor (VWF) in blood and this interaction is necessary for maintaining its circulatory half-life (2). Current treatment for FVIII deficiency requires prophylactic infusions of plasma-derived or recombinant FVIII. However, up to 30% of patients with severe hemophilia A develop an anti-FVIII immune response rendering treatment ineffective (3). Development of anti-FVIII antibody responses is dependent on T helper cells, requiring antigen uptake and presentation by antigen-presenting cells (APCs) (4). Hence, understanding the initial steps involved in FVIII capture by APCs may provide novel strategies to prevent the onset of the immune response.

Several groups including ours have investigated the endocytic pathways involved in FVIII uptake. Candidate receptors such as macrophage mannose receptor (MMR, CD206), low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP, CD91), or other receptor-associated protein (RAP)-sensitive receptors have been proposed (5-10). Equally, the nature of the residues within FVIII domain(s) that contribute to these interactions is also an area of active investigation. Albeit these efforts, the *in vivo* relevance of these receptors and the nature of the FVIII residues involved in FVIII uptake remain unclear. Recently, Herczenik *et al.* (10) demonstrated that KM33, a human C1 domain-specific monoclonal IgG, inhibits FVIII endocytosis by monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) or mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). KM33 engages K2092, F2093 and R2090 residues, involved in the interactions with phospholipid membrane surfaces (11). Additionally, KM33 inhibits interactions of the C1 domain with membrane surfaces, VWF and LRP (12). FVIII uptake by LRP in MoDCs, used as model APCs, has been ruled out (8), while a role for CD206 has been controversially documented (7, 9, 10). This suggests that FVIII uptake by APCs may involve other endocytic receptor(s). Importantly, FVIII mutants containing alanine substitutions of the K2092, F2093 and R2090 C1 residues exhibit diminished uptake *in*

vitro and reduced immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A (11). Together, these results point to the significance of membrane-binding residues within the C1 domain for FVIII uptake both *in vitro* and *in vivo*. Similar to the C1 domain, the C2 domain of FVIII interacts with phospholipid membrane surface, a binding that involves several basic residues (13).

In this study, we investigated whether membrane-interacting residues within the C2 domain of FVIII are involved in FVIII uptake. We first show that BO2C11, a well-characterized human monoclonal IgG that engages membrane-binding residues in the C2 domain (14), inhibits FVIII uptake and presentation *in vitro*, and reduces FVIII immunogenicity *in vivo*. We also demonstrate that this reduced immunogenicity is independent of FVIII ability to interact with endogenous VWF. Additionally, by site-directed mutagenesis, we demonstrate that the R2215 residue, which is part of the BO2C11 epitope, is implicated in the cellular uptake of FVIII by APCs *in vitro*. Together with the published data, our results suggest a potential synergy between membrane-binding residues in both the C1 and C2 domains of FVIII in mediating FVIII recognition or uptake by APCs *in vitro*. Furthermore, we also demonstrate that FVIII C domain mutations exhibit diminished immunogenicity *in vivo* only in the absence of endogenous VWF.

Methods

Reagents

Recombinant human FVIII (Refacto) was from Pfizer (New York, NY, USA). Murine GM-CSF and IL-4 were from Cellgenix Technology Transfer (Freiburg, Germany). The monoclonal mouse anti-FVIII (mAb6), the human anti-A2 (BO2BII) and anti-C2 (BO2C11) domains antibodies were a kind gift from Drs JM Saint-Remy and M Jacquemin, KUL, Leuven, Belgium). The monoclonal human-derived anti-C1 (KM33) was a gift from Dr J Voorberg (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands). The mouse monoclonal anti-A2 domain (GMA-8015) and anti-C2 domain (ESH8) antibodies were purchased from Green Mountain Antibodies (Burlington, VT, USA) and Sekisui Diagnostics (Kings Hill, United Kingdom), respectively. Biotin-labeled GMA-8015 was prepared upon incubation with a 20-fold molar excess of EZ-

Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) for 30 min at room temperature, and removal of excess biotin by diafiltration using 30 kDa Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). BO2C11 Fab or F(ab')₂ fragments were digested by papain or pepsin following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Production and purification of recombinant mutated or wild-type FVIII

cDNA encoding human B domain-deleted (BDD) FVIII (FVIII^{HSQ}), containing the 14-amino acid segment SFSQNPPVLKRHRQ in place of the B domain, cloned in the ReNeo mammalian expression plasmid with a geneticin resistance, has been described previously (15). The cDNA encoding FVIII^{HSQ} was used as a template to generate the R2215A, R2220A, R2215A-R2220A, R2090A-K2092A-F2093A and Y1680C FVIII mutants by splicing-by-overlap extension mutagenesis as described in Supplemental methods. Presence of the mutations was confirmed by standard sequencing analysis. The stable expression of wild-type and mutated FVIII by baby hamster kidney-derived cells, and FVIII purification were performed as described in Supplemental Methods. The concentration of purified wild-type and mutated FVIII was calculated by absorbance at 280 nm using a molar extinction coefficient of 256,300 M⁻¹cm⁻¹ and a molecular weight of 165,300 Da. Specific activities were estimated in a one-stage clotting assay and ranged between 4800-9000 IU/mg. The SDS-PAGE migration profiles of the different purified recombinant FVIII are shown in Supplementary Fig. 1. In parallel, the ability of the different FVIII molecules to generate activated factor X was assessed in a chromogenic assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany).

FVIII binding to VWF and monoclonal antibodies

Ninety-six-well ELISA plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with human plasma-derived VWF (Wilfactin, LFB, Les Ulis, France), BO2C11, BO2BII, ESH8 or KM33 at 1 µg/ml in

bicarbonate buffer, pH 9.5 for 1 hr at 37°C. Wells were blocked with 20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20 and 5% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4. Wild-type and mutated FVIII were then diluted in blocking buffer and incubated in the coated wells for 1 hr at 37°C. Bound FVIII was revealed using either biotinylated GMA-8015 (1 µg/ml), followed by streptavidin coupled to horseradish peroxidase (R&D systems, Lille, France) or, in the case of BO2BII-bound FVIII with ESH8 followed by a horseradish peroxidase-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Anaheim, CA, USA) and the o-Phenylenediamine Dihydrochloride substrate (OPD, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Absorbance was read at 492 nm.

Generation of immature human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) and mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)

Monocytes were isolated from the blood of healthy donors using anti-CD14⁺ magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France). Ethical committee permission was obtained for the use of buffy bags from healthy donors. Monocytes ($0.5 \cdot 10^6$ cells/ml) were cultured in RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Belgium) with 10% fetal calf serum (Life Technologies, Saint-Aubin, France), supplemented with GM-CSF (1000 IU/ 10^6 cells) and IL-4 (500 IU/ 10^6 cells) (Miltenyi Biotec) for 5 days to generate immature MoDCs. After 5 days, the differentiation of MoDCs (<90% purity) was confirmed by flow cytometry upon loss of CD14 staining (M5E2 clone, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), expression of MHC II and CD1a (HI149 and G46.6 clones respectively, BD Pharmingen). Acquisition was performed on a LSR II cytometer with FACSDiva software (version 6.1, BD Biosciences, Le Pont au Claix, France). Murine BMDCs were generated as described previously (16). Briefly, bone marrow cells were extracted from FVIII exon 16 knock-out C57BL/6 mice and cultured in Petri dishes ($2 \cdot 10^6$ cells/10 ml/plate) for 10 days in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 50 mM 2-mercaptoethanol and 200 U/ml murine recombinant GM-CSF (Cellgenix Technology Transfer, Freiburg, Germany). Supplemented medium was

replaced at day 3, 6 and 8. BMDCs purity and phenotype were validated by the expression of CD11c (HL3 clone, BD Pharmingen).

***In vitro* FVIII uptake by immature MoDCs and BMDCs**

B domain-deleted FVIII (20 nM) was pre-incubated with equimolar concentrations of ESH8, BO2C11 or with a 2 molar excess BO2C11 Fab fragments for 30 min at 37°C. Samples were then incubated with 5 day-old immature MoDCs or with 9 day-old immature BMDCs ($0.2 \cdot 10^6$ cells/100 μ l) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium for 30 min at 37°C or 4°C. Cells were washed with ice-cold phosphate buffer saline and fixed with BD Cytotfix Fixation buffer (BD Biosciences) for 20 min at 4°C. Cells were then permeabilized for 30 min at room temperature with permeabilization buffer (eBiosciences) and FVIII was stained using biotinylated GMA-8015 (2 μ g/ml), followed by streptavidin-PE (1 μ g/ml, BD Biosciences) for 30 min at room temperature. Cells were analyzed by flow cytometry. The uptake was quantified as the difference in median fluorescence intensities between 37°C and 4°C (Δ MFI_{37°C-4°C}) to exclude the signal generated by the binding of FVIII to the cell surface.

***In vitro* activation of a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted mouse CD4+ T cell hybridoma**

Activation of the HLA-DRB1*0101-restricted mouse CD4+ T-cell hybridoma specific for human FVIII (1G8-A2), was assessed as previously described (17). FVIII (10 nM) pre-incubated or not with 2 molar excess of BO2C11 was incubated with 10,000 MoDCs or 200,000 mitomycin C-treated mouse splenocytes from SureL1 mice and co-cultured with 100,000 T cells in X-VIVO¹⁵ medium (Life Technologies) for 18 hr at 37°C. Controls included T cells incubated alone, or incubated with MoDCs/BMDCs in the presence of concanavalin A (2 μ g/ml, Sigma-Aldrich) or in the absence of FVIII. Levels of interleukine-2 (IL-2) secreted in the supernatant by T cells were assessed using BD OptEIA™ mouse IL-2 ELISA set (BD Biosciences). Of note, MoDCs do not produce IL-2 when incubated with FVIII alone (18).

Animals and administration of FVIII

Eight to 12 week-old FVIII exon 16 knock-out C57bl/6 mice and VWF/FVIII exon 16 double knock-out C57Bl/6 (Pr. H.H. Kazazian ,University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA, and Dr. C Denis and O Christophe, INSERM U770, Le Kremlin-Bicêtre, France, respectively), were injected intravenously once a week for 4 weeks with either i) B domain deleted FVIII (0.2 µg, Refacto, Pfizer) preincubated with equimolar amounts of F(ab')₂ fragments of an IgG4 isotype control or BO2C11, ii) B domain-deleted FVIII^{Y1680C} (0.4 µg) alone or pre-incubated with Fab fragments of BO2C11, or iii) B domain-deleted FVIII^{HSQ}, FVIII^{Cl} or FVIII^{R2215-20A} (0.5 or 1 µg). Presence of endotoxins in the different recombinant FVIII was evaluated using the ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript, Piscataway, NJ, USA). The measured values were below the accepted threshold (i.e., <0.01 ng endotoxin/20 g mouse weight). Blood was collected on heparinized capillaries by retro-orbital bleeding 4 days after the 4th administration of FVIII. Plasma was collected and kept at -80°C until use. Mice were handled in agreement with French ethical authorities (authorization #23BA53).

Titration of anti-FVIII IgG and FVIII inhibitors

ELISA plates were coated with FVIII (1 µg/ml, Recombinate®, Baxter, Maurepas, France), in bicarbonate buffer pH 9.5, overnight at 4°C. After blocking with PBS, 0.05% Tween 20, 2% BSA, mouse plasma was incubated for 1 hr at 37°C. Serial dilutions of the samples were incubated for 1 hr at 37°C and bound IgG were revealed using a horseradish peroxidase-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech) and the OPD substrate. Absorbance was read at 492 nm. The monoclonal mouse anti-human FVIII IgG mAb6 was used as a standard. Titers are expressed in arbitrary units (A.U.). Inhibitory titers were estimated by incubating heat-inactivated mouse plasma with human standard plasma (Siemens Healthcare Diagnostics) for 2 hr at 37°C. The residual FVIII pro-coagulant activity was measured using a chromogenic assay, as explained above. Results are expressed in Bethesda units

(BU)/ml that correspond to the reciprocal dilution of the mouse plasma that yielded 50% residual FVIII activity.

***In vivo* clearance of wild-type and mutated FVIII**

FVIII exon 16 knock-out and VWF/FVIII exon 16 double knock-out C57Bl/6 mice were injected intravenously with wild-type and mutated FVIII (10 nM in 100 μ l). Blood was collected in 0.129 M sodium citrate at different time points after FVIII administration. FVIII residual levels in mouse plasma were determined by sandwich ELISA using ESH8 and biotinylated GMA-8015 as capture and detection antibodies, as described above. Data are plotted as a percentage of the initial FVIII level, measured 5 minutes after FVIII infusion, versus time (mean \pm SEM). Values at 5 min post-injection did not differ between the groups of mice treated with the different FVIII. Experimental data was fitted with a one-phase exponential decay equation using GraphPad Prism software (version 6.01).

Results

FVIII bound to BO2C11 induces diminished immune responses *in vivo*

We first evaluated whether BO2C11, a human C2-specific anti-FVIII IgG, inhibits FVIII uptake by MoDCs or BMDCs *in vitro*. We hypothesized that the uptake is restricted within the BO2C11 binding region (14) and thus, as a control, employed another C2-specific antibody ESH8. ESH8 does not compete for BO2C11 epitope and, unlike BO2C11, does not inhibit FVIII binding to VWF or phosphatidylserine membrane surfaces (19). We incubated 20 nM FVIII or FVIII pre-incubated with equimolar concentrations of anti-C2 antibodies prior to incubation with MoDCs or BMDCs. Additionally, we evaluated the inhibition by pre-incubating with a 2-fold molar excess of the Fab fragments of BO2C11. Following the addition of BO2C11 or the corresponding Fab fragments, we observed over 70% reduction in FVIII internalization by MoDCs (Fig. 1A) and about 30% reduction in the case of BMDCs (Supplementary Fig. 2A). Addition of ESH8 did not reduce FVIII uptake by MoDCs. Similarly, BO2C11

or Fab of BO2C11 inhibited FVIII presentation to an HLA-DR1-restricted CD4+ T-cell hybridoma by more than 80% in the case of both MoDCs (Fig. 1B) and splenocytes purified from HLA-DR1 Tg SURE-L1 mice (Supplementary Fig. 2B), used as sources of APCs. Together, our results implicate a role for C2 membrane-binding residues in FVIII uptake by APCs. We next investigated the effect of BO2C11 on FVIII immunogenicity *in vivo*. We administered FVIII pre-incubated with F(ab')₂ of an isotype control or of BO2C11 for four weeks at weekly intervals. After 4 weeks, BO2C11-bound FVIII exhibited diminished immunogenicity compared to the isotype control-treated mice (Fig. 1C).

Characterization of FVIII variants mutated in the BO2C11 epitope

We generated FVIII variants wherein the two arginine residues located at position 2215 and 2220 that belong to the BO2C11 epitope, are mutated to alanine residues. The purified FVIII mutants exhibited specific activities between 4800-8000 IU/mg (Fig. 2A) similar to that of non-mutated FVIII (FVIII^{HSQ}). Substitutions at either R2215 or R2220 did not alter binding to VWF, while substitution of both R2215 and R2220 lead to a marginally reduced binding to VWF (Fig. 2B). Substitutions at R2215 or R2220 resulted in diminished binding to BO2C11 (Fig. 2C), with substitution at R2220 resulting in a near complete inhibition of FVIII interaction with BO2C11. Double mutation of these residues (FVIII^{R2215-20A}) provided little additional benefit, confirming that R2220 contributes to most of the binding to BO2C11. Importantly, these FVIII variants retained binding to antibodies targeting other domains of FVIII. In particular, the mutations did not have significant effects on the ability of FVIII to interact with ESH8 (mouse anti-C2 IgG), BO2BII (human anti-A2 IgG) or KM33 (human anti-C1 IgG, Fig. 2D-F). Recently, the three residues R2090A/F2092A/K2093A in the FVIII C1 domain that belong to the KM33 epitope, were implicated in FVIII uptake (11). Hence, as a control, we generated the R2090A/F2092A/K2093A FVIII mutant, referred to as “FVIII^{C1}”. As expected, FVIII^{C1} showed drastically reduced binding to KM33 (Fig. 2F), and unaltered binding to BO2C11 and ESH8 (Fig. 2C-D).

C2 domain residues are implicated in FVIII uptake by APCs

We next evaluated the role of C2 residues in FVIII uptake and presentation. Human MoDCs and murine BMDCs were incubated with 20 nM FVIII, fixed, permeabilized and FVIII was revealed with the anti-A2 antibody GMA-8015. FVIII uptake was dose-dependent (Supplementary Fig. 3) and significantly reduced for FVIII^{R2215A} and FVIII^{R2215-20A} (Fig. 3A and 3C). We confirmed our observation in an antigen presentation assay to an HLA-DR1-restricted CD4+ T-cell hybridoma using MoDCs derived from a HLA-DR1 donor, and using splenocytes from HLA-DR1 transgenic SURE-L1 mice (Fig. 3B and 3D). Importantly, the epitope of CD4+ T-cell hybridoma is located in the 2004-2031 amino acid-stretch at the A3-C1 junction of FVIII (data not shown); it is therefore distant from the mutated residues, thus ruling out the fact that the lack of T-cell activation is consecutive to a disruption of the T-cell epitope. We observed a significant decrease in FVIII presentation by human and mouse DCs as measured by reduced IL-2 secretion in the case of both FVIII^{R2215A} and FVIII^{R2215A-R20A}. Our present data indicate that the C2 domain participates in FVIII uptake and involves at least R2215.

To further evaluate the importance of the C2 mutants in *in vivo* immunogenic uptake, we compared the immunogenicity of the different FVIII variants in FVIII-deficient mice. Cage-matched siblings were administered intravenously 4 times weekly with 1 µg of FVIII^{HSQ}, FVIII^{R2215-20A} or FVIII^{C1}, used as a control. In contrast to previous reports (11), FVIII-deficient mice generated an antibody response not only to FVIII^{HSQ} but also to FVIII^{C1} (Fig. 3E). Besides, FVIII^{R2215-20A} also presented with the same immunogenicity as FVIII^{HSQ}. The data suggest that mutating residues in the C1 and C2 domains of FVIII, at least in our hands, has no effect on FVIII immunogenicity in FVIII-deficient mice *in vivo*.

The immunogenicity of FVIII is independent from its ability to interact with endogenous VWF

Because BO2C11 inhibits FVIII interaction with VWF, we investigated the possibility that FVIII immunogenicity in the presence of BO2C11 (Fig. 1C) was diminished due to its faster clearance. To address this potential bias, we generated a FVIII variant, FVIII^{Y1680C}, which cannot associate with VWF.

Specific activities of FVIII^{HSQ} and FVIII^{Y1680C} were similar as assessed by one-stage and chromogenic assay (7300±165 and 6300±185 IU/mg, respectively, mean±SD). FVIII^{Y1680C} exhibited a significant reduction in its ability to interact with VWF by ELISA (Fig. 4A). Accordingly, FVIII^{Y1680C} exhibited a rapid clearance in FVIII-deficient mice with a $t_{1/2}$ of approx. 20 min (Fig. 4B). We also confirmed that the Y1680C mutation does not alter the *in vitro* endocytosis of FVIII by MoDCs (Fig. 4C). Next, we performed comparative immunogenicity studies of FVIII^{HSQ} and FVIII^{Y1680C} using FVIII-deficient mice. Remarkably, FVIII^{Y1680C} was as immunogenic as FVIII^{HSQ} (Fig. 4D). The inhibitor titers were also not significantly different (Fig. 4E). Besides, the immunogenicity of FVIII^{Y1680C} in FVIII-deficient mice was similar to that of FVIII^{HSQ} in double FVIII/VWF-deficient mice (data not shown).

C domain mutations exhibit reduced immunogenicity only in the absence of VWF

Having demonstrated that FVIII ability to interact with endogenous VWF does not modulate the magnitude of the anti-FVIII immune response, we investigated the immune-protective effect of BO2C11 using FVIII^{Y1680C}. FVIII^{Y1680C} alone or pre-incubated with a 2 molar excess of BO2C11 Fab fragments was administered to FVIII-deficient mice at weekly intervals for four weeks. Five days after the last FVIII administration, the anti-FVIII immune response was measured. We observed a significant reduction both in the anti-FVIII antibody response (Fig. 5A) and FVIII-specific T-cell proliferation (Supplementary Fig. 4) when FVIII^{Y1680C} was pre-incubated with BO2C11 Fab fragments. In contrast, in double FVIII/VWF-deficient mice, the immunogenicity of FVIII^{R2215-20A} (1300±303 µg/ml, 90±17 BU/ml, mean±SEM) was not statistically different from that of FVIII^{HSQ} (2258±596 µg/ml, 180±62 BU/ml, Fig. 5C and 5D, P>0.2), despite an increased residence time in the circulation of FVIII^{R2215-20A} (Fig. 5B, 41 min [95% confidence interval: 39-51]) as compared to FVIII^{HSQ} (17 min [13-23]). Conversely, FVIII^{C1} showed a statistically significant reduction in immunogenicity in double FVIII/VWF-deficient mice as compared to FVIII^{HSQ} both in terms of levels of anti-FVIII IgG (460±144 and 2258±596 µg/ml, respectively; P<0.001) and inhibitory titers (38±17 and 180±62 BU/ml, respectively; P<0.05). Similar

observations were obtained with a FVIII mutant that combined the triple C1 mutation and a replacement of the R2215 residue with a serine (Supplementary Fig. 5).

Discussion

The endocytosis of an antigen by APCs is not sufficient for the induction of a primary CD4+ T-cell-dependent immune response. It is however a pre-requisite to its presentation to naïve antigen-specific CD4+ T cells. Over the years, several receptors have been identified for FVIII (5, 6, 20, 21) that have mostly been implicated in FVIII catabolism (8, 22). To date, the only receptor incriminated in FVIII internalization by APCs is the C-type lectin receptor CD206 that binds mannose-ending glycans linked to Asn239 in the A1 domain of FVIII and Asn2118 in the C1 domain (7). The importance of the C1 domain of FVIII in binding to phospholipids and participating in FVIII endocytosis has recently been proposed. Thus, Lys 2092 and Phe 2093 in C1 were shown to participate in binding to phosphatidylserine and to platelets (23, 24). Interestingly, co-incubation of FVIII with KM33, a monoclonal anti-C1 IgG that targets the R2090, K2092 and F2093 residues, prior to injection to FVIII-deficient mice, was associated with a decrease in FVIII immunogenicity (10). Additionally, a triple R2090A/K2092A/F2093A FVIII mutant demonstrated reduced endocytosis by MoDCs and macrophages, and reduced immunogenicity in FVIII-deficient mice (11). Because the C2 domain of FVIII shares structural homology with the C1 domain (25) and is a major membrane binding motif (26, 27) containing several charged/basic residues, we investigated whether it also participates in the endocytic process by APCs, that leads to FVIII processing and presentation to CD4+ T cells. Our results demonstrate that masking part of the C2 domain with BO2C11, a human monoclonal IgG that interacts with solvent-exposed basic and hydrophobic side chains on the C2 membrane-binding loops (14), reduces FVIII endocytosis by MoDCs and presentation to T cells *in vitro*, as well as immunogenicity in mice. The protective effect of BO2C11 was epitope-specific since ESH8, a non-overlapping mouse monoclonal anti-C2 IgG, failed to block FVIII uptake *in vitro*. ESH8 in fact increased the uptake process. Since the binding of ESH8 to FVIII was proposed to prevent a

conformational change in the C2 domain of the FVIII light chain (28), our observation may partly relate to a particular conformation of ESH8-bound FVIII that orients FVIII to facilitate the uptake process. Interestingly, mutation of key charged residues on C2 that belong to the BO2C11 epitope resumed the effect of BO2C11 on FVIII endocytosis and presentation *in vitro*. Our results are thus reminiscent of the aforementioned findings on the role played by the FVIII C1 domain in immunogenic FVIII uptake. Together, the data demonstrate that both the C1 and C2 domains of FVIII play a role in FVIII endocytosis by MoDCs. Since lactadherin, a potent competitor for phosphatidylserine binding, does not inhibit FVIII endocytosis by MoDCs (11), we do not favor phosphatidylserine-dependent uptake mechanisms. Rather we speculate that FVIII uptake in the absence of VWF *in vitro*, involves charged interactions with a putative highly negatively charged receptor or a potential role for co-receptors such as heparin sulfate proteoglycans. The respective contribution, either redundant, additive or synergistic, to FVIII internalization of residues in the C1 and C2 domains, and of mannose-ending N-linked glycans in the A1 and C1 domains, as well as the sequence of events that allows FVIII binding at the cell surface and internalization, remain to be deciphered.

While co-incubation of FVIII prior to injection to FVIII-deficient mice, with BO2C11 or with KM33 (10) reduced the anti-FVIII IgG response, neither the FVIII^{R2215-20A} C2 mutant nor the triple FVIII^{C1} mutant demonstrated reduced immunogenicity in FVIII-deficient mice in our hands. These observations may be explained either by a steric hindrance of the C domains of FVIII by the antigen-binding domains of BO2C11/KM33, or by the implication in FVIII internalization of additional amino acids within the BO2C11 epitope on C2 or within the KM33 epitope on C1. Alternatively, the findings may be accounted for by an interfering effect of endogenous VWF. Indeed, the T2086-S2095 region of the C1 domain was recently shown to be buried upon association with VWF (29), and the triple FVIII^{C1} mutant retains ability to interact with VWF. In support of this, in the absence of endogenous VWF, the triple FVIII^{C1} mutant showed reduced immunogenicity as compared to FVIII^{HSQ} *in vivo*. In contrast, the FVIII^{R2215-20A} C2 mutant, that also retains most of VWF binding and demonstrates reduced endocytosis *in vitro*, was as

immunogenic as FVIII^{HSQ} in mice lacking VWF. Of note, the lack of reduced immunogenicity of the triple FVIII^{C1} mutant in FVIII-deficient mice is at odds with the report by Wroblewska *et al.* (11); it remains unclear whether the observed difference may relate to differences in levels of VWF in different strains of mice (30). Although the C2 domain has been identified as an essential membrane interactive motif, with the C1 domain providing additional membrane-binding affinity (23, 26, 27), we do not favor a predominant role for C2 residues in immunogenic FVIII uptake in the absence of endogenous VWF. Instead, we speculate that the *in vivo* role in endocytosis of the targeted R2215 and R2220 basic residues in the C2 domain is only secondary to that of other membrane accessible residues within the BO2C11 epitope. This is supported by the observation that the pre-incubation of the FVIII^{Y1680C} mutant, which does not bind VWF, with BO2C11 reduced its immunogenicity in FVIII-deficient mice. Additional mutational analysis of membrane accessible hydrophobic residues within the BO2C11 epitope shall shed light on the specific residues of the C2 domain of FVIII that are implicated in the *in vivo* immunogenic uptake process.

VWF has controversially been proposed to reduce the immunogenicity of therapeutic FVIII (31). Unexpectedly, the present results indicate that the presence of endogenous VWF, or the capacity of exogenous FVIII to bind endogenous VWF, does not alter the immunogenicity of FVIII in mice. Indeed, FVIII presented with the same degree of immunogenicity in FVIII-deficient mice and in double FVIII/VWF-deficient mice. Likewise, FVIII^{Y1680C} with impaired binding to VWF induced similar anti-FVIII IgG levels as native FVIII in FVIII-deficient mice. The potential immunomodulatory role of VWF towards FVIII has been suggested by a suspected reduced prevalence of FVIII inhibitors in hemophilia A patients treated with exogenous VWF-containing plasma FVIII concentrates as compared to patients receiving recombinant or highly purified products (32, 33). Controversial results have however been obtained upon studying large retrospective and prospective patient cohorts (34, 35). In parallel, studies performed in pre-clinical mouse models of hemophilia A have indicated that pre-incubation of recombinant FVIII with exogenous VWF leads to a reduction in the levels of inhibitory anti-FVIII

antibodies following administration to mice (36-39), although contradictory results have occasionally been generated (40). *In vitro*, a protective role for VWF on FVIII endocytosis by human MoDCs was clearly shown (10, 41), although presentation of processed FVIII-derived peptides could still be detected at least *in vitro* (42). Besides, under shear stress, VWF fails to block FVIII internalization by macrophages, and both VWF and FVIII co-localize within the same cells (43). This is in agreement with the observation that exogenous FVIII and exogenous VWF may be co-detected in splenic macrophages after injection to double FVIII/VWF-deficient mice (44). The internalization of FVIII and VWF was however inhibited by the LRP antagonist Receptor Associated Protein (RAP) in the case of macrophages under shear, but not in the case of MoDCs in static conditions (8), suggesting that this process is more relevant to FVIII catabolism than immunogenicity. Interestingly, the intricate role played by VWF in FVIII immunogenicity is reminiscent of its complex role towards FVIII catabolism. Indeed, binding of FVIII to VWF dictates FVIII residence time in the circulation, as shown in patients with type 3 von Willebrand disease (45). Conversely, VWF-binding may mediate, at least in part, the catabolic endocytosis of therapeutic FVIII (20, 46), which is further suggested by the fact that the half-life of modified Fc-fused or PEGylated FVIII barely exceeds that of VWF (47, 48).

Taken together, the results indicate that residues in the C1 and/or C2 domains of FVIII are implicated in immunogenic FVIII uptake, at least *in vitro*. Conversely, *in vivo*, the binding to endogenous VWF masks the reducing effect of mutations in the C domains on FVIII immunogenicity.

Acknowledgements

KM33 and VWF-deficient mice were kind gifts from Dr Jan Voorberg (Department of Plasma Proteins, Sanquin-AMC Landsteiner Laboratory and Van Creveld Laboratory, Amsterdam, Netherlands) and Dr Olivier Christophe (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U770, Le Kremlin-Bicêtre, France), respectively. FVIII^{HSQ} in the ReNeo plasmid and BHK-M cells were kind gifts from Prof Pete Lollar (Aflac Cancer and Blood Disorders Center, Department of Pediatrics, Emory University, Atlanta,

GA, USA). The monoclonal mouse and human anti-FVIII antibodies, mAb6, BO2BII and BO2C11 were kind gifts from JM Saint-Remy and M Jacquemin (KUL, Leuven, Belgium). We would like to extend our acknowledgments to the Centre d'Explorations Fonctionnelles (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for assistance.

Funding

This work was supported by Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by an unrestricted grant from Grifols (Investigator-Sponsored Research Program, Barcelona, Spain). Mathieu Ing and Ivan Peyron were the recipients of fellowships from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (France).

Authors contributions

BG and SLD designed the research

BG, MI, SD, IP and MT performed experiments and edited the manuscript

BG, MI, SD, IP and MT analyzed the data

BG, SVK, and SLD wrote the report

The authors declare no conflict of interest

References

1. Fay PJ. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol*. 2006;83(2):103-108.
2. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998;92(11):3983-3996.
3. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet*. 1992;339(8793):594-598.
4. Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood*. 2008;112(2):240-249.
5. Lenting P, Neels J, van den Berg B, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 1999;274(34):23734-23739.
6. Saenko E, Yakhyaev A, Mikhailenko I, Strickland D, Sarafanov A. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem*. 1999;274:37685-37692.
7. Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J, et al. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(21):8965-8970.
8. Dasgupta S, Navarrete AM, Andre S, et al. Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica*. 2008;93(1):83-89.
9. Repesse Y, Dasgupta S, Navarrete AM, Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1172-1173.
10. Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, et al. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):501-509, 9 e1-5.
11. Wroblewska A, van Haren SD, Herczenik E, et al. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood*. 2012;119(22):5294-5300.
12. Meems H, van den Biggelaar M, Rondaij M, van der Zwaan C, Mertens K, Meijer AB. C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 are of major importance for the endocytic uptake of coagulation factor VIII. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(8):1114-1121.
13. Lu J, Pipe SW, Miao H, Jacquemin M, Gilbert GE. A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood*. 2011;117(11):3181-3189.
14. Spiegel PC, Jr., Jacquemin M, Saint-Remy JM, Stoddard BL, Pratt KP. Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood*. 2001;98(1):13-19.
15. Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, et al. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood*. 1998;92(10):3701-3709.
16. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999;223(1):77-92.
17. Delignat S, Repesse Y, Gilardin L, et al. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemophilia*. 2014;20(4):486-492.
18. Pfistershammer K, Stockl J, Siekmann J, Turecek PL, Schwarz HP, Reipert BM. Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb Haemost*. 2006;96(3):309-316.
19. Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. Antihuman factor VIII C2 domain antibodies in hemophilia A mice recognize a functionally complex continuous spectrum of epitopes dominated by inhibitors of factor VIII activation. *Blood*. 2007;110(13):4234-4242.
20. Sarafanov A, Ananyeva N, Shima M, Saenko E. Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 2001;276(15):11970-11979.

21. Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, Vlijmen BJ, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost.* 2005;3(6):1257-1265.
22. Navarrete AM, Dasgupta S, Teyssandier M, et al. Endocytic receptor for pro-coagulant factor VIII: relevance to inhibitor formation. *Thromb Haemost.* 2010;104(6):1093-1098.
23. Meems H, Meijer AB, Cullinan DB, Mertens K, Gilbert GE. Factor VIII C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 contribute to membrane binding and cofactor activity. *Blood.* 2009;114(18):3938-3946.
24. Bloem E, van den Biggelaar M, Wroblewska A, et al. Factor VIII C1 domain spikes 2092-2093 and 2158-2159 comprise regions that modulate cofactor function and cellular uptake. *J Biol Chem.* 2013;288(41):29670-29679.
25. Ngo JC, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure.* 2008;16(4):597-606.
26. Scandella D, Gilbert GE, Shima M, et al. Some Factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood.* 1995;86(5):1811-1819.
27. Gilbert GE, Kaufman RJ, Arena AA, Miao H, Pipe SW. Four hydrophobic amino acids of the factor VIII C2 domain are constituents of both the membrane-binding and von Willebrand factor-binding motifs. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6374-6381.
28. Saenko EL, Shima M, Gilbert GE, Scandella D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for FVIII inhibition. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27424-27431.
29. Chiu PL, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, et al. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood.* 2015;126(8):935-938.
30. Shavit JA, Manichaikul A, Lemmerhirt HL, Broman KW, Ginsburg D. Modifiers of von Willebrand factor identified by natural variation in inbred strains of mice. *Blood.* 2009;114(26):5368-5374.
31. Oldenburg J, Lacroix-Desmazes S, Lillicrap D. Alloantibodies to therapeutic factor VIII in hemophilia A: the role of von Willebrand factor in regulating factor VIII immunogenicity. *Haematologica.* 2015;100(2):149-156.
32. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood.* 2006;107(1):46-51.
33. Calvez T, Laurian Y, Goudemand J. Inhibitor incidence with recombinant vs. plasma-derived FVIII in previously untreated patients with severe hemophilia A: homogeneous results from four published observational studies. *J Thromb Haemost.* 2008;6(2):390-392.
34. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Escuriola Ettinghausen C, Tedgard U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 2007;109(11):4693-4697.
35. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med.* 2013;368(3):231-239.
36. Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JM, Kotitschke R, Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a hemophilia A mouse model. *Thromb Haemost.* 2002;88(2):221-229.
37. Delignat S, Dasgupta S, Andre S, et al. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica.* 2007;92(10):1423-1426.
38. Kallas A, Kuuse S, Maimets T, Pooga M. von Willebrand factor and transforming growth factor-beta modulate immune response against coagulation factor VIII in FVIII-deficient mice. *Thromb Res.* 2007;120(6):911-919.

39. Delignat S, Repesse Y, Navarrete AM, et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. 2012;18(2):248-254.
40. Qadura M, Waters B, Burnett E, et al. Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood*. 2009 ;114(4):871-880.
41. Dasgupta S, Repesse Y, Bayry J, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*. 2007;109(2):610-612.
42. Sorvillo N, Hartholt RB, Bloem E, et al. von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica*. 2016;101(3):309-318.
43. Castro-Nunez L, Dienava-Verdoold I, Herczenik E, Mertens K, Meijer AB. Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. *J Thromb Haemost*. 2012;10(9):1929-1937.
44. van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, et al. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood*. 2008;112(5):1704-1712.
45. Goodeve AC, Eikenboom JC, Ginsburg D, et al. A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb Haemost*. 2001;85(5):929-931.
46. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica*. 2012;97(12):1855-1863.
47. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood*. 2014;123(3):317-325.
48. Konkle BA, Stasyshyn O, Chowdary P, et al. Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. *Blood*. 2015;126(9):1078-1085.

Legends to Figures

Figure 1. The anti-C2 antibody BO2C11 inhibits FVIII uptake *in vitro* and modulates FVIII immunogenicity *in vivo*. Panel A. B domain-deleted FVIII (20 nM) was pre-incubated alone or with equimolar concentrations of ESH8, BO2C11 or with a 2 molar excess BO2C11 Fab fragments. Uptake by human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) was analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Results are expressed as the percentage of median fluorescence intensity (MFI), whereby 100% corresponds to MFI obtained with wild-type FVIII (FVIII^{HSQ}) incubated alone. The graph is representative of 4 independent donors (mean±SEM). Panel B. Immature MoDCs were cultured for 24 hr in 96 round-bottom plates with the FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted CD4+ T-cell hybridoma (ratio 1:10, clone 1G8-A2) in the presence of B domain-deleted FVIII alone or pre-incubated with 2 molar excess of BO2C11. Activation of T cells was measured by IL-2 secretion in the supernatant by ELISA (BD Biosciences). The graph is representative of 4 experiments (mean±SEM). Panel C. Hemophilic FVIII exon 16 knock-out mice (n=6/group) were injected once a week for 4 weeks with 0.2 µg of B domain-deleted FVIII pre-incubated with 6 µM F(ab')₂ of BO2C11 (closed square) or a human IgG4 isotype control (open square). After four weeks, the anti-FVIII antibody response was measured. Anti-FVIII IgG titers are defined as arbitrary units using the mouse monoclonal anti-FVIII IgG mAb6 as a standard. Data are represented as serum dilution versus mean±SEM of absorbance (492 nm).

Figure 2. Characterization of FVIII containing alanine substitutions of the residues predicted to interact with BO2C11. Panel A. B domain-deleted wild-type FVIII (FVIII^{HSQ}), FVIII^{R2215A} or FVIII^{R2220A} were serially diluted 2-fold starting at 1 nM. Factor Xa generation was measured using a FVIII chromogenic assay. The reaction was stopped at 10 min using 20% acetic acid and the final absorbance measured at 405 nm. The data are represented as factor Xa generated in arbitrary units and are equivalent to the absorbance at 405 nm. VWF (Panel B), BO2C11 (human anti-C2 domain antibody, Panel C), ESH8 (mouse anti-C2 domain antibody that does not compete with BO2C11, Panel D), BO2BII

(human anti-A2 domain antibody, Panel E) and KM33 (human anti-C1 domain antibody, Panel F) were immobilized on microtiter plates. After blocking, FVIII^{HSQ}, FVIII^{R2215A}, FVIII^{R2220A}, FVIII^{R2215-20A} or FVIII^{C1} were serially diluted across the plates and bound FVIII was revealed using either the biotinylated anti-A2 antibody, GMA-8015, or, in the case of BO2BII-bound FVIII, ESH8, followed by an anti-mouse-HRP antibody. The graphs are represented as absorbance measured at 492 nm (mean±SEM).

Figure 3. C2 domain mutations alter FVIII endocytosis and presentation by APCs, but do not alter FVIII immunogenicity *in vivo*. B domain-deleted wild-type FVIII (FVIII^{HSQ}) or the mutants FVIII^{R2215A}, FVIII^{R2215-20A} or FVIII^{C1} were added at 20 nM to MoDCs (Panel A) or BMDCs (Panel C) for 30 min. Internalized FVIII was detected as described in Methods. Results are expressed as the percentage of median fluorescence intensity (MFI), whereby 100% corresponds to MFI obtained with FVIII^{HSQ}. Panels B and D represent activation of a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted T-cell hybridoma by B domain-deleted FVIII-loaded (10 nM) HLA-matched human MoDCs or splenocytes from SURE-L1 mice, respectively. Supernatant was collected after 24 hr and the IL-2 produced by the activated T cells was measured. Representative of three experiments (mean±SEM). Panel E. FVIII-deficient mice were injected intravenously once weekly for 4 weeks with 1 µg of B domain-deleted FVIII^{HSQ}, FVIII^{C1} or FVIII^{R2215-20A}. One week after the last injection, blood samples were collected. Anti-FVIII IgG titers are defined as arbitrary units based on standard curves generated using mAb6. Statistical significances were assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U test (ns: not significant).

Figure 4. FVIII binding to VWF does not alter endocytosis *in vitro* or immunogenicity *in vivo*. Panel A. The binding of B domain-deleted FVIII^{HSQ} and FVIII^{Y1680C} to VWF was studied using an ELISA as described in the Methods. Results (mean±SEM) are expressed in arbitrary units. Panel B. FVIII^{HSQ} (10 nM, open squares) or FVIII^{Y1680C} (closed squares) in 100 µl were administered into FVIII-deficient mice and the residual FVIII levels were measured at different time points (n=3 mice per time point) by

ELISA (FVIII:Ag). The data is plotted as percentage of initial FVIII level (measured 5 minutes after administration, mean \pm SEM) versus time. Panel C. FVIII^{HSQ} or mutants FVIII^{Y1680C} were added at increasing concentrations (10, 20 and 40 nM) to immature MoDCs (n=3 different donors) for 30 min at 37°C in serum-free medium and in absence of VWF. Cells were subsequently washed, fixed, permeabilized and stained for FVIII using a FITC-labeled anti-A2 domain-specific antibody followed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Data are expressed as the percentage of median fluorescence intensity (MFI, mean \pm SEM), whereby 100% corresponds to the MFI observed for 10 nM of FVIII^{HSQ}. Panels D and E. FVIII-deficient mice were administered with FVIII^{HSQ} (0.5 μ g, open squares) or FVIII^{Y1680C} (0.5 μ g, closed squares), intravenously once a week for four weeks. Anti-FVIII IgG titers were measured using an ELISA as described above (D). Inhibitory titers towards FVIII were assessed using a modified Bethesda assay (E). Horizontal bars depict medians. The statistical significance was assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U test (ns: not significant).

Figure 5. Contribution of the C1 and C2 domains of FVIII to FVIII immunogenicity in the absence of binding to VWF. Panel A. FVIII-deficient mice were administered with B domain-deleted FVIII^{Y1680C} (0.4 μ g, open squares) or FVIII^{Y1680C} pre-incubated with a 2-fold molar excess of BO2C11 Fab (closed squares) intravenously once a week for four weeks. One week after the last injection, blood samples were collected. Anti-FVIII IgG titers are defined as arbitrary units based on standard curves generated using mAb6. The graph depicts a pool of two independent experiments. Panel B. B domain-deleted FVIII^{HSQ}, FVIII^{C1} or FVIII^{R2215-20A} (10 nM in 100 μ l) were administered to FVIII-deficient mice and the residual FVIII levels were measured at different time points (n=3 mice per time point) by ELISA. The data are plotted as percentage of initial FVIII levels (measured 5 minutes after administration) versus time (mean \pm SEM) and are representative of 2 independent experiments. Experimental data were fitted using a one-phase decay curve to determine the *in vivo* half-lives. Panels C and D. Double FVIII/VWF-deficient mice were injected intravenously once a week for 4 weeks with 0.5 μ g of FVIII^{HSQ}, FVIII^{C1} or FVIII^{R2215-}

^{20A}. One week after the last injection, blood samples were collected. Anti-FVIII IgG titers were measured as described above (C). Inhibitory titers towards FVIII were assessed using a modified Bethesda assay (D). Horizontal bars depict medians. Statistical significances were assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U test (ns: not significant).

Figure 1

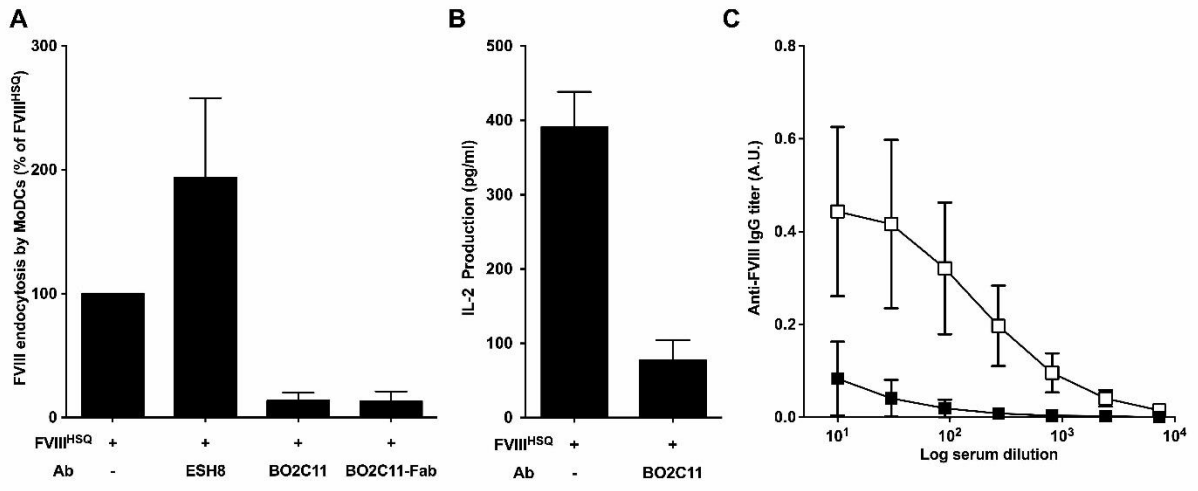


Figure 2

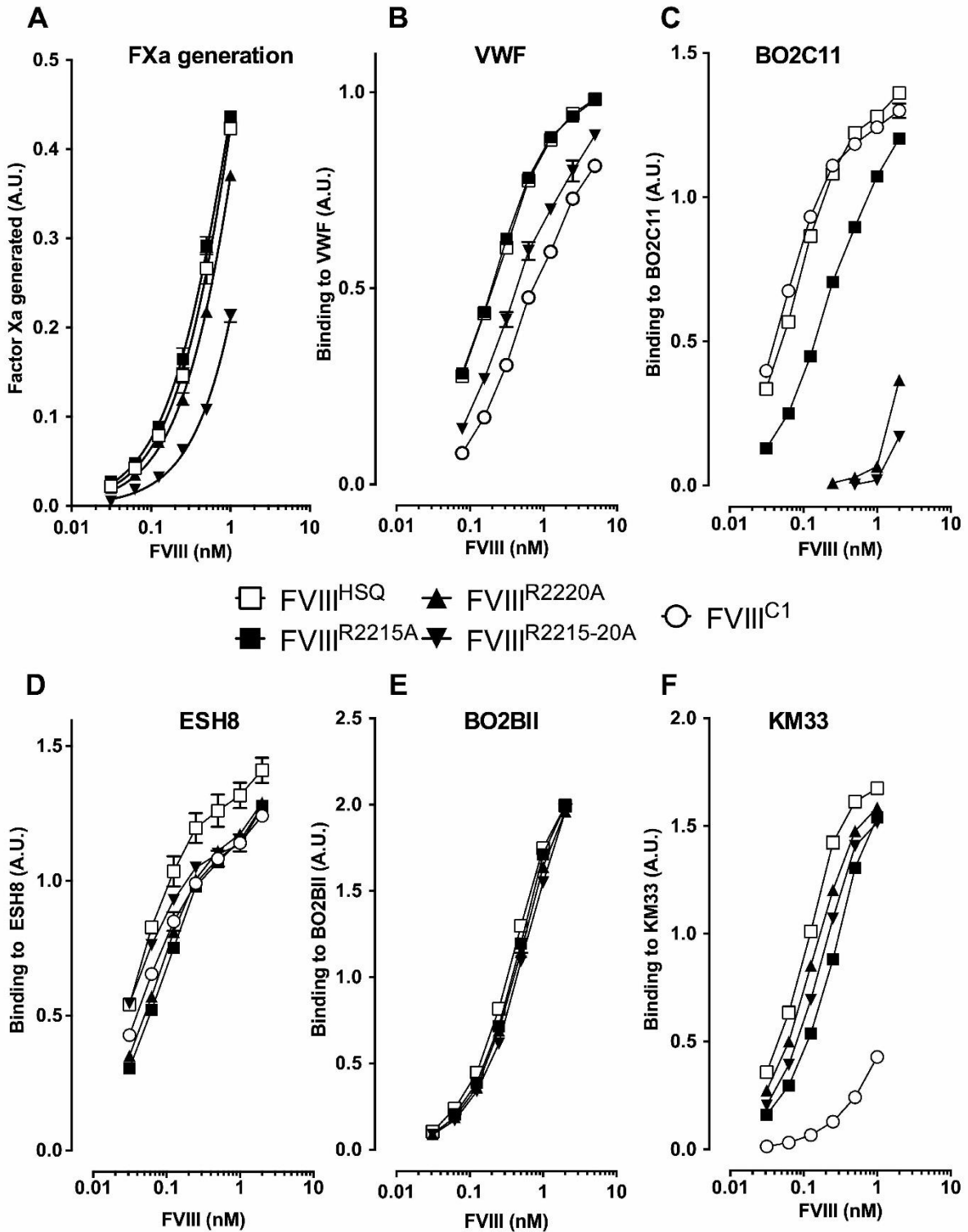


Figure 3

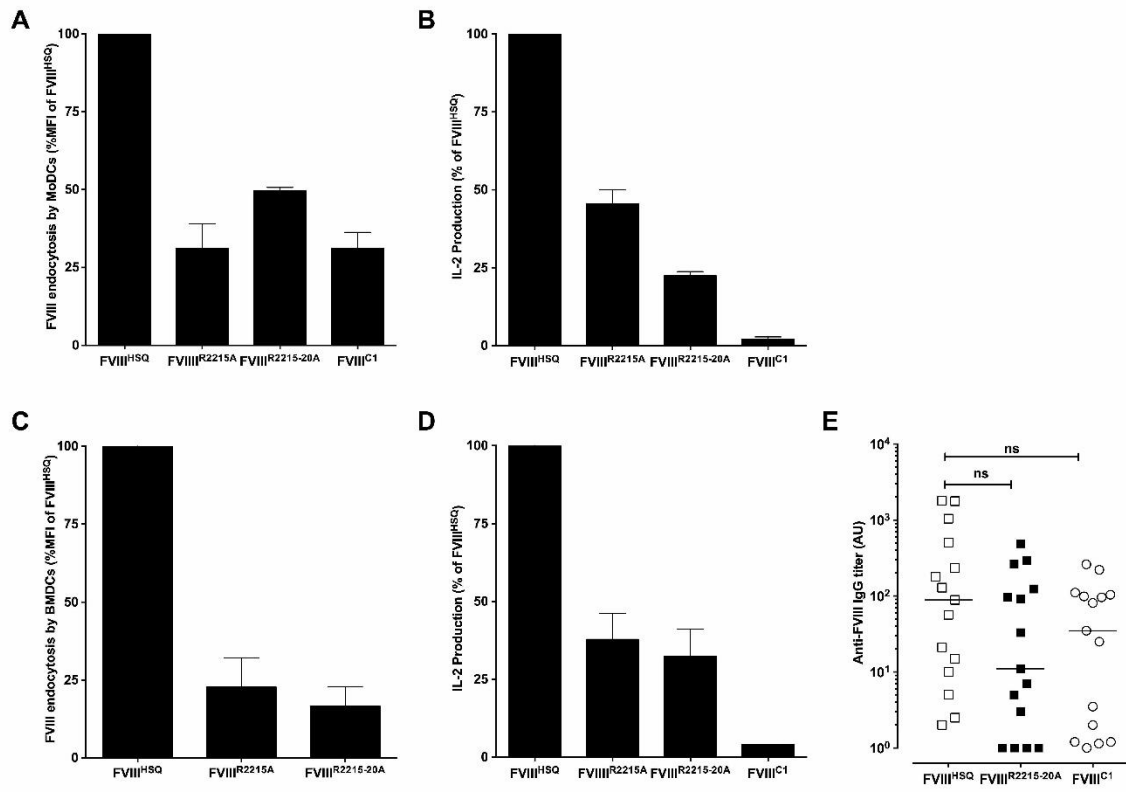


Figure 4

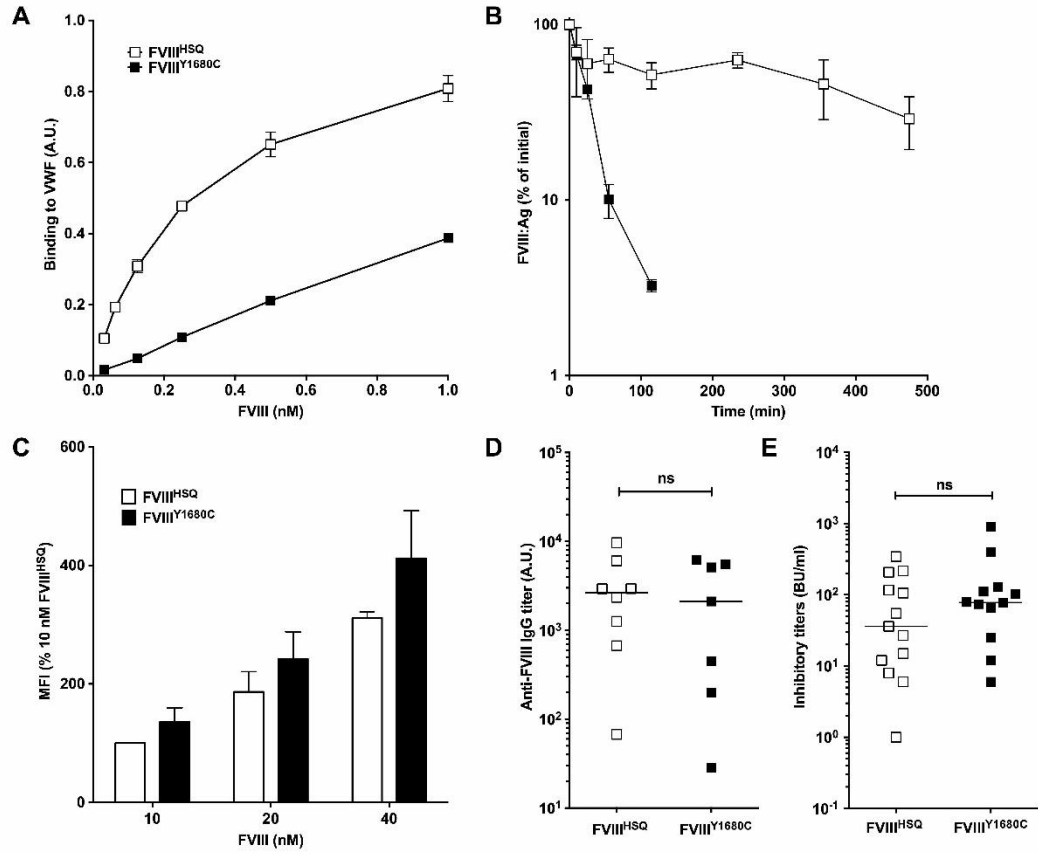
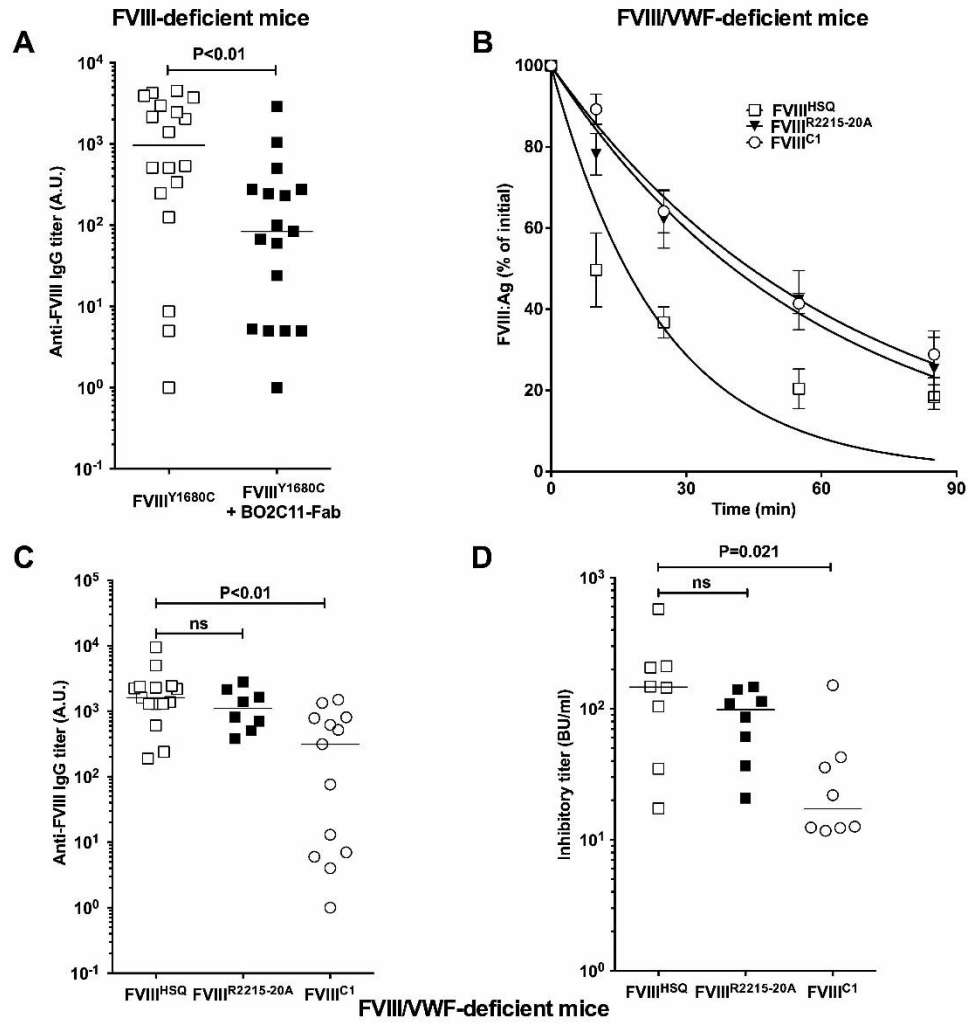


Figure 5



Supplemental Methods**Cloning of cDNA encoding B domain– deleted FVIII mutants**

The R2215A, R2220A, R2215A-R2220A, R2090A-K2092A-F2093A and Y1680C mutations were generated by splicing-by-overlap extension mutagenesis (1). The primer set used to construct these mutants as well as the restriction sites used for cloning into the mammalian expression vector ReNeo are listed below. The template used for the PCR reactions was wild-type B domain-deleted FVIII named HSQ in the ReNeo vector (gift from Dr P Lollar, Emory University, Atlanta, GA, USA).

Primers for R2215A:

Forward primer: 5'- ATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCAT -3'
 Reverse primer: 5'- TGCTGCAGCGGCCGCCCTCAGTAGAGGTCCTGT -3'
 Internal primers: 5'- CCTCCAAGGGGCCAGTAATGCCTGGAGACC -3'
 5'- GGTCTCCAGGCATTACTGGCCCCCTGGAGG -3'

Restriction enzymes for ligation to ReNeo: SmaI/NotI

Primers for R2220A:

Forward primer: 5'- ATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCAT -3'
 Reverse primer: 5'- TGCTGCAGCGGCCGCCCTCAGTAGAGGTCCTGT -3'
 Internal primers: 5'- AGTAATGCCTGGGCCCCCTCAGGTG -3'
 5'- CACCTGAGGGGCCAGGCATTACT -3'

Restriction enzymes for ligation to ReNeo: SmaI/NotI

Primers for R2215A-R2220A:

Forward primer: 5'- ATGGGCTGTGATTTAAATAGTTGCAGCAT -3'
 Reverse primer: 5'- TGCTGCAGCGGCCGCCCTCAGTAGAGGTCCTGT -3'
 Internal primers: 5'- CCTCCAAGGGGCCAGTAATGCCTGGGCCCCCTCAGG -3'
 5'- CCTGAGGGGCCAGGCATTACTGGCCCCCTGGAGG -3'

Restriction enzymes for ligation to ReNeo: SmaI/NotI

Primers for R2090A-K2092A-F2093A:

Forward primer: 5'- GACAGTGGGCCCCAAAGCTGGCCAG -3'

Reverse primer: 5'- GCTGCAACTATTTAAATCACAGCCC -3'

Internal primers:

5'- GACCCAGGGTGCCGCACACGCGGCCTCCAGCCTCTACATCTCT -3'

5'- AGAGATGTAGAGGCTGGAGGCCGCGTGTGCGGCACCCTGGGTC -3'

Restriction enzymes for ligation to ReNeo: ApaI/SmaI

Primers for Y1680C:

Forward primer: 5'- GGAAATAACTCGTACGACTCTTCAGTCAG -3'

Reverse primer: 5'- CAGCTTTGGGGCCCACTGTCCATATTG -3'

Internal primers: 5'- GATTTTGACATTTGTGATGAGGATGAAA -3'

5'- TTTCATCCTCATCACAAATGTCAAATC -3'

Restriction enzymes for ligation to ReNeo: BsiWI/ApaI

Expression of wild-type and mutated FVIII by BHK-M cells

BHK-M cells (gift from Dr P Lollar, Emory University, Atlanta, GA, USA) were transfected using Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies, Saint-Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were cultured onto 10 cm² dishes at a density of 1000, 500 and 100 cells/ml in the presence of 10 ml of DMEM/F-12 medium (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies), and 500 µg/ml geneticin sulphate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). After 10 days, geneticin-resistant clones were picked and harvested in flat-bottom 96-well plates with the same media until confluency, and screened for FVIII production by sandwich ELISA using ESH8 and biotinylated GMA-8015

as capture and detection antibodies, as described in Material and Methods. The highest expressing clones for each FVIII were scaled up to near confluency before switching the medium to serum-free AIM-V medium (Life Technologies) for 24 hr. Collected medium was stored at -80°C before purification.

Purification of wild-type and mutated FVIII

Purification of wild-type and mutated FVIII was performed using i) an affinity chromatography and ii) an anion-exchange chromatography, based on previously described protocols (2). FVIII-containing media were thawed at 37°C, centrifuged at 1000 g for 20 min to remove cell debris and supplemented with 0.05% sodium azide. Pooled medium was loaded onto a VIIISelect column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and FVIII was eluted in isocratic conditions, with 20 mM HEPES, 1.5 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.01% tween 80, 50% ethylene glycol, pH 7.4. Eluted fraction was then 5-fold diluted in 20 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, 0.01% tween 80, pH 7.4 and loaded onto a 1 ml anion-exchange HiTrap Resource Q column (GE Healthcare). FVIII was finally eluted using a linear 0.2-1.0 M NaCl gradient. Purified wild-type and mutated FVIII were assessed by chromogenic assay, absorbance at 280 nm and analyzed by 4-12% gradient SDS-PAGE (1 µg per lane) with and without prior activation by bovine thrombin (1 IU, Sigma-Aldrich) and stained with 0.1% silver nitrate as previously described (3).

***In vitro* activation of a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted mouse CD4+ T cell hybridoma by murine splenocytes**

Total splenocytes from HLA-DRB1*0101 transgenic SURE-L1 mice were isolated and used as a source of APCs after treatment with 50 µg/ml of mitomycin C (SIGMA) for 30 min, at 37°C and 3 washes in RPMI-1640. Splenocytes were co-cultured for 18 hr at 37°C in 96

round-bottom plates with the 1G8-A2 FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted CD4+ T-cell hybridoma (ratio 2:1, 200.000 splenocytes for 100.000 T cells) in the presence of B domain-deleted FVIII (10 nM) alone or pre-incubated with 2 molar excess of ESH8, BO2C11 or BO2C11 Fab fragments. Activation of T cells was measured by IL-2 secretion in the supernatant using BD OptEIA™ mouse IL-2 ELISA set (BD Biosciences). Controls included T cells incubated alone, or incubated with splenocytes in the presence of concanavalin A (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) or in the absence of FVIII.

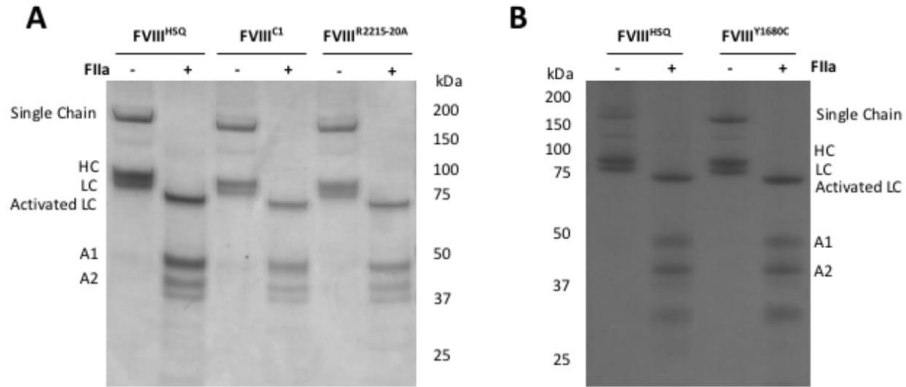
***In vitro* proliferation of splenocytes**

FVIII exon 16 knock-out C57BL/6 mice were injected once a week for 4 weeks with B domain-deleted FVIII^{Y1680C} alone or pre-incubated with BO2C11. One week after the last injection, mice were sacrificed and spleens collected and processed into single-cell suspensions. Red blood cells were eliminated with ammonium-chloride-potassium lysing buffer (Lonza, Verviers, Belgium). Splenocytes were isolated and cultured in round-bottom 96-well plates in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 55 µM 2-mercaptoethanol in the presence of increasing concentrations of FVIII^{HISQ} (0, 0.5, 1, 2 µg/mL) or concanavalin A (ConA, 0, 0.5, 1, 2 µg/mL). After 72 hr, cells proliferation was assayed following the addition of [³H]-thymidine (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) for 24 hr.

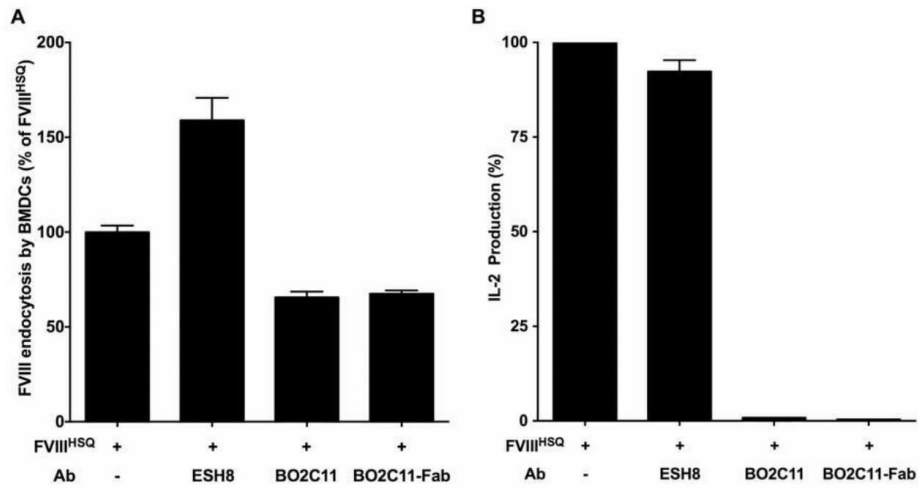
References to supplemental methods

1. Horton RM, Ho SN, Pullen JK, Hunt HD, Cai Z, Pease LR. Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol.* 1993;217:270-269.
2. Doering CB, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):38345-38349.
3. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem.* 1981 Nov 1;117(2):307-310.

Supplementary figures

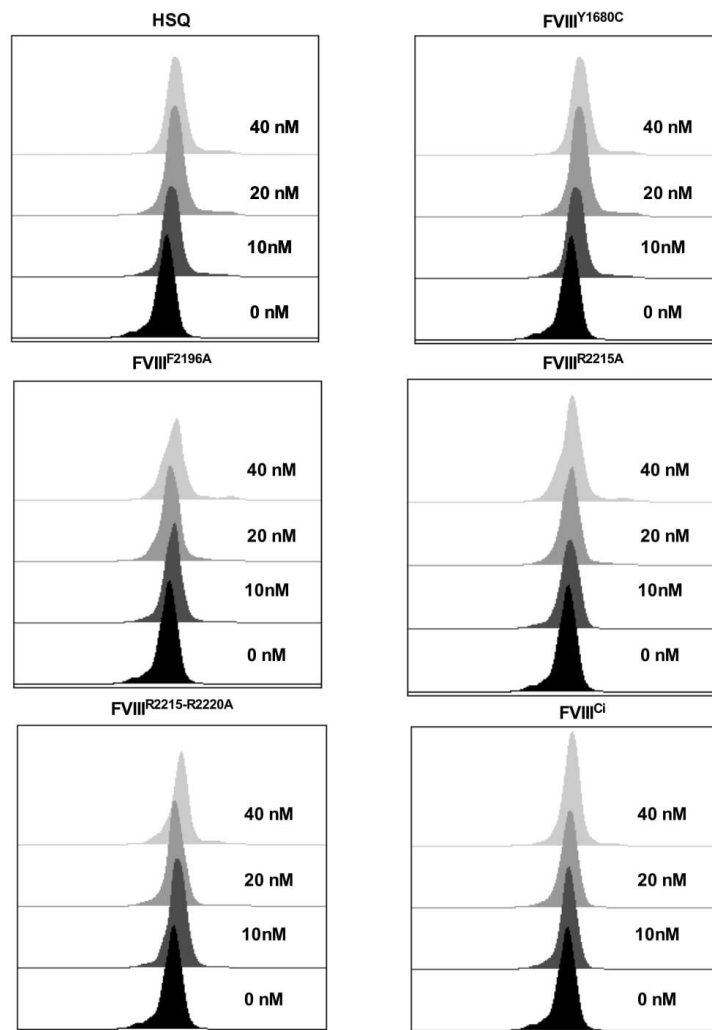


Supplementary Figure 1. SDS-PAGE analysis of the different purified recombinant FVIII. B domain-deleted wild-type and mutated FVIII (1 µg/lane) were incubated with or without 1 IU bovine thrombin (FIIa) for 30 min at 37°C and loaded on 4-12% gradient polyacrylamide gels under non-reducing conditions. Gels were then stained with 0.1% silver nitrate. HC, FVIII heavy chain; LC, FVIII light chain; A1, A1 domain; and A2, A2 domain.

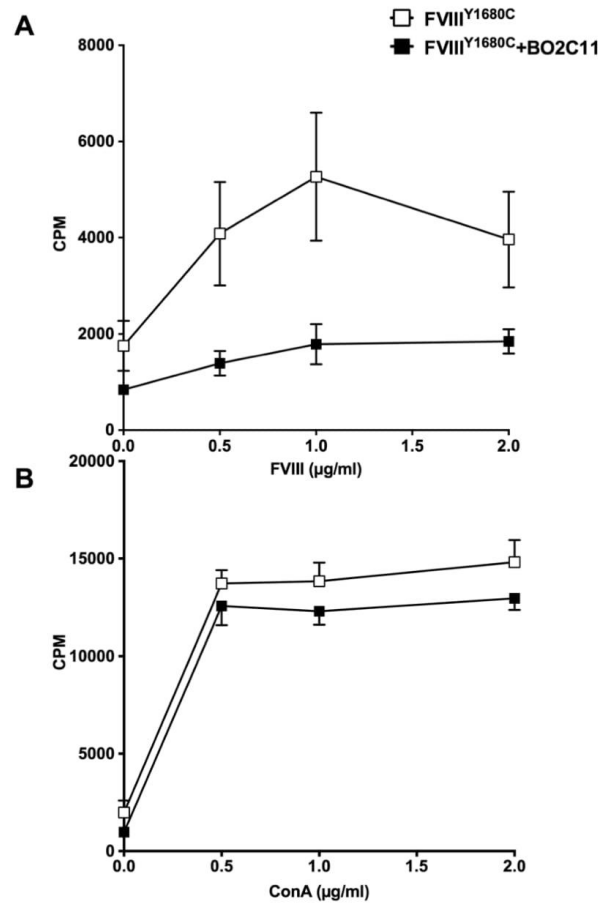


Supplementary Figure 2. The anti-C2 antibody BO2C11 inhibits FVIII presentation *in vitro*.

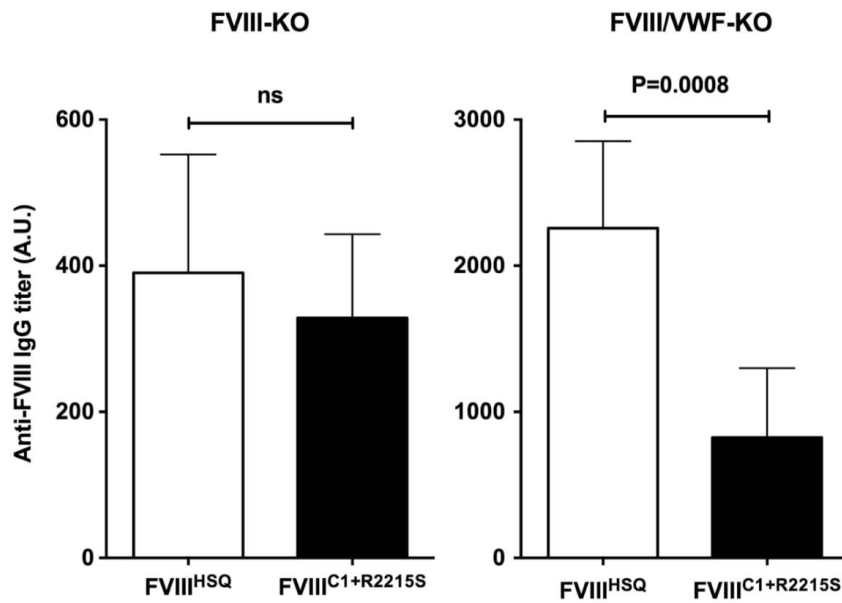
Panel A. B domain-deleted FVIII (20 nM) was pre-incubated with equimolar concentrations of ESH8, BO2C11 or with a 2 molar excess BO2C11 Fab fragments. Uptake by murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) was analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Results are expressed as the percentage of median fluorescence intensity (MFI), whereby 100% corresponds to MFI obtained with wild-type FVIII (FVIII^{HSQ}). Graphs are representative of 5 individual mice (mean±SEM). Panel B. Total splenocytes from HLA-DRB1*0101 transgenic SURE-L1 mice (used as the source of APCs) were cultured for 24 hr in 96 round-bottom plates with the FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted CD4⁺ T-cell hybridoma (ratio 1:10, clone 1G8-A2) in the presence of B domain-deleted FVIII or FVIII pre-incubated with ESH8, BO2C11 or with BO2C11 Fab fragments. Activation of T cells was measured by IL-2 secretion in the supernatant by ELISA (BD Biosciences). Data are depicted as % of IL-2 expression versus FVIII^{HSQ} alone. Results are representative of three experiments (means±SEM).



Supplementary Figure 3. FVIII uptake by MoDCs. Increasing concentrations of B domain-deleted wild-type FVIII (HSQ) or mutants FVIII^{Y1680C}, FVIII^{F2196A}, FVIII^{R2215A}, FVIII^{R2215-20A}, or FVIII^{C1} were added to MoDCs for 30 min at 37°C. FVIII endocytosis was assessed as described earlier and data analyzed by FACS.



Supplementary Figure 4. Inhibition of the anti-FVIII immune response *in vivo* upon co-incubation of FVIII with BO2C11. FVIII-deficient mice were injected weekly with B domain-deleted FVIII^{Y1680C} incubated alone or in the presence of BO2C11. One week after the fourth treatment, spleens were collected and processed into single-cell suspensions. Red blood cells were removed and splenocytes were cultured in round-bottomed 96-well plates for 48-72 hr in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 55 µM 2-mercaptoethanol in the presence of increasing concentrations of FVIII^{HSQ} (0, 0.5, 1, 2 µg/mL) or concanavalin A (ConA, 0, 0.5, 1, 2 µg/mL). Proliferation was assayed following the addition of [³H]-thymidine. The results are expressed as counts per minute (CPM, mean±SEM).



Supplementary Figure 5. Immunogenicity of FVIII^{HSQ} and FVIII^{C1+R2215S} in FVIII-deficient and in double FVIII/VWF-deficient mice. FVIII-deficient mice and double FVIII/VWF-deficient mice were injected intravenously once weekly for 4 weeks with 0.5 μ g of B domain-deleted FVIII^{HSQ} or FVIII^{C1+R2215S}. One week after the last injection, blood samples were collected. Anti-FVIII IgG titers were measured by ELISA and are expressed as arbitrary units (mean \pm SEM) using the mouse monoclonal anti-FVIII IgG Mab6 as a standard. Statistical significances were assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U test (ns: not significant). The specific activities, *in vivo* recoveries and capacities to activate the T-cell hybridoma were similar for FVIII^{C1} and FVIII^{C1+R2215S} (not shown).

BRIEF REPORT

Role of coagulation-associated processes on factor VIII immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A

B. GANGADHARAN,*†‡ S. DELIGNAT,*†‡ V. OLLIVIER,§ N. GUPTA,*†‡ N. MACKMAN,¶
S. V. KAVERI*†‡ and S. LACROIX-DESMAZES*†‡

*Centre de Recherche des Cordeliers, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR S) 1138; †Centre de Recherche des Cordeliers, UMR S 1138, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; ‡Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris Descartes, UMR S 1138; §Inserm, UMR 1148, Paris 7-Denis Diderot University, CHU X. Bichat, Paris, France; and ¶Department of Medicine, Division of Hematology and Oncology, McAllister Heart Institute, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

To cite this article: Gangadharan B, Delignat S, Ollivier V, Gupta N, Mackman N, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Role of coagulation-associated processes on factor VIII immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2014; **12**: 2065–9.

Summary. *Background:* Immune responses to therapeutic factor VIII remain a major problem, affecting 30% of patients with severe hemophilia A. The primary factors that drive immune responses in these patients remain elusive. There have been conflicting reports on a role of coagulation (or thrombin) in anti-FVIII immune responses. *Objective:* To assess the importance of coagulation-associated processes for the onset of the anti-FVIII immune response. *Methods:* Using FVIII-deficient mice, we compared the immunogenicity of recombinant FVIII or the inactive FVIII^{V634M} mutant. In parallel, the involvement of tissue factor (TF) activity in the anti-FVIII immune response was investigated upon injection of a neutralizing anti-TF antibody or by the use of chimeric mice that lack TF expression in myeloid cells. The development of the anti-FVIII immune response was also monitored after treatment with warfarin. *Results:* The kinetics of the development of antibody responses to FVIII^{V634M} were indistinguishable from those of wild-type FVIII. Inhibition of TF activity did not modulate immune responses to exogenous FVIII. Additionally, global inhibition of coagulation with warfarin failed to reduce the anti-FVIII immune response. *Conclusions:* Thrombin generation or coagulation-associated processes do not modulate the anti-FVIII antibody response in mouse model of severe hemophilia A.

Keywords: blood coagulation; coagulation factor VIII; hemophilia A; humoral immune response; thrombin; tissue factor.

Introduction

Current treatment for factor VIII deficiency requires prophylactic infusions of plasma-derived or recombinant FVIII. However, ~30% of patients with severe hemophilia A develop an immune response to the exogenous FVIII, which renders this treatment ineffective [1]. The immunogenicity of FVIII is rather unique for a protein that is injected intravenously and in the absence of adjuvant [2]. The factors that determine the initiation of anti-FVIII immune responses remain unclear.

The physiologic role of FVIII (in its activated form, FVIIIa) is its participation in the coagulation cascade as a cofactor for activated FIX (FIXa). FVIIIa cofactor activity at the hemorrhagic sites is essential to generate the 'thrombin burst' required for stable clot formation. There is extensive crosstalk between coagulation and inflammation [3]. Hence, events involving coagulation may be sufficient to drive FVIII immunogenicity. Indeed, Skupsky *et al.* [4] showed that inhibition of thrombin generation with either warfarin (an anticoagulant that depletes the vitamin K required for carboxylation of vitamin K-dependent clotting factors such as FVII, FX, and prothrombin, and regulators such as protein C, protein S, and protein Z) or hirudin (a direct thrombin inhibitor) dampens anti-FVIII immune responses in a mouse model of severe hemophilia A. Conversely, Meeks *et al.* [5] have demonstrated that FVIII immunogenicity is independent of its cofactor function.

In this study, we investigated a role for coagulation-associated events in FVIII immunogenicity. First, we confirm that the immunogenicity of FVIII is indepen-

Correspondence: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris F-75006, France.
Tel.: +33 1 44 27 82 02; fax: +33 1 44 27 81 94.
E-mail: Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Received 16 June 2014
Manuscript handled by: W. Ruf
Final decision: P. H. Reitsma, 15 September 2014

© 2014 International Society on Thrombosis and Haemostasis

2066 B. Gangadharan et al

dent of its cofactor function. Next, we show that the immune response to FVIII is independent of tissue factor (TF) activity by using TF-deficient mice and neutralizing antibodies against TF. We also show that pretreatment with warfarin does not modulate antibody responses to FVIII. Together, the data indicate that the initiation of immune responses to FVIII in a mouse model of hemophilia A does not involve coagulation-associated processes.

Materials and methods

The plasmid encoding B domain-deleted recombinant FVIII (HSQ-ReNeo) and BHK-M cells were kind gifts from P. Lollar [6]. Specific activities of wild-type FVIII ranged between 7500 and 10000 IU mg⁻¹ and were < 100 IU mg⁻¹ for FVIII^{V634M}, as shown with either a one-stage clotting assay or a chromogenic assay (data not shown).

For all experiments, we used 6–10-week-old exon 16 FVIII-deficient mice (a gift from H. H. Kazazian, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA) back-crossed on a C57BL/6 background for at least seven generations. Mice were handled in agreement with local ethical authorities (Comité Régional d'Éthique p3/2005/002). The rat anti-mouse TF IgG_{2a} antibody (clone 1H1) [7] was a kind gift from D. Kirchhofer (Genentech, San Francisco, CA, USA). The neutralizing activity of 1H1 against TF *in vivo* was determined *ex vivo* by calibrated automated thrombography with citrated plasma from mice injected with 100 µg of 1H1 or isotype control. Additionally, 1H1 has been shown to inhibit TF-dependent coagulation *in vivo* in mouse models of thrombosis [8]. Chimeric mice were generated by transplantation of bone marrow cells from LysM TF-knockout (LysM-TF KO) [9] or wild-type mice into completely ablated (11 Gy) receiver FVIII-deficient mice. Engraftment was confirmed 8 weeks post-transplantation by PCR analysis [9] on circulating peripheral blood cells, prior to FVIII administration. Replacement therapy was performed with 1 µg of intravenous FVIII once weekly for 4–5 weeks. The anti-FVIII immune response was evaluated by measuring anti-FVIII IgG by ELISA and FVIII inhibitors with a chromogenic assay (Siemens, Marburg, Germany) as described elsewhere [10]. Warfarin (Sigma, St Louis, MO, USA) was administered subcutaneously in peanut oil (5 mg kg⁻¹ or ~ 125 µg), as previously described [4], on day – 3 and day – 1 prior to the first and third FVIII administrations. The effect of warfarin on coagulation was measured 2 days after the second injection by measuring the prothrombin time with Sysmex-CA500 (Siemens). All statistical analyses were performed with the two-tailed non-parametric Mann–

Whitney *U*-test, unless otherwise indicated (PRISM; Graph-Pad Software, La Jolla, CA, USA).

Results and discussion

Coagulation processes involve the sequential activation of several enzymes and cofactors required for stable clot formation. Several of these proteases are also potent activators of inflammation [3,11]. In order to determine whether coagulation-associated signaling events bring about activation signals for the initiation of the anti-FVIII immune response, we compared the kinetics of FVIII antibody responses to wild-type FVIII and to an inactive FVIII mutant. Although the FVIII^{V634M} mutant retains fundamental structural elements required for FVIII procoagulant function, such as the capacity to bind von Willebrand factor (VWF), FIXa, and phospholipids, and being cleaved by thrombin ([5] and data not shown), it has < 2% of the procoagulant activity of wild-type FVIII. We did not observe significant differences in the kinetics of anti-FVIII IgG development induced by FVIII or FVIII^{V634M} (Fig. 1A,B).

We next addressed the role of coagulation-associated processes in the immune response to FVIII by inhibiting TF activity. In order to avoid potential bias resulting from the procoagulant activity of FVIII, all subsequent experiments were performed with inactive FVIII^{V634M}. TF is the key initiator of the coagulation cascade *in vivo* [12]. TF provides an important link between coagulation and inflammation: monocyte-derived TF participates in coagulation-associated events [13], and has been shown to play a role in inflammation [9]. We evaluated the immunogenicity of FVIII^{V634M}, in a context where the expression of TF is lacking in hematopoietic cells. Bone marrow cells from LysM-TF KO mice were transplanted into irradiated hemophilic mice. Bone marrow from congenic C57BL/6 mice was used as a control. The engraftment was verified 8 weeks post-transplantation by PCR on the genomic DNA from blood cells from the recipient mice (Fig. 2A). Engrafted mice were given 1 µg of FVIII^{V634M} at weekly intervals, and the development of an anti-FVIII antibody response was followed. Mice reconstituted with bone marrow from either TF-deficient donors or wild-type donors showed similar immune responses to FVIII^{V634M}, as assessed by ELISA and Bethesda assay (Fig. 2B,C).

We also investigated whether systemic inhibition of TF activity with a TF-specific mAb (1H1) modulates the immune response to FVIII^{V634M}. This mAb has previously been shown to effectively inhibit TF-dependent thrombus formation *in vivo* in mouse models of thrombosis [8]. We first validated the impaired TF-dependent thrombin generation in the plasma of mice treated with 1H1, a neutralizing anti-TF antibody, as compared with mice treated with an isotype control, and found significant reductions in both thrombin peaks (Fig. 3A). The treatment of hemophilic

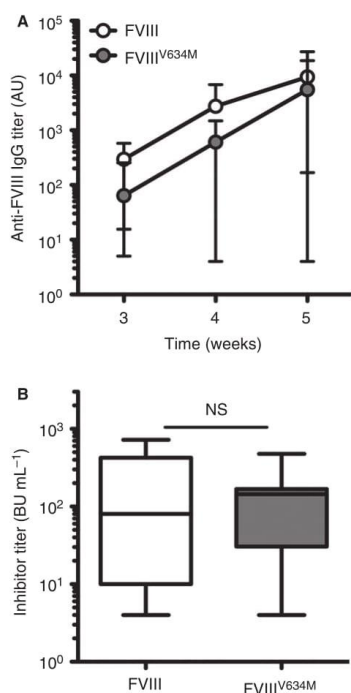


Fig. 1. The cofactor function of FVIII is dispensable for its immunogenicity. Exon 16 FVIII-deficient mice ($n = 8$ per group) were treated intravenously with $1 \mu\text{g}$ of either wild-type FVIII (open circles) or inactive FVIII (FVIII^{V634M}, closed circles) once weekly for 5 weeks. Anti-FVIII IgG responses were monitored after the third FVIII administration, and were followed until the fifth administration. Anti-FVIII IgG titers are defined as arbitrary units (AUs) based on standard curves generated with a purified mouse monoclonal anti-FVIII IgG (mAb6) serially diluted on FVIII-coated ELISA plates. Inhibitory titers were measured with a chromogenic assay. The data are expressed as median \pm range for ELISA titer (A) or a box and whisker plots for inhibitory titers (B). Statistical significance was assessed with the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U -test. BU, Bethesda Units; NS, not significant).

mice with 1H1 did not prevent the onset of an immune response to FVIII^{V634M} (Fig. 3B,C).

We next evaluated the immune response to FVIII^{V634M} after inhibition of coagulation with warfarin. Mice treated with warfarin showed a prolonged prothrombin time as compared with control mice (8.1 ± 0.3 s vs. 26.3 ± 21.6 s, $P < 0.05$; Fig. 4A), thus confirming the anticoagulant effect of warfarin. Although the median titers were lower in the cohort of mice treated with warfarin than in the control group (anti-FVIII IgG titers: 431 vs. 222 AU), we did not observe a significant reduction in the immune response to FVIII^{V634M} ($P = 0.13$; Fig. 4B).

Our results are in contrast to the observations of Skupsky *et al.* [4], who had shown that pretreatment with

warfarin or with a thrombin-specific inhibitor (hirudin) results in significant reductions in anti-FVIII immune responses to B domain-containing wild-type FVIII (Advate). Whether the discrepancy between the two studies relates to differences in levels of anticoagulation achieved remains difficult to assess. Alternatively, it may be speculated that the observed differences partly relate to the nature of the FVIII molecules used. The FVIII^{V634M} mutant was originally identified in a cross-reactive material-positive patient with severe hemophilia A: the patient showed 125% FVIII antigen (FVIII:Ag) in circulation [14]. The B domain-deleted FVIII^{V634M} mutant binds VWF with an affinity similar to that of wild-type FVIII (data not shown and [5]), and is recognized by several mAbs directed against different domains of wild-type FVIII [5]. Importantly, the mutation of Val634 to Met634 is not predicted to generate or abolish immune-dominant T-cell epitopes in C57BL/6 mice, which have the H2-IAb allele (data not shown). Accordingly, the levels of inhibitory anti-FVIII IgG achieved in FVIII-deficient mice were identical whether B domain-deleted FVIII or FVIII^{V634M} was used (Fig. 1).

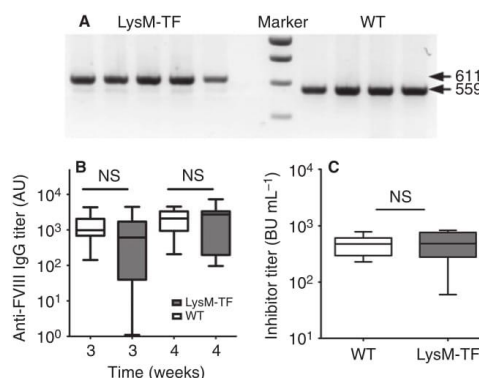


Fig. 2. Monocyte-derived tissue factor (TF) is not a prerequisite for the development of an anti-FVIII immune response. Exon 16 FVIII-deficient mice were transplanted with bone marrow cells from C57Bl/6 or LysM-TF-knockout mice ($n = 8-10$ per group) under complete myeloablation (11 Gy). Eight weeks post-transplantation, genomic DNA from blood cells was purified with the Qiagen DNEasy kit. PCR amplification was performed as described previously [9]. These primers generate fragments of 559 bp for the wild type (WT) allele and 611 bp for the floxed allele. (A) Representative gel migrations of PCR fragments from either LysM-TF-knockout ($n = 5$) or WT ($n = 4$) bone marrow transplanted cohorts. (B, C) Subsequently, mice were treated with $1 \mu\text{g}$ of FVIII^{V634M} intravenously once weekly for four consecutive weeks. Anti-FVIII IgG responses (B) and inhibitory titers (C) were evaluated as described previously. In both panels, open boxes and filled boxes represent WT and LysM-TF-knockout bone marrow recipient cohorts, respectively. Data are represented as box and whisker plots, and statistical significance was assessed with the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U -test. AU, arbitrary units; BU, Bethesda Units; NS, not significant.

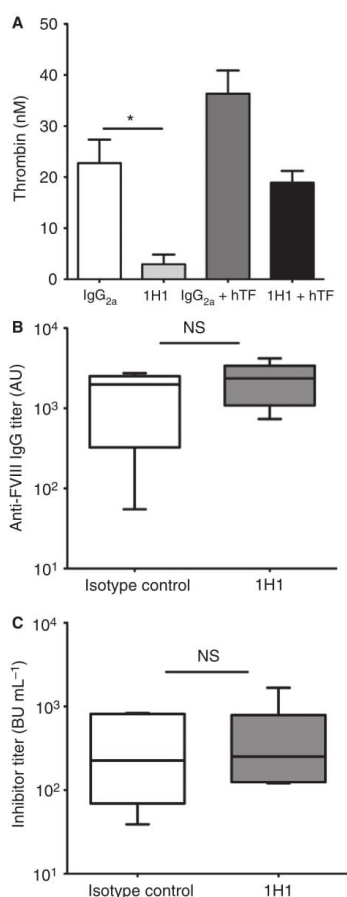


Fig. 3. Administration of anti-tissue factor (TF) antibody does not modulate immune responses to FVIII^{V634M}. (A) To evaluate the inhibitory effect of TF activity, mice ($n = 4$ mice per group) were injected intraperitoneally with 100 μg of 1H1 or isotype control 2 h prior to collection of plasma. Thrombin generation was then measured with calibrated automated thrombography by initiating the reaction with either human TF (hTF) (0.5 μM) or without addition of exogenous hTF. Statistical analysis was performed with a two-tailed Student's t -test ($*: P < 0.05$). (B, C) Next, exon 16 FVIII-deficient mice were first treated intraperitoneally with 100 μg of rat anti-mouse TF antibody (1H1) or isotype control ($n = 8$ mice per group) each week for 4 weeks at least 90 min prior to each FVIII^{V634M} administration. Anti-FVIII IgG responses (B) and inhibitor titers (C) were evaluated as described previously. Data are represented as box and whisker plots. Statistical significance was assessed with the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U -test. AU, arbitrary units; BU, Bethesda Units; NS, not significant.

Factors that predict the onset of inhibitor development in hemophilia A patients can be both genetic and non-genetic [15]. One such non-genetic factor that has been

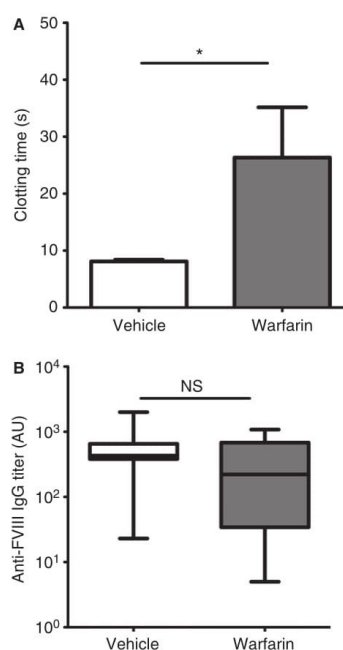


Fig. 4. Warfarin does not modulate the initiation of immune responses to FVIII^{V634M}. (A) Effect of warfarin on clotting time in FVIII-deficient mice. FVIII-knockout mice were treated subcutaneously with 5 mg kg^{-1} warfarin in peanut oil or vehicle alone as control on day - 3 and day - 1. Two days after the second treatment with warfarin, mice were bled retro-orbitally, and prothrombin times were measured with a Sysmex CA-500 automated coagulometer. The data indicate clot time measured in seconds ($n = 6$ mice/group). (B) Effect of warfarin on FVIII^{V634M} immunogenicity. Exon 16 FVIII-deficient mice were treated with 1 μg of FVIII^{V634M} intravenously once weekly for four consecutive weeks. Mice were also treated subcutaneously with 5 mg kg^{-1} warfarin in peanut oil or vehicle alone control ($n = 10$ mice per group) on day - 3 and day - 1 prior to the first and third FVIII administrations. The anti-FVIII IgG responses were evaluated as described previously. Data are depicted as box and whisker plots, and represent the pool of two independent experiments. Statistical significance was assessed with the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U -test. $*P < 0.05$. AU, arbitrary units; NS, not significant.

proposed to be associated with the development of inhibitors is the severity of bleeding and the intensity of treatment associated with the bleeding episodes [16]. As coagulation-associated events and/or inflammation invariably occur at sites of bleeding, it is tempting to speculate that coagulation events provide 'signals' that may initiate an anti-FVIII immune response. However, the data presented in this study do not support a role for coagulation processes, that result in thrombin generation, in the initiation of anti-FVIII antibody responses, at least in the mouse model of hemophilia A. Whether hemorrhages or bleeding-associated inflamma-

tion augment anti-FVIII immune responses warrants further investigation.

Addendum

B. Gangadharan, S. V. Kaveri, and S. Lacroix-Desmazes planned the work. B. Gangadharan, S. Delignat, N. Gupta, and V. Ollivier performed experiments and edited the manuscript. B. Gangadharan and S. Lacroix-Desmazes analyzed the data. N. Mackman contributed essential reagents and critically edited the manuscript. B. Gangadharan, S. V. Kaveri, and S. Lacroix-Desmazes wrote the report. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank D. Kirchhofer (Genentech, Inc., San Francisco, CA, USA) for providing us with the rat anti-TF antibody, and Ying Zhang for her technical assistance. This work was supported by Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by an unrestricted grant from Grifols (Barcelona, Spain).

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- Whelan SF, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, Oldenburg J, Male C, Windyga J, Tiede A, Schwarz HP, Scheiflinger F, Reipert BM. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood* 2013; **121**: 1039–48.
- Schwartz RH. T cell anergy. *Sci Am* 1993; **269**: 62–3.
- Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010; **38**: S26–34.
- Skupsky J, Zhang AH, Su Y, Scott DW. A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 2009; **114**: 4741–8.
- Meeks SL, Cox CL, Healey JF, Parker ET, Doshi BS, Gangadharan B, Barrow RT, Lollar P. A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. *Blood* 2012; **120**: 2512–20.
- Doering CB, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 2002; **277**: 38345–9.
- Kirchhofer D, Moran P, Bullens S, Peale F, Bunting S. A monoclonal antibody that inhibits mouse tissue factor function. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 1098–9.
- Nagai M, Yilmaz CE, Kirchhofer D, Esmon CT, Mackman N, Granger DN. Role of coagulation factors in cerebral venous sinus and cerebral microvascular thrombosis. *Neurosurgery* 2010; **66**: 560–5.
- Pawlinski R, Wang JG, Owens AP 3rd, Williams J, Antoniak S, Tencati M, Luther T, Rowley JW, Low EN, Weyrich AS, Mackman N. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* 2010; **116**: 806–14.
- Meslier Y, Andre S, Dimitrov JD, Delignat S, Bayry J, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Bortezomib delays the onset of factor VIII inhibitors in experimental hemophilia A, but fails to eliminate established anti-factor VIII IgG-producing cells. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 719–28.
- Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front Biosci* 2006; **11**: 59–80.
- Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 958–65.
- Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frere C, Bonier R, Mackman N, Renne T, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012; **120**: 2133–43.
- McGinniss MJ, Kazazian HH Jr, Hoyer LW, Bi L, Inaba H, Antonarakis SE. Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics* 1993; **15**: 392–8.
- Gouw SC, van den Berg HM. The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. *Semin Thromb Hemost* 2009; **35**: 723–34.
- Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; **109**: 4648–54.