



HAL
open science

Immunogénicité du facteur VIII thérapeutique : importance du complément et des domaines C du facteur VIII pour son endocytose

Mathieu Ing

► **To cite this version:**

Mathieu Ing. Immunogénicité du facteur VIII thérapeutique: importance du complément et des domaines C du facteur VIII pour son endocytose. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066637 . tel-01591771

HAL Id: tel-01591771

<https://theses.hal.science/tel-01591771>

Submitted on 22 Sep 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

SPECIALITE : Immunologie

Présentée par Mr

Mathieu ING

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse

**Immunogénicité du facteur VIII thérapeutique :
importance du complément et des domaines C du
facteur VIII pour son endocytose**

Soutenu le **20 septembre 2016**

Devant le jury composé de :

Mme Isabelle CREMER , Professeur, Université Paris VI	(Présidente)
Mr Marc JACQUEMIN , Directeur de Recherche, Université Catholique de Louvain	(Rapporteur)
Mme Marie-Agnès DRAGON-DUREY , Praticien hospitalier, Université Paris V	(Rapporteuse)
Mr Christopher MUELLER , Directeur de Recherche, Université de Strasbourg	(Examinateur)
Mme Isabelle TURBICA , Maître de conférences des universités, Université Paris XI	(Examinatrice)
Mr Sébastien LACROIX-DESMAZES , Directeur de Recherche, CNRS	(Directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Isabelle Cremer d'avoir eu la gentillesse de présider mon jury de soutenance, les Drs Christopher Mueller et Isabelle Turbica, d'avoir accepté d'examiner cette thèse et enfin les Drs Marc Jacquemin et Marie-Agnès Dragon-Durey, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir passé au crible fin mon manuscrit. Merci infiniment pour vos retours et vos précieux conseils qui m'ont beaucoup apporté.

Après cette aventure de trois ans, il me vient un nombre incalculable de personnes que je voudrais remercier. Je m'excuse donc par avance si j'oublie de mentionner des personnes que j'ai côtoyées ces dernières années, n'allez pas croire que je présente quelques déficits cognitifs (quoique...).

Je tiens à remercier le Dr Srinivas V. Kaveri d'avoir ouvert les portes de son laboratoire il y a cinq ans au petit étudiant de Master que j'étais. Grand amateur de cacao, merci pour ton humour et ta bonne humeur quand tu étais encore parmi nous, ainsi que pour ton soutien et ta générosité. J'espère que nos petites leçons linguistiques politiquement incorrectes te serviront un jour ! (N.d.A. : je décline toute responsabilité dans d'éventuelles altercations consécutives)

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Sébastien Lacroix-Desmazes. On a vécu tant de choses ensemble depuis mes débuts dans ce laboratoire. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait toutes ces années. Merci de m'avoir accordé ta confiance dans cette aventure, surtout que cela n'a pas dû être simple avec mon « réalisme » à gérer, j'espère qu'il n'a pas déteint sur toi, sinon tu es mal barré ! Merci en tout cas pour ton dévouement, pour tout ce que tu m'as appris entre deux sessions de violons, pour le soutien personnel dont tu sais si bien faire preuve, même malgré l'éloignement géographique, merci pour toutes ces discussions scientifiques comme non-scientifiques qu'on a pu avoir et enfin merci de m'avoir partagé les contrepèteries que tu avais dans ton sac.

Je tiens à remercier le trio féminin de choc que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ma thèse.

Je remercie du fond du cœur le Dr Julie Rayès. Merci Julie de m'avoir encadré en Master, tu as joué un rôle majeur dans les prémices de cette thèse. On a passé trois ans à approfondir les mystères du complément mais notre aventure s'arrête ici désormais. Tu as su me mettre à l'aise dès le début avec le merveilleux monde de l'hématologie, que j'exécrais jusqu'à maintenant, moyennant certains fameux « petits services ». Le fait qu'on soit deux Verseaux nous a sûrement rapprochés (les autres ne nous comprennent pas, je t'assure !). Merci infiniment pour ta gentillesse, ton franc-parler et pour tout ce que tu m'as enseigné, notamment le freestyle et le relativisme !

Je tiens également à remercier le futur Dr Sandrine Delignat, sans qui le laboratoire aurait bien du mal à tourner ! Je te suis infiniment reconnaissant pour tout ce que tu as fait ces dernières années au laboratoire. Avec toutes les tâches qui t'incombent, je reste admiratif sur ta décision d'avoir commencé une thèse. Toujours prête à venir en aide, je te remercie du fond du cœur pour ta sympathie, ta gentillesse, ton stoïcisme face à mes interrogations sottes, ton soutien et tes conseils dans les moments difficiles ainsi que pour ton oreille attentive quand j'en avais besoin. Prends soin de toi et, au fait, n'oublie jamais ce que disait Hegel...

Dernière dame du trio et pas des moindres, je remercie le Dr Lubka Roumenina, grande adoratrice du complément aux Cordeliers, qui a su me montrer la beauté de la cascade du complément, bien que cela ressemble plus au Cri de Rodin qu'à la Vénus de Milo... Je ne sais pas combien de fois que

je t'ai harcelé ces trois ans pour comprendre les subtilités de la nébuleuse du complément, j'espère que mes offrandes riches en théobromine ont su compenser les désagréments. Je te remercie infiniment pour ton soutien, depuis mes premiers pas en licence jusqu'à la fin de la thèse, pour ta gentillesse, pour toutes les discussions qu'on a pu avoir et pour les innombrables tubes de réactifs du complément que tu m'as donné !

I would like to thank Dr Jordan Dimitrov. Though we didn't spend a lot of time in the same office, thank you very for having shared your interesting (!) passions for photography (thank you for the pictures!) and your eclectic taste for music, from Jacques Brel songs to symphonic metal. Your optimism has succeeded to offset my realism. Thank you for your interesting kindness, your interesting support and your interesting expertise throughout this interesting scientific journey (did I say "interesting"?)!

Je tiens également à remercier Maxime, mon coloc' de bureau. Je ne sais toujours pas comment tu as fait pour ne pas avoir pété un câble encore alors que je t'en ai fait voir des vertes et des pas mûres depuis deux ans, et en particulier en cette fin de thèse (je suspecte toutefois un ulcère gastrique...). Quoi qu'il en soit, je te remercie du fond du cœur pour ta bonne humeur et ton aide infiniment précieuse tant scientifique qu'informatique, je n'oublierai pas les bon moments qu'on a passés dans notre dizaine de mètres carrés, nos fous rires, nos discussions sur l'épilepsie capillaire, l'intérêt du lave-vaisselle ou encore la nourriture bio que tu abhorres tant. Je tiens également à remercier Ana- ... Annaël- ... Annaelle. Un grand merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tous les moments qu'on a partagés ensemble, à l'intérieur comme à l'extérieur du laboratoire, entre nos discussions autour du transit intestinal et les fois où on te faisait tourner en bourrique avec Mister Lecerf (c'est de sa faute, pas de la mienne) ! Je tiens aussi à remercier Jules, pour son aide précieuse ces derniers mois, son humour et sa joie de vivre inaltérable. Je te souhaite bon courage pour la suite, « la route est droite mais la pente est forte », comme disait un ancien premier ministre.

I also would like to thank the members of the Intravenous Immunoglobulin team: Dr Jagadeesh Bayry, thank you very much for your support and your kindness during those past few years, for speaking in French with me though it was sometimes kinda difficult, for all these discussions we had about soccer, tennis and any sport listed in the Olympics and for your funny jokes! I would like to thank Emmanuel, my PhD third year companion: we have been through lots of experience, especially this year, we've encountered the highs and the lows of the PhD. Thank you for your help and your kindness, I think I'll never forget neither your loud laughs that resonated in the corridor of the lab nor our discussions about everything late in the evening/night! I also would like to thank Mrinmoy, Caroline and Anupama for their support, their good mood and their sympathy throughout these years. You're forming an awesome team, keep on like this, you're lucky, you'll be rewarded and your soul will be spared.

Je tiens à remercier Véronique pour toute l'aide qu'elle m'a apporté, tant du point de vue administratif, avec tous ces documents à fournir, programmes, billets, contrats aussi complexes que le laissez-passer A38 qu'un Gaulois cherchait il y a quelques décennies, que du point de vue personnel, avec toutes les discussions qu'on a pu avoir. Je remercie également Justa pour sa gentillesse, sa bonne humeur et toute l'aide logistique qu'elle a pu m'apporter depuis que je suis arrivé dans ce laboratoire, merci infiniment.

Je tiens aussi à remercier les anciens membres du laboratoire auprès desquels j'ai beaucoup appris tant sur les plans scientifique, professionnel, que culturel, personnel et sans qui je ne serai pas ce

que je suis maintenant (c'est profond ce que je dis là...) : un grand merci à Selma, pour son éternel soutien et pour m'avoir assisté dans mes premiers pas dans ce laboratoire ; special thanks to Ankit, for having taken me under his wing few years ago ; to Meenu and Pushpa, for their great kindness, their patience and all the good times we shared together ; un grand merci à Cyril, pour sa bonne humeur et son goût pour le lyrisme paillard ; à Ivan, pour ses métaphores poignantes sur l'oignon ; à Laurent, pour son soutien et sans qui je n'aurais pu procéder à des saignées au nom de la science. I also would like to thank Chaitrali, for her kindness and her good mood every day as well as Nimesh, for his expertise, his support and all these discussions about sales! Special thanks to Bagirath: though it has been a tough time for both of us, I am grateful for everything you taught me and I won't forget all those discussions around a good Poori at Saravanaa Bhavan.

Je tiens à remercier la bande des joyeux lurons des Jeunes Chercheurs : big up à Mathieu, Anthony, Charlotte, Audrey et toute la dream team des Cordeliers, merci d'avoir animé tous ces Afterworks et merci pour tous les bons moments qu'on a eu en salle Danton autour d'un bon verre de vin !

Je tiens également à remercier mes compagnons de fortune/infortune (rayer mention inutile) : Nicolas, Sothea, Angeline, Lloyd et Alexandra. Beaucoup d'événements se sont passés depuis qu'on a quitté les bancs de la fac. On aura vécu ensemble les aléas de la thèse et ses rebondissements, partagé le meilleur comme le pire, surtout quand la malchance se transforme en meilleure amie ! Que ce soit dans quelques jours, quelques semaines, quelques mois, le bout du tunnel n'est plus très loin !

Je remercie aussi tous mes amis qui m'ont accompagné et soutenu pendant ma thèse, de près comme à des milliers de kilomètres d'ici, que j'ai connus bien avant de m'engager dans cette aventure ou en cours de route, et qui m'ont apporté une bonne bouffée d'air frais dans mon bunker qui commençait vraiment à sentir le renfermé !

Je tiens également à remercier toute ma famille pour tout le soutien qu'elle m'a apporté ces trois dernières années et surtout pour toute la compréhension dont elle m'a fait part quant aux aléas du doctorat. Un grand merci du fond du cœur à mes parents, à Mary, à Guillaume et au dernier arrivé dans la famille, Nathan, qui m'a montré qu'on se prenait vraiment la tête pour rien en grandissant et qu'un bon coup de marteau en plastique suffisait amplement pour résoudre un problème.

Aussi, et pas des moindres, je tiens à remercier PHD Comics et Ciel mon doctorat, qui m'ont permis d'apprécier le doctorat dans toute sa splendeur, de relativiser sur ma condition de doctorant et d'admirer son caractère universel ; je tiens aussi à remercier Mark Zuckerberg, Chad Hurley, Steve Chen et Jawed Karim, ainsi que Jimmy Wales et Larry Sanger qui m'ont permis, chacun à leur manière, d'appréhender ce qu'était cette procrastination tant chérie par le commun des mortels ; et je remercie Koreus, sans qui, chaque jour, je n'aurais pu vivre et survivre au cours de ce périple scientifique!

Et pour terminer, merci à toi ! Oui, toi ! Coucou, je te vois ! Tu ne t'y attendais pas hein ? Avec tes yeux qui se déplacent de gauche à droite sur cette page, poussés par ce défilé interminable de mots. Ça va ? Bien la famille ? En tout cas, je tiens à te remercier d'avoir consacré un peu de ton temps à lire ces quelques lignes. J'espère au moins qu'elles t'auront fait sourire ! N'hésite pas à continuer ta lecture, je ne te dirai pas qui montera sur le Trône de Fer ou si la toupie tombe ou non à la fin du film, mais je pourrais peut-être t'apprendre deux-trois trucs pour briller en société ☺

RESUME

L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare consécutive à l'absence en facteur VIII de la coagulation (FVIII) fonctionnel. Cette pathologie se manifeste par des saignements récurrents dont les complications peuvent mettre en jeu le pronostic vital des patients. Pour compenser cette absence, la stratégie thérapeutique de choix consiste en l'administration intraveineuse de FVIII thérapeutique. Toutefois, elle s'accompagne chez 5 à 30% des patients traités d'une réponse immunitaire caractérisée par la survenue d'anticorps neutralisants dits inhibiteurs. Ces anticorps inhibent l'activité pro-coagulante du FVIII et constituent un échec thérapeutique. Si la phase effectrice de la réponse immunitaire anti-FVIII, la nature des cellules impliquées et les propriétés des inhibiteurs ont été largement documentées, les étapes précoces de la réponse demeurent mal connues.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai cherché à déterminer le potentiel rôle adjuvant du complément dans la réponse immunitaire anti-FVIII. Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques impliquées dans l'élimination des agents pathogènes. Acteur majeur de l'immunité innée, le complément participe également à la mise en place des réponses immunitaires humorales adaptatives contre les agents infectieux. Cependant, son rôle dans les réponses immunitaires dirigées contre les protéines thérapeutiques, telles que le FVIII, n'est pas connu. A l'aide d'un modèle murin d'hémophilie A sévère, j'ai montré que la déplétion du complément réduisait drastiquement la survenue d'anticorps neutralisants. A l'inverse, l'activation chronique du complément stimule la génération d'anticorps anti-FVIII. Je me suis intéressé au rôle potentiel du complément sur l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII. *In vitro*, j'ai montré que le composant central C3 du complément, et en particulier le fragment C3b issu de son activation, ainsi que le composant C1q, molécule initiant la voie classique du complément, favorisaient l'endocytose du FVIII par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ainsi que sa présentation antigénique à des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques. En revanche, le complément n'est pas pourvoyeur de signaux de danger et n'induit pas la maturation des CPA.

Si des études antérieures ont souligné l'importance du domaine C1 du FVIII pour son immunogénicité, et en particulier pour son internalisation par les CPA, j'ai cherché dans la seconde partie de ma thèse à savoir si le domaine C2, homologue au domaine C1, participait également à la réponse immunitaire anti-FVIII. Le masquage du domaine C2 à l'aide d'un anticorps monoclonal (BO2C11) réduisait drastiquement l'endocytose du FVIII et sa présentation antigénique *in vitro*. *In vivo*, l'administration de FVIII complexé à BO2C11 diminuait fortement la survenue d'inhibiteurs. Par mutagenèse dirigée, j'ai déterminé que certains acides aminés, dont l'arginine située dans le domaine C2 en position 2215, étaient impliqués dans la capture du FVIII par les cellules dendritiques *in vitro*. L'introduction des mutations dans le domaine C2, mais également dans le domaine C1, n'altérait pas l'immunogénicité du FVIII chez les souris déficientes en FVIII. De manière intéressante, l'administration des mutants des domaines C du FVIII chez des souris déficientes en FVIII et en facteur de Willebrand (vWF) conduisait à une réduction de la réponse immunitaire dirigée contre le mutant du domaine C1 mais pas contre le mutant du domaine C2.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse mettent en évidence pour la première fois la contribution du système du complément dans la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique, ainsi que l'implication de certains déterminants structurels portés par les domaines C du FVIII pour son endocytose par les CPA. Combinés aux résultats déjà décrits dans la littérature sur l'implication des domaines C1 et C2 ainsi que sur l'effet immuno-protecteur du vWF, mes travaux permettent de proposer plusieurs modèles d'endocytose du FVIII par les CPA. Des études approfondies sont nécessaires pour déterminer exactement la contribution du complément sur l'ensemble de la réponse immunitaire anti-FVIII ainsi que les récepteurs cellulaires impliqués dans l'internalisation du FVIII. Des résultats positifs permettraient d'envisager sur le long terme le développement de FVIII thérapeutiques moins immunogènes ou encore la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques immuno-modulatrices.

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail de thèse repose sur les publications suivantes :

Article 1 : Rayes J*, **Ing M***, Peyron I, Delignat S, Gilardin L, Vogel CW, Fritzing DC, Lambris J, Frémeaux-Bacchi V, Kaveri SV, Roumenina LT, Lacroix-Desmazes S. Complement C3 facilitates endocytosis of therapeutic factor VIII by antigen-presenting cells. Blood (soumis).

Article 2 : **Ing M**, Rayes J, Delignat S, Roumenina LT, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Complement C1q promotes FVIII endocytosis and presentation by dendritic cells. (en preparation).

Article 3 : 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. (en révision).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	12
1. Immunogénicité des protéines thérapeutiques	13
2. Hémophilie A	16
2.1 – Présentation de la pathologie	16
2.2 – Génétique de l’hémophilie A.....	17
2.3 – Facteur VIII	18
2.3.1 – Synthèse et structure du FVIII.....	18
2.3.2 – Hémostase.....	20
2.3.3 – Rôle du FVIII dans l’hémostase secondaire.....	23
2.4 – Traitements des épisodes hémorragiques et complications associées	25
2.4.1 – Traitements des saignements	25
2.4.2 – Produits thérapeutiques	25
2.4.3 – Complications du traitement	26
2.4.4 – Traitement/prévention des hémorragies chez les patients avec inhibiteurs	27
3. Réponse immunitaire dirigée contre le facteur VIII.....	28
3.1 – Interactions entre le facteur VIII et les cellules présentatrices d’antigènes.....	29
3.1.1 – Sites d’interaction potentiels	29
3.1.2 – Cellules présentatrices d’antigènes	30
3.1.3 – Internalisation du facteur VIII	31
3.2 – Maturation des cellules présentatrices d’antigènes	35
3.3 – Activation des lymphocytes T	36
3.4 – Activation des lymphocytes B	37
3.5 – Facteurs de risque associés à la survenue d’inhibiteurs	38
3.5.1 – Nature des produits thérapeutiques administrés	39
3.5.2 – Facteurs de risque génétiques	39
3.5.3 – Facteurs de risque environnementaux	41
4. Le système du complément.....	43
4.1 – Présentation.....	43
4.2 – Fonctions principales du complément	47
4.3 – Régulation du complément.....	48
4.4 – Modulation du système immunitaire par le complément	50
4.5 – Relations entre complément et coagulation	55
5. Objectifs de la thèse.....	60

RESULTATS	61
1. L'activation du complément potentialise la capture du facteur VIII par les cellules présentatrices d'antigènes	62
2. Le composant C1q du complément favorise l'internalisation et la présentation antigénique du FVIII par des cellules dendritiques <i>in vitro</i>	100
3. Les domaines C1 et C2 du facteur VIII sont importants pour son endocytose par les cellules dendritiques.....	112
DISCUSSION	146
1. Rôle du complément dans la réponse immunitaire anti-FVIII	147
2. Capture du FVIII : rôle de la structure pour son immunogénicité.....	156
3. Implications thérapeutiques potentielles.....	163
CONCLUSIONS.....	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	170
ANNEXES.....	194

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Exemples de protéines utilisées en thérapie et connues pour induire une réponse immunitaire humorale après administration à des patients	15
Figure 2. Structure du FVIII	19
Figure 3. Hémostase primaire	20
Figure 4. Hémostase secondaire	22
Figure 5. Activation du FVIII	23
Figure 6. Structure cristallographique du FVIII	24
Figure 7. Représentation schématique de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique	29
Figure 8. Endocytose et présentation antigénique du FVIII	35
Figure 9. Activation des lymphocytes T CD4⁺ par les CPA	37
Figure 10. Activation des lymphocytes B	38
Figure 11. Voies d'activation du complément	46
Figure 12. Régulation du complément	50
Figure 13. Dialogue entre complément et coagulation	60
Figure 14. Internalisation du FVIII muté dans le domaine C1 en présence de complément	160
Figure 15. Mécanismes potentiels d'endocytose du FVIII par les CPA	161

ABREVIATIONS

ADA	Anti-drug antibodies
ADAMTS-13	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13
ARNm	ARN messenger
ASPGR	Asialoglycoprotein receptor
BCR	B cell receptor
BM-DCs	Cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse
C1Inh	C1 inhibiteur
C4BP	C4b binding protein
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CR	Complement receptor
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
CVFh	Cobra venom factor humanisé
DAF	Decay Accelerating Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FB	Facteur B
FD	Facteur D
FDC	Cellules dendritiques folliculaires
FH	Facteur H
FI	Facteur I
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FVa	Facteur V activé
FVIII	Facteur VIII
FVIIIa	Facteur VIII activé
FX	Facteur X
FXa	Facteur X activé
FXIa	Facteur XI activé
FXIIa	Facteur XII activé

HSP	Protéines de choc thermique
HSPG	Heparan sulfate proteoglycans
IFN- γ	Interféron- γ
IgG	Immunoglobulines de classe G
IL	Interleukine
ITI	Induction de tolérance immunitaire
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharide
LRP1	Lipoprotein receptor-related protein 1
LT	Lymphocyte T
MAC	Complexe d'attaque membranaire
MASP	MBL-associated serine protease
MBL	Mannose-binding lectin
MCP	Membrane cofactor protein
MO-DCs	Cellules dendritiques dérivées de monocytes
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
pdFVIII	Facteur VIII dérivé de plasma
PS	Phosphatidylsérine
RAP	Receptor-associated protein
rFVIII	Facteur VIII recombinant
Siglecs	Sialic-acid binding immunoglobulin-like lectins
TCR	T cell receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
t-PA	tissue-type plasminogen activator
Tregs	Lymphocytes T régulateurs
UB	Unités Bethesda
vWF	facteur de Willebrand

INTRODUCTION

1. Immunogénicité des protéines thérapeutiques

L'administration de protéines à des fins thérapeutiques est fréquemment réalisée de nos jours pour traiter un large spectre de pathologies : du déficit congénital (hémophilie A/B, maladie de Willebrand) aux maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, sclérose en plaques), en passant par les infections virales et les cancers (De Groot and Scott, 2007; Tovey and Lallemand, 2011), les protéines thérapeutiques détiennent désormais une place importante dans l'arsenal thérapeutique et leur usage a révolutionné la médecine actuelle.

Selon les pathologies ciblées, l'utilisation de ces protéines permet de pallier les déficits quantitatifs ou fonctionnels en certaines protéines endogènes, comme dans les déficits congénitaux (cf. hémophilie), ou encore de contrôler l'évolution de certaines maladies, en modulant les réponses immunitaires ou inflammatoires, comme dans les pathologies auto-immunes et les cancers. Malheureusement, l'utilisation de ces produits thérapeutiques peut s'accompagner d'une réponse immunitaire dirigée contre la protéine administrée. Cette réponse immunitaire délétère se caractérise par la génération d'anticorps anti-protéine thérapeutique (Anti-Drug Antibodies, ADA), qui peuvent bloquer le potentiel bénéfique de la protéine apportée. Cette immunogénicité varie selon les produits thérapeutiques utilisés (**Figure 1**). Ainsi, le risque de développer des ADA est-il très élevé lorsqu'on administre des cytokines (>50% des patients, (Prümmer, 1997; Rini et al., 2005)). A l'inverse, le taux d'allo-anticorps est beaucoup plus faible quand on traite des patients avec des facteurs de coagulation (<30% des patients, (DiMichele, 2007; Gouw et al., 2007)).

Les conséquences de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques sont variées. Il est possible que les ADA générés n'aient aucun impact sur la fonction de la protéine et que la thérapie ne soit donc pas compromise. *A contrario*, certains ADA peuvent drastiquement altérer l'efficacité des produits utilisés : cela peut être le cas en utilisant du facteur VIII ou encore des interférons (Lollar, 2004; Malucchi et al., 2004). On parle alors d'anticorps neutralisants. Différents mécanismes de neutralisation peuvent être avancés : les anticorps générés peuvent entraver la fonction de la protéine, voire l'abroger complètement. Les ADA peuvent affecter les propriétés pharmacocinétiques du produit thérapeutique et altérer sa biodisponibilité dans l'organisme. Les ADA peuvent aussi causer des réactions d'hypersensibilité voire des chocs anaphylactiques et conduire, dans certains cas, au déclenchement de réactions auto-immunes. Par exemple, l'apparition d'ADA consécutive à l'injection d'érythropoïétine exogène, destinée à traiter les

— INTRODUCTION —

patients anémiés, peut s'accompagner d'une aplasie pure des globules rouges (Casadevall et al., 2002), due à une réaction croisée avec la protéine endogène : sa fonction est alors neutralisée, ce qui conduit à une érythroblastopénie sévère chez les patients traités.

Les facteurs influençant l'immunogénicité des protéines thérapeutiques sont extrêmement variés: alors qu'initialement l'origine animale des produits (cf. insuline bovine/porcine) était incriminée comme étant la source d'une réponse immunitaire xénogénique, il s'est avéré que les ADA étaient également produits même quand étaient injectés des produits purifiés d'origine humaine, comme l'hormone de croissance ou l'insuline (Scherthaner et al., 1983).

La qualité du produit thérapeutique entre également en jeu : dégradation des protéines par oxydation/déamination, génération d'agrégats, défaut en glycosylation, présence d'endotoxines issues des cellules hôtes dans le cas de protéines recombinantes, etc., ces facteurs peuvent potentialiser la mise en place d'une réponse immunitaire (Schellekens, 2002). Toutefois, l'amélioration des processus de production a permis de pallier cette limite.

Plusieurs facteurs de risque reposent sur les patients. Par exemple, le statut inflammatoire des patients, exacerbé par la pathologie, peut fortement influencer la façon dont le système immunitaire considère la protéine thérapeutique au moment de l'administration. A l'inverse, des états d'immunodépression réduisent le risque d'une allo-immunisation contre certains anticorps thérapeutiques administrés en thérapie anti-tumorale. Dans les thérapies de substitution, lorsque la protéine endogène fait défaut, l'absence d'éducation lors de l'ontogenèse du système immunitaire peut conduire à un manque de tolérance immunitaire vis-à-vis de cette protéine. Pour autant, et à titre d'exemple, seule une fraction des patients atteints d'hémophilie B sévère, qui est caractérisée par l'absence de facteur IX (FIX) circulant, développe des anticorps anti-FIX (jusqu'à 23% des patients, (DiMichele, 2007)) après injection de FIX thérapeutique, démontrant ainsi que le défaut d'éducation immunitaire n'est pas le critère unique qui régit l'immunogénicité des protéines thérapeutiques.

Enfin, la durée de traitement et la voie d'administration de la protéine thérapeutique peuvent aussi influencer la réponse immunitaire : une administration itérative du produit sur une longue période favorise une rencontre avec le système immunitaire et facilite potentiellement une rupture de tolérance immunitaire, avec génération d'ADA de forte affinité. Par ailleurs, certaines voies d'injection sont plus immunogènes que d'autres (voie intramusculaire/sous-cutanée > voie intraveineuse, (Scherthaner, 1993)).

— INTRODUCTION —

De nombreux progrès ont été réalisés pour diminuer les risques de développer des ADA : amélioration des procédés de purification pour limiter les risques de contamination, modification chimique des protéines (ex : couplage à du polyéthylène glycol) pour améliorer la biodisponibilité du produit dans l'organisme ou limiter sa reconnaissance par le système immunitaire (Armstrong et al., 2007; Ing et al., 2015, 2016)). Malgré tous ces efforts, la génération d'ADA persiste et constitue un problème majeur récurrent.

L'apparition d'ADA nécessite dès lors d'adapter les stratégies thérapeutiques mises en place : traiter les effets collatéraux des ADA, augmenter la posologie des produits administrés ou passer à des traitements alternatifs s'ils existent. Ainsi, l'apparition d'ADA a-t-elle un impact socio-économique très important. Une compréhension approfondie des mécanismes qui sous-tendent l'apparition d'une réponse immunitaire menant à la production d'ADA est une priorité pour éradiquer la survenue de cette réponse délétère mais aussi améliorer l'efficacité des produits thérapeutiques à long terme.

Protéine thérapeutique	Pathologie	Réponse immunitaire
Erythropoïétine	Anémie	Réaction croisée avec la protéine native Aplasie pure des globules rouges décrite
Facteur V	Parahémophilie	Allo-anticorps : 3%
Facteur VIII	Hémophilie A	Allo-anticorps : 5-30% Perte d'efficacité
Facteur IX	Hémophilie B	Allo-anticorps : 1-23% Perte d'efficacité Anaphylaxie décrite
Facteur de Willebrand	Maladie de Willebrand	Allo-anticorps : 3-9% Perte d'efficacité
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Neutropénie, cancers	Allo-anticorps : > 90% Perte d'efficacité
Insuline	Diabète de type I	Impact sur le contrôle glycémique
Interleukine-2	Cancers, syndrome d'immunodéficience	Allo-anticorps : > 50%
Interféron de type I	Hépatite, cancers, sclérose en plaques	Allo-anticorps : 2-41% Réaction croisée avec la protéine native
Megakaryocyte growth and development factor	Thrombocytopénie	Réaction croisée avec la protéine native Thrombocytopénie sévère décrite

Figure 1. Exemples de protéines utilisées en thérapie et connues pour induire une réponse immunitaire humorale après administration à des patients (D'après (Dasgupta et al., 2008a; Malucchi and Bertolotto, 2008)).

2. Hémophilie A

2.1. Présentation de la pathologie

L'hémophilie A est l'une des plus fréquentes maladies hémorragiques connues, avec une incidence de l'ordre d'une naissance sur 10 000 (Mannucci and Tuddenham, 2001). Il s'agit d'une maladie congénitale rare à transmission récessive et liée au chromosome X. Elle implique donc que les patients soient de sexe masculin, à quelques exceptions près. Cette pathologie se caractérise par des anomalies génétiques affectant le gène codant le facteur VIII de la coagulation (FVIII), ce qui se traduit par un défaut quantitatif et/ou qualitatif en FVIII pro-coagulant dans le sang.

L'hémophilie A se manifeste par des hémorragies chroniques qui se déclenchent de manière spontanée ou suite à des traumatismes récurrents, en particulier au niveau des tissus mous (hématomes) et des articulations (hémarthroses). Ces saignements à répétition peuvent conduire au développement d'arthropathies invalidantes, pouvant évoluer en paralysies. Enfin, jusqu'à 10% des patients hémophiles développent des hémorragies intracrâniennes et extracrâniennes, qui peuvent dès lors mettre en jeu le pronostic vital des patients (Daniele et al., 2011; Klinge et al., 1999; Richards et al., 2012).

L'hémophilie A est une maladie hétérogène. L'ampleur des manifestations cliniques est liée à la sévérité du défaut en FVIII, qui est déterminée en fonction de l'activité résiduelle du FVIII mesurée dans le plasma des patients. L'hémophilie A est considérée comme mineure lorsque l'activité résiduelle du FVIII est comprise entre 5 et 40% de la valeur déterminée dans le plasma d'un donneur sain, modérée si la valeur est comprise entre 1 et 5% de la valeur normale et sévère si l'activité résiduelle du FVIII est inférieure à 1% (White et al., 2001). Par ailleurs, la répartition des patients hémophiles entre ces trois catégories n'est pas homogène : ainsi, les hémophiles A mineurs représentent 50% de la population malade, les modérés 10% et les patients hémophiles A sévères 40% (Antonarakis et al., 1995).

Chez les patients hémophiles A mineurs, les saignements n'apparaissent pas de manière spontanée mais seulement suite à un traumatisme ou lors d'interventions chirurgicales. Chez les patients hémophiles A sévères, la maladie se manifeste fréquemment sous forme d'ecchymoses, d'épistaxis, de saignements spontanés au niveau des articulations et des muscles ou de saignements excessifs à la suite d'un traumatisme mineur. Quant aux patients hémophiles A modérés, ils dépeignent des symptômes entre les deux extrêmes (Rosendaal et al., 1991).

2.2. Génétique de l'hémophilie A

Les anomalies génétiques à l'origine de l'hémophilie A sont extrêmement variées et participent à l'hétérogénéité phénotypique rencontrée dans cette pathologie (Rallapalli et al., 2014). Alors que la majorité des mutations touche le gène codant le FVIII (gène *F8*), il est intéressant de noter l'existence de cas d'hémophilie A consécutive à des mutations touchant des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire du FVIII (Cunningham et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Le gène codant le FVIII (gène *F8*) est situé à l'extrémité du bras long du chromosome X, en position Xq28, et s'étend sur 186 kpb (Bowen, 2002; Gitschier et al., 1984). Le gène *F8* comprend 26 exons d'une taille allant de 69 à 3106 pb, qui sont transcrits en un ARN messenger (ARNm) de 9 kb, soit 5% de la taille initiale du gène. Les 95% restants correspondent aux introns du gène qui, même s'ils ne sont pas exprimés, peuvent porter des mutations à l'origine d'une absence en FVIII fonctionnel. Des sites d'épissage alternatif peuvent aussi être créés et conduire à l'intégration d'introns dans l'ARNm (Pezeshkpoor et al., 2013).

Les anomalies touchant le gène *F8* comprennent des mutations ponctuelles, des délétions/insertions de séquences/nucléotides ainsi que des réarrangements géniques.

Les mutations ponctuelles constituent la plus fréquente anomalie génétique et sont retrouvées chez plus de la moitié de la population hémophile. Elles comprennent des mutations faux-sens, des mutations non-sens ainsi que des mutations affectant l'épissage des ARNm (Bhopale and Nanda, 2003; Bowen, 2002). Les mutations faux-sens conservatives sont associées à un phénotype mineur sauf si elles touchent des régions importantes pour la fonction ou la structure du FVIII. A l'inverse, les substitutions non conservatives sont plutôt associées à un phénotype modéré voire sévère, en raison d'un risque accru de générer un FVIII dont la structure est déstabilisée. Les mutations non-sens, à l'origine de codons stop prématurés, se traduisent par une protéine tronquée ayant de fortes chances de ne pas être fonctionnelle. Ces mutations sont de ce fait associées à une forme sévère d'hémophilie A. Les effets des mutations qui abolissent ou génèrent des sites d'épissage sont variables, selon que les transcrits produits sont convenablement traduits (hémophilie mineure/modérée) ou non (hémophilie sévère).

Deuxièmes anomalies les plus fréquentes parmi les cas d'hémophilie A, les délétions sont retrouvées chez 5 à 10% des patients. Elles peuvent éliminer un pan entier du gène *F8* ou encore être à l'origine d'un décalage dans le cadre de lecture du gène *F8*. Les délétions sont généralement associées à un phénotype sévère.

— INTRODUCTION —

Les réarrangements géniques sont des événements assez rares, à l'exception de l'inversion de l'intron 22, dont la prévalence est de 45-50% chez les patients hémophiles A sévères (Gouw et al., 2012; Lakich et al., 1993; Naylor et al., 1993). Suite à une recombinaison homologue, le gène *F8* se retrouve interrompu, avec les exons 1-22 dans une direction et les exons 23-26 dans l'autre direction. La production d'un ARNm contenant tous les exons n'est dès lors plus possible, il n'y a pas de production de FVIII et un phénotype sévère en résulte. Il a été récemment observé que des patients présentant une inversion de l'intron 22 arrivaient à synthétiser du FVIII sous la forme de deux chaînes polypeptidiques dépourvues d'activité et exclusivement retrouvées à l'intérieur de certains types cellulaires, comme les cellules mononucléées issues du sang périphérique mais les résultats sont controversés (Pandey et al., 2013).

Enfin, chez certains patients, le FVIII est produit mais n'est pas fonctionnel : 5% des patients hémophiles A possèdent du FVIII circulant à un niveau normal mais aucune activité biologique n'est détectable dans le plasma (Amano et al., 1998; Rallapalli et al., 2014). Ainsi, le fait que les patients présentent un large spectre d'anomalies génétiques, qui se manifestent de manière variée sur le plan phénotypique, fait-il de l'hémophilie A une maladie très hétérogène.

2.3. Facteur VIII

2.3.1. Synthèse et structure du FVIII

Le site de synthèse du FVIII fait l'objet de nombreux débats. Initialement localisé au niveau des hépatocytes puis au niveau des cellules endothéliales sinusoidales du foie (Hellman et al., 1989; Ingerslev et al., 1988), on sait désormais que le FVIII est synthétisé par de nombreuses sous-populations de cellules endothéliales (Everett et al., 2014; Jacquemin et al., 2006; Pan et al., 2016; Shahani et al., 2014). De récentes études chez la souris pointent également l'existence d'une production par les cellules myéloïdes mais les résultats restent controversés (Everett et al., 2014; Zanolini et al., 2015).

Le FVIII est une glycoprotéine qui se présente sous la forme d'un hétérodimère de 280 kDa constitué d'une chaîne lourde comprenant trois domaines : A1, A2 et B ; et d'une chaîne légère comprenant les domaines A3, C1 et C2 (**Figure 2**). Les deux chaînes sont associées par des interactions non-covalentes, via un cation divalent. Deux segments riches en acides aminés succèdent aux domaines A1 et A2 et un autre précède le domaine A3. Les domaines du FVIII s'agencent ainsi de cette manière : (NH₂) A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (CO₂H) (Hoyer, 1994).

— INTRODUCTION —

L'expression du gène *F8* conduit initialement à la production d'une chaîne polypeptidique de 2351 acides aminés : un peptide signal, constitué de 19 acides aminés et qui permet la translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique, et la séquence du FVIII, constitué de 2332 acides aminés. Au cours de son trajet dans le système vésiculaire intracellulaire, le FVIII subit successivement plusieurs modifications post-traductionnelles : clivage du peptide signal et N-glycosylations dans le réticulum endoplasmique, O-glycosylations et sulfatations de tyrosines et maturation des N-glycosylations dans l'appareil de Golgi (Kaufman et al., 1988).

Enfin, des clivages protéolytiques au niveau des acides aminés Arg1313 et Arg1648 conduisent à la sécrétion d'un FVIII hétérodimérique. Une fois sécrété dans la circulation sanguine, le FVIII s'associe au facteur de Willebrand (von Willebrand Factor, vWF, (Vlot et al., 1996)). Le vWF est la protéine chaperonne du FVIII qui assure sa stabilité et sa biodisponibilité dans la circulation, le protège d'une éventuelle activation prématurée ou d'une dégradation par les enzymes circulantes et le transporte vers les sites de saignement (Kaufman et al., 1997). Cette association mobilise la chaîne légère, et plus précisément la région acide a3 et le domaine C2. Le complexe FVIII/vWF voyage ainsi dans la circulation sanguine, jusqu'au moment où il est mobilisé lorsqu'une brèche vasculaire se forme.

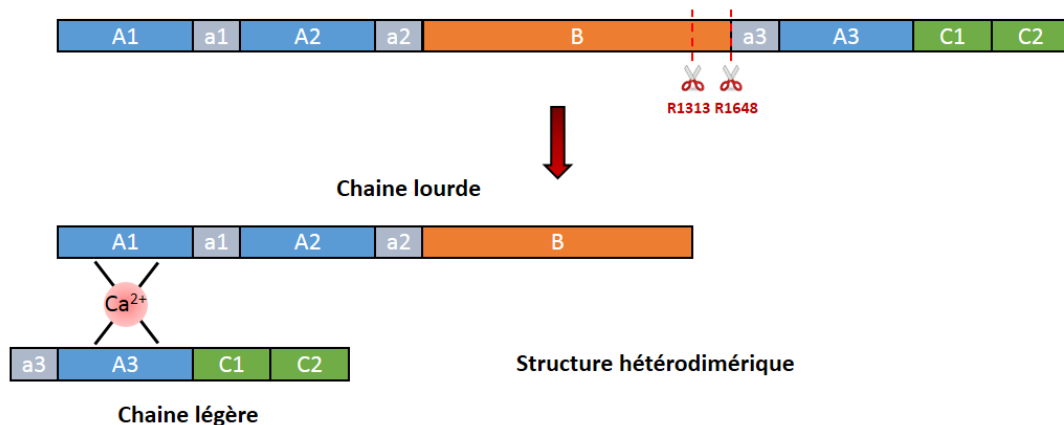


Figure 2. Structure du FVIII. La transcription de l'ARNm codant le FVIII produit une chaîne polypeptidique de 2352 acides aminés qui est adressée au réticulum endoplasmique, à l'intérieur duquel elle perd son peptide signal et contient alors 2332 acides aminés. Une fois dans l'appareil de Golgi, elle 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.

2.3.2. Hémostase

Lorsqu'une brèche vasculaire se forme, des molécules du sous-endothélium sont exposées au contact du sang et déclenchent les premières étapes du processus d'hémostase. La rupture de l'endothélium vasculaire s'accompagne d'une vasoconstriction locale qui réduit le débit sanguin. Ceci a pour conséquence de réduire la perte de sang et de faciliter les interactions entre les molécules nécessaires à l'initiation de l'hémostase.

Hémostase primaire

Suite à la vasoconstriction, les plaquettes circulantes sont recrutées et adhèrent au sous-endothélium exposé (**Figure 3**). Cette adhésion se fait notamment par l'intermédiaire du vWF, qui se fixe aux molécules de collagène exposées par le sous-endothélium et qui est reconnu par des récepteurs plaquettaires. Les plaquettes s'activent alors localement : ceci se manifeste par un changement morphologique, dû à un remaniement du cytosquelette, et par un relargage du contenu des granules sécrétoires présents à l'intérieur des plaquettes. Les médiateurs excrétés recrutent plus de plaquettes, ce qui se traduit progressivement par la formation d'un clou plaquettaire au niveau de la brèche.

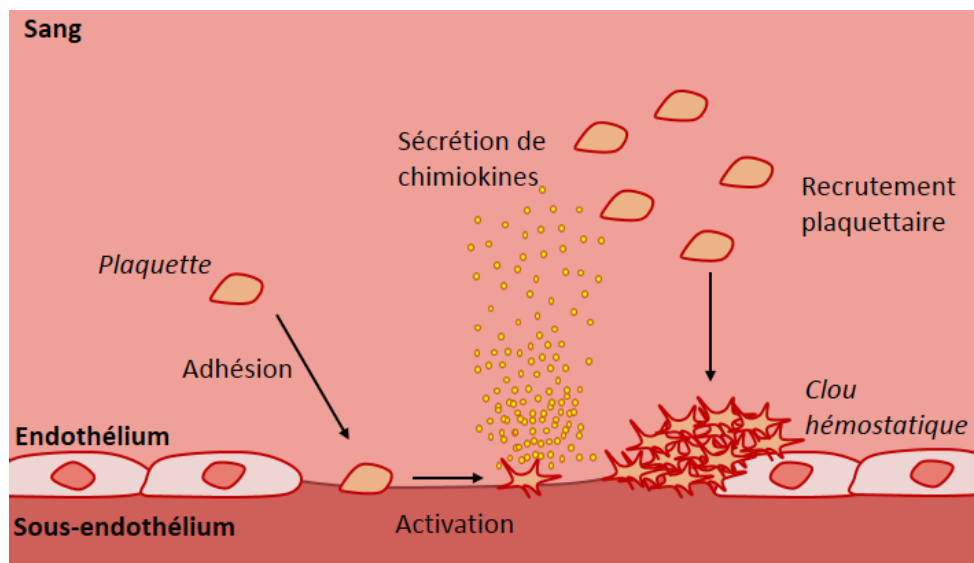


Figure 3. Hémostase primaire. Après fixation au sous-endothélium exposé, les plaquettes s'activent, changent de morphologie et sécrètent des chimiokines. Ces molécules chémo-attractantes vont localement permettre un recrutement de plaquettes, qui s'agrègent pour former un clou hémostatique.

— INTRODUCTION —

Hémostase secondaire

La seconde étape consiste à solidifier ce clou plaquettaire, par activation de la cascade de la coagulation. Une succession de réactions enzymatiques se met en place, dans le but de générer un caillot de fibrine qui consolidera l'agrégat plaquettaire (**Figure 4**). Deux voies d'activation de la coagulation ont été identifiées : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La brèche vasculaire s'accompagne d'une exposition des composants du sous-endothélium, notamment du facteur tissulaire, un facteur pro-coagulant membranaire. Ce dernier déclenche l'activation de la voie extrinsèque. L'exposition du facteur tissulaire au contact du sang active le facteur VII de la coagulation (FVII \Rightarrow FVIIa). Le FVIIa active à son tour le facteur X (FX \Rightarrow FXa), qui s'associe alors au facteur V activé (FVa) dans un complexe appelé prothrombinase. Le complexe prothrombinase active la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Cette thrombine permet la polymérisation de monomères de fibrine et active le facteur XIII (FXIII \Rightarrow FXIIIa) qui va stabiliser le caillot de fibrine.

La voie intrinsèque commence par la liaison du facteur XII de la coagulation à des surfaces chargées négativement, exposées par le sous-endothélium. Cette liaison conduit à l'auto-activation du facteur XII (FXII \Rightarrow FXIIa). Le FXIIa active le facteur XI (FXI \Rightarrow FXIa), qui active à son tour le FIX (FIX \Rightarrow FIXa). Le FIXa s'associe au FVIII activé (FVIIIa) et aux phospholipides exprimés sur les plaquettes pour former le complexe ténase. Ce complexe permet l'activation du FX, ce qui entraîne une augmentation de la génération de thrombine et ainsi une production accrue de fibrine.

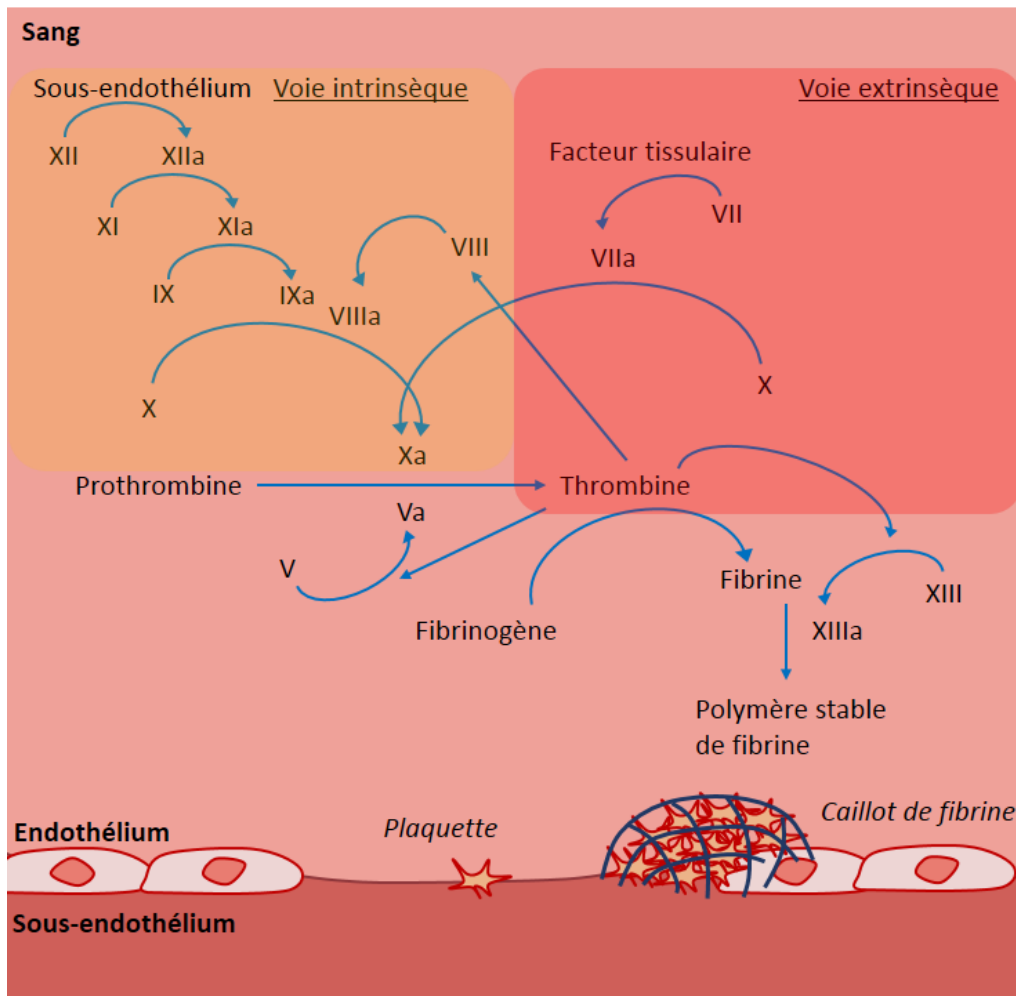


Figure 4. Hémostase secondaire. Suite à l'exposition du sous-endothélium et à l'agrégation des plaquettes, l'hémostase secondaire se déclenche. La voie extrinsèque est déclenchée après l'exposition du facteur tissulaire pro-coagulant depuis le sous-endothélium. Le facteur tissulaire active le FVII en FVIIa. Le FVIIa active à son tour le FX en FXa. Le FXa s'associe au FVa pour former un complexe appelé complexe prothrombinase. Le complexe prothrombinase active la prothrombine en thrombine. La thrombine produite permet l'activation du fibrinogène en fibrine, la polymérisation des monomères de fibrine ainsi que l'activation du FXIII qui permet de stabiliser le caillot de fibrine. La voie intrinsèque s'active après interaction du FXII avec des surfaces chargées négativement du sous-endothélium. Cette liaison conduit à l'auto-activation du FXII. Le FXIIa active alors le FXI qui, une fois activé (FXIa), active à son tour le FIX. Le FIXa généré s'associe au FVIIIa, produit au préalable par la thrombine, et aux phospholipides exposés à la surface des plaquettes pour former le complexe ténase. Ce complexe permet l'activation du FX, ce qui maintient la production de thrombine en aval, initiée par l'activation de la voie extrinsèque, et favorise la génération de fibrine.

2.3.3. Rôle du FVIII dans l'hémostase secondaire

Adressé au site de saignement par l'intermédiaire du vWF, le FVIII est activé localement par la thrombine qui procède à un clivage au niveau de la chaîne lourde (Arg372 et Arg740) et au niveau de la chaîne légère (Arg1689). Ce dernier clivage libère la région a3 de la chaîne légère et permet de dissocier le FVIII du vWF (**Figure 5**). Une fois activé, le FVIIIa change de conformation et sert de cofacteur au FIXa au sein du complexe ténase. En s'associant aux phospholipides exposés à la surface des plaquettes activées ou de l'endothélium endommagé, le complexe ténase catalyse la conversion du FX en FXa. Le FXa participe alors à la formation du complexe prothrombinase, nécessaire à la génération de fibrine.

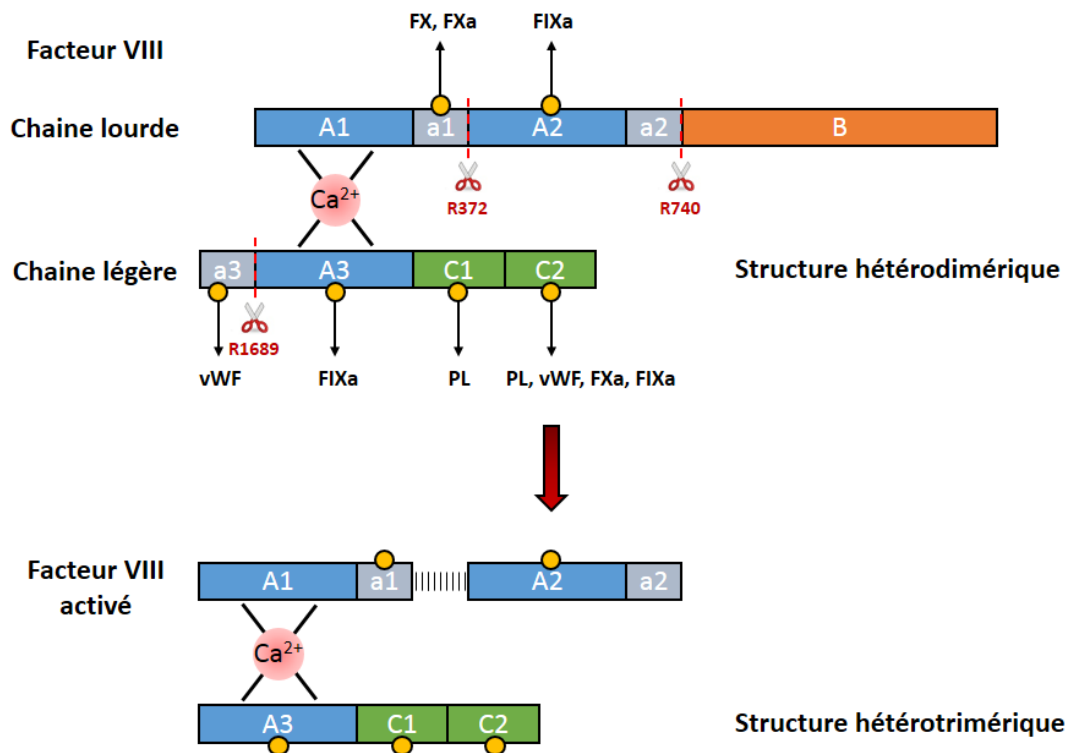


Figure 5. Activation du FVIII. Le FVIII dispose de plusieurs sites pour interagir avec ses partenaires de la coagulation (vWF, FIXa, FX, FXa et phospholipides (PL)), qui persistent après activation de la molécule par la thrombine et permet au FVIIIa de pleinement jouer son rôle de cofacteur. La thrombine active le FVIII par un clivage protéolytique sur la chaîne lourde (Arg372 et Arg740) et sur la chaîne légère (Arg1689). 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 FVIII joue son rôle clef dans les processus d'hémostase grâce aux différents domaines dont il est pourvu (**Figure 6**). Les domaines A contiennent des sites importants pour interagir avec le FX et le FIXa : le segment acide a1 en aval du domaine A1 contient des acides aminés impliqués dans l'interaction avec le FX et le FXa (Nogami et al., 2004) ; le domaine A2 permet

— INTRODUCTION —

d'interagir avec le FIXa via les résidus 558-565 (Fay et al., 1994) ; enfin, le domaine A3 contient également un site de liaison au FIXa (acides aminés 1810-1818) (Bloem et al., 2013).

Le grand domaine B ne présente à ce jour aucun rôle pro-coagulant mis en évidence et son rôle physiologique demeure méconnu.

Enfin, les domaines C du FVIII sont très riches en acides aminés chargés positivement et en acides aminés hydrophobes. Ces résidus sont importants pour la fonction du FVIII (Cooper, 2000). Ainsi, Gilbert et al. ont-ils démontré un rôle majeur pour le domaine C2, grâce à l'existence de protrusions hydrophobiques qui permettent l'ancrage du FVIII aux phospholipides membranaires. Cette pénétration du domaine C2 dans la membrane est nécessaire au rôle de cofacteur du FVIII (Gilbert et al., 2002). Des études récentes ont toutefois souligné l'importance du domaine C1 dans la capacité du FVIII à se lier à la surface des plaquettes (Meems et al., 2009). Le domaine C1 agit en synergie avec le domaine C2 pour permettre la fixation du FVIII aux plaquettes (Hsu et al., 2008; Lü et al., 2011; Meems et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que le domaine C1 était aussi engagé dans des interactions avec le FXa. La coopération des deux domaines C est donc nécessaire au bon fonctionnement du complexe ténase (Lü et al., 2011). Enfin, le domaine C2 dispose également de sites d'interaction avec le vWF, le FXa et le FIXa (Gilbert et al., 2002; Nogami et al., 1999).

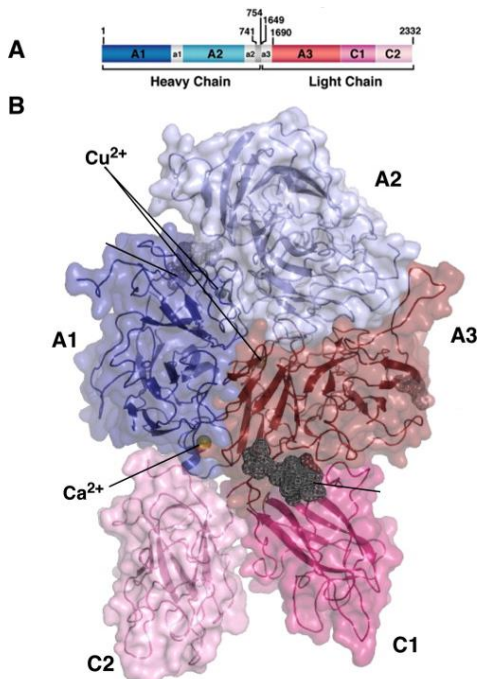


Figure 6. Structure cristallographique du FVIII. (A) Diagramme des domaines du FVIII humain amputé du domaine B. (B) Structure tridimensionnelle du FVIII humain. Le domaine A1 et la région acide a1 sont colorés en bleu foncé. Le domaine A2 et la région acide a2 sont colorés en bleu clair. Ces régions font partie de la chaîne lourde du FVIII. Les domaines A3, C1 et C2 font partie de la chaîne légère et sont colorés en rouge, rose foncé et rose clair respectivement. La région acide a3 n'est pas indiquée sur cette représentation. La structure comprend deux ions Cu²⁺ et un ion Ca²⁺ (D'après (Ngo et al., 2008)).

2.4. Traitements des épisodes hémorragiques et complications associées

2.4.1. Traitements des saignements

Pour soigner ou prévenir les saignements qui surviennent chez les patients hémophiles A, la stratégie thérapeutique la plus courante consiste en l'administration de FVIII exogène thérapeutique par voie intraveineuse. Le traitement vise à restaurer la quantité de FVIII fonctionnel dans la circulation sanguine. Le FVIII peut être administré aux patients soit à la demande soit de manière prophylactique.

Les traitements à la demande font référence aux injections de FVIII lors d'un saignement. La dose appropriée à administrer et la durée du traitement dépendent de l'ampleur du saignement. Ainsi, pour des hémorragies mineures (i.e. hématome précoce, épistaxis), il suffit d'atteindre 40-60% du niveau normal de FVIII pour arrêter le saignement (Paroskie et al., 2015; Peyvandi et al., 2016a). En revanche, pour des hémorragies plus sévères (hématome étendu, saignement gastro-intestinal), les doses administrées sont beaucoup plus fortes (80-100%) et le traitement peut durer plusieurs semaines pour prévenir la survenue de saignements ultérieurs.

Les traitements prophylactiques visent à empêcher les épisodes hémorragiques spontanés et la survenue de complications invalidantes chez les patients hémophiles A sévères. Ils consistent en l'administration de FVIII au moins 2 à 3 fois par semaine pour atteindre un niveau en FVIII circulant de l'ordre de 5% du niveau normal (Carcao and Aledort, 2004). La stratégie repose sur le fait que les hémophiles A modérés (FVIII > 1%) présentent moins de saignements spontanés et d'articulations abimées que les hémophiles A sévères (Fischer et al., 2001).

2.4.2. Produits thérapeutiques

Deux types de FVIII thérapeutiques sont actuellement disponibles sur le marché.

Les FVIII dérivés de plasma (pdFVIII) sont purifiés à partir de mélanges de plasma de donneurs sains. En plus du FVIII, ces concentrés contiennent de nombreuses autres protéines, telles que du vWF ou de la fibronectine, tous deux récupérés avec le FVIII lors du processus de purification (Basilico et al., 2010).

Les FVIII recombinants (rFVIII) sont produits *in vitro* par des lignées cellulaires transfectées de manière stable : ainsi, l'octocog alfa est-il produit à partir de cellules Chinese Hamster Ovary (CHO) ou encore de cellules Baby Hamster Kidney (BHK). Il a aussi été développé une forme recombinante de FVIII dont le domaine B, ne participant pas à la fonction pro-coagulante du FVIII, a été amputé. Cette forme est connue sous le nom de B domain-deleted FVIII (BDD-

FVIII). Enfin, des formes améliorées de BDD-FVIII ont récemment vu le jour. Fusionnés à un fragment Fc (Eloctate®) ou couplés à du polyéthylène glycol (Adynovate™), ces produits disposent d'une plus longue durée de vie que leur homologue natif (Shapiro et al., 2014; Turecek et al., 2012).

2.4.3. Complications du traitement

Jusque dans les années 1990, quand les pdFVIII étaient les seuls FVIII à disposition, l'un des principaux obstacles au succès du traitement au FVIII était la transmission d'agents infectieux tels que le virus de l'hépatite B, de l'hépatite C ou encore celui de l'immunodéficience humaine (Mauser-Bunschoten et al., 2009). Avec l'amélioration des techniques de purification et la mise en place des procédés d'inactivation virale mais aussi avec l'avènement des rFVIII, ce risque a drastiquement diminué.

De nos jours, la principale complication est le déclenchement d'une réponse immunitaire qui se manifeste par la génération d'anticorps dirigés contre le FVIII thérapeutique administré. Certains anticorps, dits inhibiteurs, neutralisent l'activité pro-coagulante du FVIII injecté. Les patients deviennent réfractaires au traitement, qui perd alors son efficacité. Ceci entraîne une dégradation de leur qualité de vie ainsi qu'une complication de leur prise en charge clinique.

Le développement d'anticorps inhibiteurs survient chez près de 30% des patients hémophiles A sévères. Ces anticorps apparaissent généralement après 15-20 jours cumulés d'exposition au FVIII (Gouw et al., 2013a, 2013b; Oldenburg and Pavlova, 2006). Les anticorps inhibiteurs sont également générés chez les hémophiles A mineurs et modérés (Eckhardt et al., 2013), avec une incidence de plus de 13% après 100 jours d'exposition au FVIII.

La réponse immunitaire dirigée contre le FVIII est une réponse immunitaire humorale polyclonale. Elle comprend des anticorps anti-FVIII neutralisants, tout comme des anticorps qui peuvent se lier au FVIII sans pour autant affecter son activité fonctionnelle. Les anticorps neutralisants sont des immunoglobulines de classe G (IgG) de haute affinité, le plus fréquemment de sous-classe IgG4, suivi de la sous-classe IgG1 (Hofbauer et al., 2015; Whelan et al., 2013). Il est à noter qu'il existe aussi des anticorps générés de faible affinité, retrouvés chez les patients sans inhibiteurs ainsi que chez les sujets sains (Algiman et al., 1992; Moreau et al., 2000). Certains anticorps inhibiteurs bloquent l'activité du FVIII en se fixant dessus, créant ainsi un encombrement stérique qui empêche le FVIII d'interagir avec ses partenaires de la cascade de la coagulation. En effet, les principaux épitopes ciblés par les anticorps anti-FVIII se situent dans les domaines A2 de la chaîne lourde et les domaines A3 et C2 de la chaîne légère

(Scandella, 2000), domaines impliqués dans des interactions avec le FIXa, le FX, la thrombine ou encore les phospholipides. L'interaction des anticorps avec le FVIII injecté peut également conduire à la formation de complexes immuns qui accéléreraient l'élimination du FVIII. Enfin, un troisième mécanisme a été décrit: certains inhibiteurs générés ont la capacité d'hydrolyser le FVIII (Lacroix-Desmazes et al., 1999). Ces anticorps, dits catalytiques, ont été retrouvés chez plus de 50% de patients hémophiles A sévères ayant développé une réponse immunitaire (Grosbois et al., 2013; Lacroix-Desmazes et al., 2002, 2006; Wootla et al., 2008).

2.4.4. Traitement/prévention des hémorragies chez les patients avec inhibiteurs

Différentes stratégies thérapeutiques existent pour traiter ou prévenir les épisodes hémorragiques chez les patients malgré la présence d'anticorps inhibiteurs.

Pour quantifier ces inhibiteurs, la méthode utilisée est le test Bethesda et sa variante développée à Nijmegen. Ces tests évaluent la neutralisation de la fonction du FVIII et s'expriment en unités Bethesda (UB) par ml de plasma. Une unité Bethesda correspond à l'inverse de la dilution d'un plasma à laquelle les inhibiteurs qu'il contient neutralisent 50% de l'activité du FVIII présent dans un plasma de donneurs sains. Le seuil de positivité est fixé à 0,6 UB/ml.

Les patients ayant un faible titre en anticorps inhibiteurs (≤ 5 UB/ml) peuvent être traités avec des doses plus importantes et/ou plus fréquentes de FVIII. Le but est de saturer les anticorps circulants et d'apporter assez de FVIII à l'organisme pour maintenir une hémostase correcte. Les patients ayant un titre élevé en inhibiteurs (> 5 UB/ml) ont recours à des stratagèmes thérapeutiques qui court-circuitent le besoin en FVIII. Ces approches induisent une hémostase indépendante du FVIII (voie extrinsèque, **Figure 4**) et comprennent l'utilisation de facteur VII activé (NovosevenTM) ou de concentrés en facteurs prothrombotiques comme le Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity (FEIBA, (von Depka, 2005; Franchini et al., 2013; Turecek et al., 2004)).

Il est possible d'induire une tolérance immunitaire spécifique au FVIII chez les patients hémophiles réfractaires au traitement conventionnel. L'induction de tolérance immunitaire (ITI) consiste en l'administration itérative de faibles ou de fortes doses de FVIII sur de longues périodes (de plusieurs mois à plusieurs années). Elle permet d'éradiquer les inhibiteurs dans 70 à 85% des cas (Di Michele, 1998). Les mécanismes qui sous-tendent l'ITI restent méconnus à ce jour. Certaines études suggèrent que de fortes doses de FVIII induisent l'apoptose des lymphocytes B mémoires murins spécifiques du FVIII (Hausl et al., 2005). Toutefois, la dose la plus faible requise pour inhiber les lymphocytes B spécifiques murins n'est pas atteinte chez

— INTRODUCTION —

l'Homme, même pour un protocole d'ITI à forte dose de FVIII. De plus, ceci ne permet pas d'expliquer le succès des protocoles à faible dose de FVIII. L'ITI est une approche efficace pour restaurer une tolérance au FVIII. Toutefois, le risque d'échec n'est pas négligeable (25-30% des patients traités). Enfin, jusqu'à 30% des patients rendus tolérants au FVIII après ITI développent à nouveau des anticorps inhibiteurs (Antun et al., 2015).

L'apparition de cette réponse immunitaire délétère chez les patients et le recours à des stratagèmes thérapeutiques contraignants et onéreux rendent difficile la prise en charge des patients. Dans les pays occidentaux, le traitement d'un patient avec inhibiteurs peut atteindre 0,2 million d'euros par an (Gringeri et al., 2003; Rocino et al., 2016).

3. Réponse immunitaire dirigée contre le facteur VIII

La réponse immunitaire à l'encontre du FVIII thérapeutique exogène est considérée comme une réponse allogénique thymo-dépendante classique (Dasgupta et al., 2008a; Georgescu et al., 2016).

Après administration par voie intraveineuse, le FVIII thérapeutique circulant est reconnu par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette reconnaissance s'accompagne de la capture de l'antigène et de son apprêtement à l'intérieur des endosomes. Le FVIII est alors clivé en petits peptides qui sont ensuite chargés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Le complexe CMH/peptide est alors exposé à la surface des CPA et est reconnu par le récepteur T (T Cell Receptor, TCR) exprimé sur les lymphocytes T (LT) naïfs spécifiques du FVIII. Après avoir reçu un signal d'activation adéquat, les CPA activent ces LT qui, à leur tour, activent des lymphocytes B (LB) spécifiques. Ces LB se différencient en LB mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'anticorps anti-FVIII (**Figure 7**).

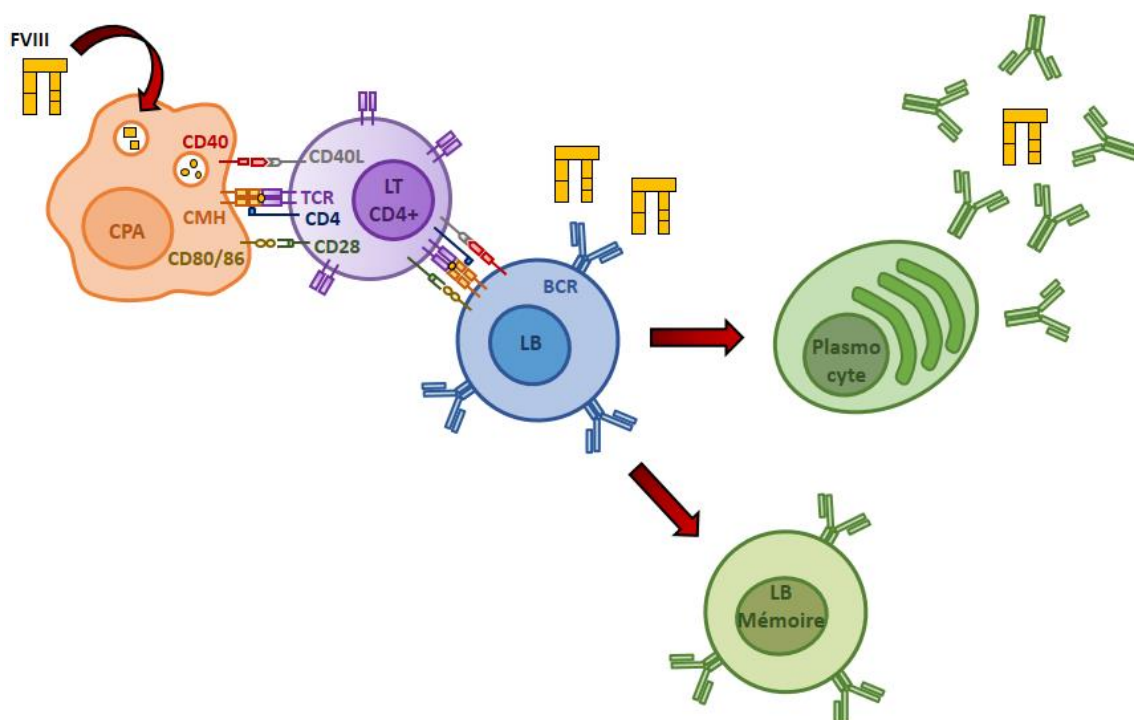


Figure 7. Représentation schématique de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique. La réponse immunitaire contre le FVIII est une réponse humorale classique dirigée contre un antigène étranger. Le FVIII thérapeutique est endocyté par des CPA, qui après protéolyse de l'antigène, présentent des peptides du FVIII associés à des molécules de CMH de classe II à des LT CD4⁺ naïfs spécifiques du FVIII. La reconnaissance du peptide via le TCR du LT et les interactions entre les molécules de costimulation exprimées sur les CPA et les LT (CD40/CD40L, CD80-86/CD28) entraînent l'activation des LT. Ces LT prolifèrent et activent des LB spécifiques du FVIII. Cette activation passe par une interaction entre le TCR des LT et le complexe CMH/peptide des LB ainsi qu'une interaction entre les molécules de costimulation exprimées sur les LB et les LT. Les LB activés prolifèrent et se différencient en LB mémoires ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps inhibiteurs anti-FVIII.

3.1. Interactions entre le facteur VIII et les cellules présentatrices d'antigènes

Les étapes précoces de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII restent méconnues et font l'objet de nombreuses investigations : quelles sont les CPA impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire ? Où est-ce que le FVIII interagit avec le système immunitaire ? Plusieurs explications ont été avancées.

3.1.1. Sites d'interaction potentiels

La rate est un organe lymphoïde secondaire idéal pour l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII. Chargée de filtrer le sang, la rate est un lieu privilégié pour retrouver des antigènes en circulation, dont le FVIII. Elle fournit un microenvironnement immunitaire propice à la mise en place des réponses immunitaires adaptatives. En 2009, une étude *in vivo* a montré l'accumulation de FVIII dans la rate après injection chez des souris (Navarrete et al., 2009). De plus, la splénectomie de ces souris avant administration de FVIII réduisait fortement le taux

— INTRODUCTION —

d'anticorps inhibiteurs générés. Toutefois, l'éradication n'était pas complète, ce qui suggère l'existence d'autres lieux d'interaction.

Le foie est aussi un organe proposé : en effet, le FVIII peut également s'accumuler dans le foie après administration (Navarrete et al., 2009; van Schooten et al., 2008). Le foie présente une importante vascularisation et des études indiquent la présence de CPA à l'intérieur (cellules dendritiques, macrophages) et de LT (Crispe, 2011). Certaines populations cellulaires comme les cellules endothéliales sinusoidales pourraient également présenter des peptides à des LT (Elvevold et al., 2008) mais les études restent controversées à ce sujet. Par ailleurs, le système immunitaire au niveau hépatique est plus prompt à induire de la tolérance immunitaire que des réponses inflammatoires (Racanelli and Rehermann, 2006).

Enfin, les sites de saignement sont également suspectés : les brèches vasculaires engendrent un important microenvironnement inflammatoire capable de recruter et d'activer les cellules du système immunitaire. Il est alors possible que le FVIII soit capturé au niveau du site de saignement par des CPA et transporté vers des organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate).

3.1.2. Cellules présentatrices d'antigènes

La réponse immunitaire se met en place à partir du moment où le FVIII est pris en charge par des CPA telles que les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes B.

Les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles pouvant déclencher des réponses immunitaires primaires en activant des lymphocytes T naïfs. Les cellules dendritiques ont la capacité d'internaliser des antigènes via les différents récepteurs qu'elles expriment à leur surface. Après endocytose de l'antigène, elles deviennent matures et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles peuvent présenter l'antigène et activer des lymphocytes T.

Les macrophages sont des cellules phagocytaires présentant de nombreux récepteurs d'endocytose à leur surface. Leur rôle majeur est d'éliminer les débris cellulaires, les cellules apoptotiques ainsi que les pathogènes (Poon et al., 2014). De nombreuses sous-populations de macrophages existent dans l'organisme. Ainsi dans la rate, retrouve-t-on des macrophages métallophiliques et des macrophages dans la zone marginale splénique qui se sont révélés être impliqués dans la réponse immunitaire anti-FVIII *in vivo* (Navarrete et al., 2009). Non seulement le FVIII co-localise-t-il avec ces macrophages spléniques après avoir été administré *in vivo*, mais leur déplétion a aussi permis de réduire le taux d'anticorps anti-FVIII produits.

Toutefois, les macrophages sont moins puissants que les cellules dendritiques pour stimuler les lymphocytes T et exercent principalement une fonction catabolique.

Enfin les lymphocytes B expriment une immunoglobuline à leur surface (B Cell Receptor, BCR) qui permet de reconnaître et d'endocyter l'antigène pour lequel elle est spécifique. Les lymphocytes B mémoires, avec leur BCR de haute affinité, jouent un rôle prédominant dans les réponses immunitaires secondaires. En réponse immunitaire primaire, le rôle des lymphocytes B reste moins évident (Barnett et al., 2014). Il a toutefois été récemment observé qu'après administration dans un modèle murin d'hémophilie A, le FVIII co-localisait principalement avec les lymphocytes B au détriment des cellules dendritiques et des macrophages dans la rate (Lai et al., 2015), suggérant un potentiel rôle des lymphocytes B dans la capture du FVIII et l'initiation de la réponse immunitaire primaire.

3.1.3. Internalisation du facteur VIII

Pour initier la réponse immunitaire, le FVIII doit être internalisé par une CPA professionnelle. Bien qu'elles fassent l'objet d'intenses recherches, les voies d'endocytose du FVIII restent mal connues. Il est encore difficile de dire sous quelle forme le FVIII est capturé : seul ? Complexé avec le vWF ? Complexé avec des anticorps inhibiteurs ? Malgré tout, plusieurs récepteurs d'internalisation ont été proposés ou identifiés à ce jour (Navarrete et al., 2010).

La famille des Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor fait partie des premiers récepteurs d'endocytose du FVIII à avoir été décrits. Parmi ces derniers, on trouve le Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1, CD91). Ce récepteur est exprimé aussi bien sur les cellules myéloïdes (cellules dendritiques, macrophages, cellules de Kupffer) que tissulaires (hépatocytes, neurones, myocyte lisse vasculaire). L'interaction de LRP1 avec ses ligands induit leur endocytose et leur catabolisme par la voie lysosomale. LRP1 participe ainsi de cette manière à l'homéostasie du cholestérol et de facteurs impliqués dans la fibrinolyse (Neels et al., 1999). LRP1 est également capable d'interagir avec le FVIII. Cette liaison mobilise les domaines A2 sur la chaîne lourde et C2 sur la chaîne légère du FVIII (Lenting et al., 1999; Saenko et al., 1999). *In vitro*, il a été montré que des cellules exprimant LRP1 de manière constitutive ou de manière induite internalisaient et dégradait le FVIII. *In vivo*, il a été montré que LRP1 participait à l'élimination du FVIII : l'inhibition de LRP1 par invalidation génique ou par l'administration de Receptor-Associated Protein (RAP) augmente par 1,5 à 3,3 fois la demi-vie du FVIII circulant (Bovenschen et al., 2003; Lenting et al., 1999; Rastegarlarlari et al., 2012; Saenko et al., 1999). Du point de vue de l'immunogénicité du FVIII, les études suggèrent

— INTRODUCTION —

que le rôle de LRP1 serait nul dans l'endocytose du FVIII par les cellules dendritiques *in vitro* (Dasgupta et al., 2008b; Herczenik et al., 2012a). De manière intéressante, plusieurs études récentes ont mis en lumière une implication de LRP1 dans la mise en place des réponses immunitaires (Pawaria and Binder, 2011; Pawaria et al., 2011). LRP1 est capable de lier des Heat Shock Proteins (HSP), des protéines libérées par les cellules tumorales et utilisées dans un cadre de vaccination anti-tumorale. Cette interaction sur les CPA s'accompagne de leur internalisation et de l'activation de la voie de signalisation Nuclear Factor Kappa B (NF-κB). Il en résulte une maturation des CPA, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant de polariser les réponses immunitaires vers un profil inflammatoire Th1 ou Th17 (Pawaria and Binder, 2011; Redzovic et al., 2015). Il est dès lors possible d'imaginer que l'interaction entre le FVIII et LRP1 puisse contribuer *in vivo* à la production de signaux pro-inflammatoires propices à l'établissement de la réponse immunitaire anti-FVIII.

En 2001, Sarafanov et al. ont montré que l'interaction entre le FVIII et LRP1 nécessitait au préalable une étape de préconcentration à la surface des cellules via des protéoglycanes de la matrice extracellulaire, les Heparan Sulfate ProteoGlycans (HSPG) (Sarafanov et al., 2001). Il a ainsi été montré *in vitro* que les HSPG pouvaient se lier au FVIII par le domaine A2 sur la chaîne légère. Cette liaison aux HSPG permet la fixation du FVIII sur les cellules puis dans un second temps l'interaction avec LRP1 et l'endocytose du FVIII pour son catabolisme. Ainsi, la disparition des HSPG sur ces cellules par traitement à l'héparinase associée à une inhibition de LRP1 par traitement à RAP réduit-elle de manière drastique la quantité de FVIII fixé par rapport à un traitement avec RAP seul. Les HSPG pourraient ainsi, dans le cadre de la réponse immunitaire anti-FVIII, concentrer le FVIII à la surface des CPA avant qu'il ne soit internalisé dans un second temps. *In vivo*, le blocage simultané des HSPG et de LRP1, par administration de protamine et de RAP respectivement, ralentit la dégradation du FVIII et prolonge de 5,5 fois sa demi-vie.

Les modifications post-traductionnelles présentes sur le FVIII peuvent également permettre la reconnaissance par certains récepteurs, notamment ceux de la famille des lectines, parmi lesquels on trouve l'ASialoGlycoProtein Receptor (ASGPR). L'ASGPR est une lectine de type C, fortement exprimée au niveau du foie, qui peut fixer des glycanes dépourvus en acides sialiques, tels que le galactose ou le N-acetyl-galactosamine situés en position terminale des chaînes polysaccharidiques. L'ASGPR est impliqué dans la capture de glycoprotéines circulantes. Bovenschen et al. ont montré en 2005 que l'ASGPR pouvait se lier au FVIII *in vitro*, et que cette liaison sollicitait des régions N-glycosylées du domaine B de la chaîne lourde

— INTRODUCTION —

du FVIII (Bovenschen et al., 2005). L'administration de FVIII et d'asialo-orosomucoïde, antagoniste de haute affinité de l'ASGPR, a allongé de 1,6 fois le temps de biodisponibilité du FVIII en circulation. Malgré l'expression d'ASGPR à la surface de CPA telles que les cellules dendritiques immatures et les macrophages (Ozaki et al., 1995; Valladeau et al., 2001), aucune étude adressant le rôle potentiel d'ASGPR dans la réponse immunitaire anti-FVIII n'a été réalisée à ce jour. Cela serait d'autant plus intéressant que de nombreuses lectines de type C telles que DC-SIGN, DEC205 ou Dectin 1 sont impliquées dans la capture d'antigène, la présentation antigénique ainsi que la polarisation des réponses immunitaires thymo-dépendantes (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

La majorité des chaînes polysaccharidiques arborées par le FVIII se terminent par des acides sialiques. Ceci fait du FVIII un ligand potentiel pour une sous-catégorie de récepteurs de la famille des lectines, les Sialic-acid binding ImmunoGlobulin-like LECTins (Siglecs). Les Siglecs sont exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques myéloïdes comme lymphoïdes (monocytes, cellules dendritiques, macrophages, granulocytes, lymphocytes, (Varki and Angata, 2006)). En 2012, Pegon et al. ont montré que Siglec-5 pouvait interagir avec le FVIII (Pegon et al., 2012). Siglec-5 est exprimé sur les cellules myéloïdes et lymphoïdes présentes dans la rate et les organes lymphoïdes secondaires, ainsi qu'au niveau du foie (Connolly et al., 2002; Crocker and Varki, 2001). Le FVIII est capable de se lier à Siglec-5 *in vitro* et cette interaction est également observable à la surface des monocytes. En utilisant des lignées cellulaires exprimant Siglec-5, il a été montré que le FVIII pouvait être internalisé et retrouvé dans des endosomes précoces. *In vivo*, seule une approche sur la biodisponibilité du FVIII a été réalisée, avec une diminution de la demi-vie chez des souris transfectées avec Siglec-5. Des études approfondies sur l'implication potentielle de Siglec-5 dans l'immunogénicité du FVIII seraient nécessaires, d'autant plus qu'il a été montré que Siglec-5 avait un potentiel immunorépresseur sur les cellules de l'immunité innée (Angata et al., 2006; Avril et al., 2005; Macauley et al., 2014). Les Siglecs représentent un terrain d'étude intéressant : il a ainsi été montré dans un modèle murin d'hémophilie A que l'engagement du BCR avec Siglec-2 entraînait une apoptose des lymphocytes B autoréactifs et l'éradication de la réponse anticorps anti-FVIII (Macauley et al., 2013).

Le FVIII arbore également des N-glycanes se terminant par des mannoses, non sialylés. Ils sont connectés aux asparagines en position 239 et 2118 sur la chaîne lourde et la chaîne légère respectivement. Ces résidus peuvent interagir avec des lectines exprimées sur les CPA, notamment avec le Mannose Macrophage Receptor (MMR, CD206). En 2007, Dasgupta et al.

— INTRODUCTION —

ont ainsi démontré *in vitro* que ces résidus jouaient un rôle majeur dans la capture du FVIII par les CPA. L'inhibition des récepteurs sensibles au mannose en utilisant du mannane réduisait de moitié l'internalisation du FVIII par des cellules dendritiques et sa présentation antigénique à des lymphocytes T (Dasgupta et al., 2007a). De même, le blocage spécifique de CD206 sur les cellules dendritiques diminuait l'endocytose et la présentation antigénique du FVIII *in vitro*. L'implication du CD206 reste toutefois controversée (Herczenik et al., 2012a, 2012b; Repessé et al., 2012) : Herczenik et al. ont montré que l'interférence par ARN du gène codant le CD206 dans des cellules dendritiques *in vitro* n'a pas altéré la capacité de ces dernières à internaliser le FVIII. De plus, l'activation des lymphocytes T par des cellules dendritiques pré-incubées avec du FVIII et du mannane n'a pas été réduite. Au vu de ces résultats, le rôle du CD206 reste donc à éclaircir.

De manière intéressante, la présence d'anticorps naturels dirigés contre le FVIII chez des individus sains (Algiman et al., 1992) peut suggérer l'implication des récepteurs Fc dans l'endocytose du FVIII, qui se trouve complexé à ces anticorps après administration chez les patients.

La plupart des récepteurs présentés ici sont fortement impliqués dans le catabolisme du FVIII et rarement dans l'endocytose du FVIII conditionnant son immunogénicité. Toutefois, il n'est pas à exclure une plasticité des voies d'endocytose, en fonction des signaux du microenvironnement ou du type cellulaire, avec pour conséquence une déviation vers de la présentation antigénique.

Si le mécanisme exact par lequel le FVIII est internalisé par les CPA demeure inconnu à ce jour, des informations sont disponibles quant aux régions du FVIII importantes pour son internalisation. Ainsi, bloquer le domaine C1 du FVIII à l'aide d'un anticorps monoclonal (Km33) empêche son endocytose par des cellules dendritiques *in vitro* (Herczenik et al., 2012a). Ces résultats sont corrélés *in vivo*: l'administration de Km33 dans un modèle murin d'hémophilie A ralentit la mise en place de la réponse anticorps anti-FVIII. Des expériences de mutagenèse dirigée sur l'épitope ciblé par Km33 dans le domaine C1 ont permis d'identifier trois acides aminés importants pour la reconnaissance du FVIII par les CPA : l'arginine en position 2090 (Arg2090), la lysine en position 2092 (Lys2092) et la phénylalanine en position 2093 (Phe2093) (Wroblewska et al., 2012). La mutation de ces résidus basiques et hydrophobe abroge l'endocytose du FVIII par les CPA *in vitro* et confère un caractère protecteur *in vivo* : l'administration d'un FVIII muté en ces positions chez des souris hémophiles réduit

— INTRODUCTION —

drastiquement le taux d'anticorps inhibiteurs produits, la quantité de plasmocytes et de lymphocytes T spécifiques du FVIII spléniques générés. Le domaine C1, fortement impliqué dans les interactions avec les surfaces membranaires, joue donc un rôle important dans la capture du FVIII par les CPA.

L'un des aspects de cette thèse vise à approfondir l'implication de la structure du FVIII dans sa prise en charge par les CPA.

Une fois internalisé par les CPA, le FVIII est catabolisé à l'intérieur des endosomes. Il est clivé en petits peptides qui sont ensuite associés à des molécules du CMH de classe II. Ces complexes CMH/peptide sont alors exposés à la surface des CPA (**Figure 8**).

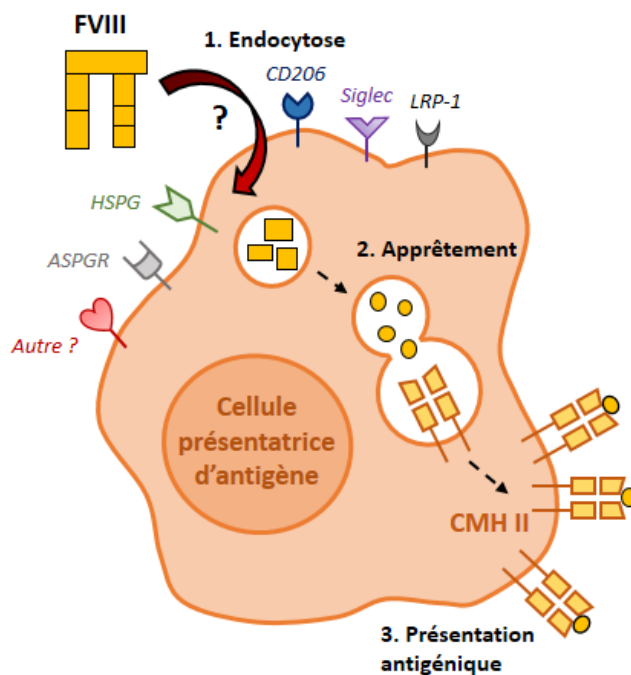


Figure 8. Endocytose et présentation antigénique du FVIII. Le FVIII est endocyté via des récepteurs présents à la surface des CPA, parmi lesquels on retrouve le CD206, les Siglecs, LRP-1, les HSPG ou l'ASPGR. Après son internalisation, le FVIII est apprêté et des peptides dérivés sont chargés sur des molécules de CMH de classe II. Les complexes CMH/peptide sont alors adressés à la membrane.

3.2. Maturation des cellules présentatrices d'antigènes

Pour que les étapes ultérieures de la réponse immunitaire anti-FVIII aient lieu, les CPA doivent également avoir perçu le FVIII dans un contexte de danger. Le concept du « signal de danger » nous vient de Polly Matzinger : les CPA ne s'activent et ne deviennent matures que si elles reçoivent des signaux d'alarme (Matzinger, 2002). Ces signaux se matérialisent sous la forme de structures moléculaires présentes chez les organismes pathogènes (acides nucléiques, carbohydrates) ou encore de molécules libérées par des cellules endommagées (protéines de choc thermique – HSP, adénosine triphosphate).

Le système immunitaire déciderait ainsi d'initier la réponse immunitaire anti-FVIII selon les signaux de danger présents dans le microenvironnement. Les signaux de danger susceptibles de

— INTRODUCTION —

participer à la réponse immunitaire anti-FVIII font l'objet d'études. Pfistershammer et al. ont ainsi montré que ni le FVIII seul, ni le FVIII activé, ni le FVIII associé au vWF n'induisaient la maturation de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MO-DCs) *in vitro* (Pfistershammer et al., 2006).

Les CPA, grâce à des récepteurs à leur surface, détectent certains signaux de danger et se mettent à exprimer ou surexprimer des marqueurs moléculaires, parmi lesquels on retrouve CD80, CD86 et CD40. Ces molécules participent à la formation de synapses immunologiques avec les lymphocytes T. Leur présence à la surface des CPA est essentielle au développement de la réponse anti-FVIII : il a ainsi été montré dans un modèle murin d'hémophilie A que l'absence ou le blocage de CD86 empêchait la survenue d'inhibiteurs (Qian et al., 2000). De même, l'inhibition *in vivo* de la fonction de CD40 bloque de manière transitoire la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII (Reipert et al., 2001; Rossi et al., 2001).

3.3. Activation des lymphocytes T

La réponse immunitaire dirigée contre le FVIII est un processus thymo-dépendant, requérant l'intervention de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du FVIII. Ceci a été constaté pour la première fois quand des patients hémophiles avec inhibiteurs ayant contracté le virus de l'immunodéficience humaine ont vu leur taux d'anticorps inhibiteurs chuter, en parallèle de la réduction du taux des lymphocytes T CD4⁺ circulants (Bray et al., 1993; Ragni et al., 1989). Les anticorps inhibiteurs sont de manière prédominante des IgG4 et les lymphocytes B présentent des hypermutations somatiques au niveau des régions variables des anticorps anti-FVIII (van den Brink et al., 2000; Jacquemin et al., 1998), ce qui renforce l'implication des lymphocytes T puisque la commutation isotypique des immunoglobulines et la maturation d'affinité sont des processus thymo-dépendants (Hofbauer et al., 2015; Whelan et al., 2013).

Les CPA ayant internalisé le FVIII exposent à leur surface des complexes CMH/peptide du FVIII. Pour peu qu'elles aient rencontré un environnement immunogène/inflammatoire, ces CPA présentent un phénotype mature. Elles sont capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺ naïfs dotés d'un TCR spécifique du FVIII via une interaction TCR – CMH/peptide. L'interaction entre le TCR et le CMH/peptide constitue un premier signal à l'activation des lymphocytes T (**Figure 9**).

Les molécules de costimulation exprimées à la surface des CPA suite à leur maturation vont apporter un deuxième signal, dit de costimulation. Ainsi, CD80 et CD86 exprimées sur les CPA interagissent avec CD28 exprimé sur les lymphocytes T. De même, CD40 sur les CPA interagit

— INTRODUCTION —

avec CD40L sur les lymphocytes T. La formation de cette synapse apporte aux lymphocytes T le deuxième signal nécessaire à leur activation complète.

Pour terminer l'activation des lymphocytes T, un troisième signal est nécessaire. Le dialogue entre CPA et lymphocytes T est bidirectionnel. Il induit la production de nombreuses cytokines par les CPA qui vont agir sur les lymphocytes T et participer à leur polarisation en lymphocytes T helpers Th1, Th2, Th17 ou T régulateurs (Tregs). Les sous-populations Th1, Th2 et Th17 ont été particulièrement retrouvées chez les patients avec inhibiteurs, avec une prédominance progressive dans le temps des lymphocytes Th2. A l'inverse, les patients sans inhibiteurs présentent plutôt des lymphocytes à profil Th1 (Ettinger et al., 2009; Reding et al., 2002).

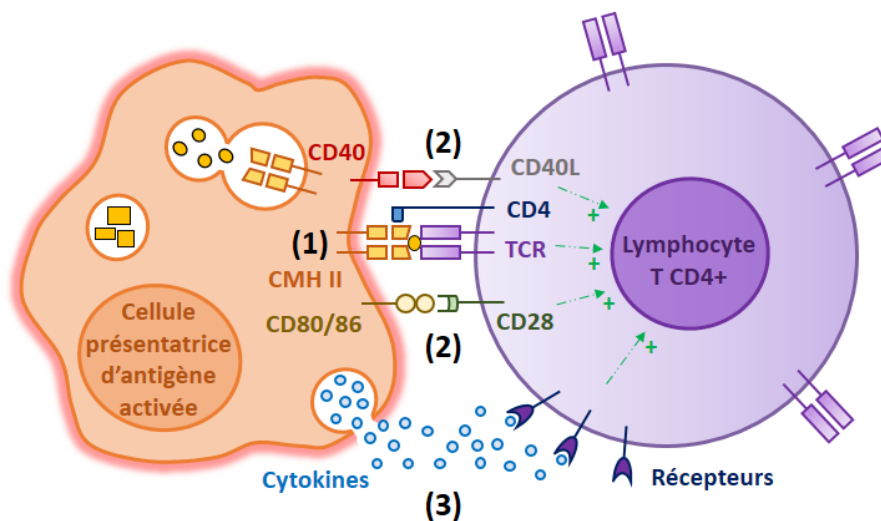


Figure 9. Activation des lymphocytes T CD4⁺ par les CPA. Le complexe CMH/peptide exprimé à la surface d'une CPA est reconnu par le TCR d'un LT CD4⁺ spécifique du FVIII et génère un premier signal d'activation au LT (1). La présence d'un signal de danger dans le microenvironnement active la CPA et conduit à l'expression de marqueurs de costimulation à la surface de la CPA tels que CD80/86 et CD40. Ces marqueurs interagissent respectivement avec le CD28 et le CD40L exprimés sur le LT et envoient un deuxième signal d'activation au LT (2). Enfin, un troisième et dernier signal conclut l'activation du LT et se manifeste par la sécrétion par la CPA de cytokines qui vont être reconnues par des récepteurs exprimés sur le LT (3).

3.4. Activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B peuvent également reconnaître de manière spécifique le FVIII via leur BCR (**Figure 10**). Après reconnaissance, le FVIII est internalisé, clivé en peptides qui sont ensuite présentés à la surface, associés à des molécules de CMH de classe II.

— INTRODUCTION —

Ces lymphocytes B sont capables d'interagir avec les lymphocytes T activés via une interaction entre le CMH/peptide des lymphocytes B et le TCR des lymphocytes T CD4⁺. Cette liaison s'accompagne d'une interaction entre le CD40, le CD80 et le CD86 sur les lymphocytes B avec le CD40L et le CD28 exprimés sur les lymphocytes T respectivement, ce qui permet de compléter l'activation des lymphocytes B.

Les lymphocytes B activés se différencient alors en lymphocytes B mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Les plasmocytes se nichent alors dans la moelle osseuse où ils produisent des anticorps spécifiques du FVIII, de type IgG4 principalement. Ces anticorps ciblent en particulier les domaines A2, A3 et C2 du FVIII (Scandella, 2000).

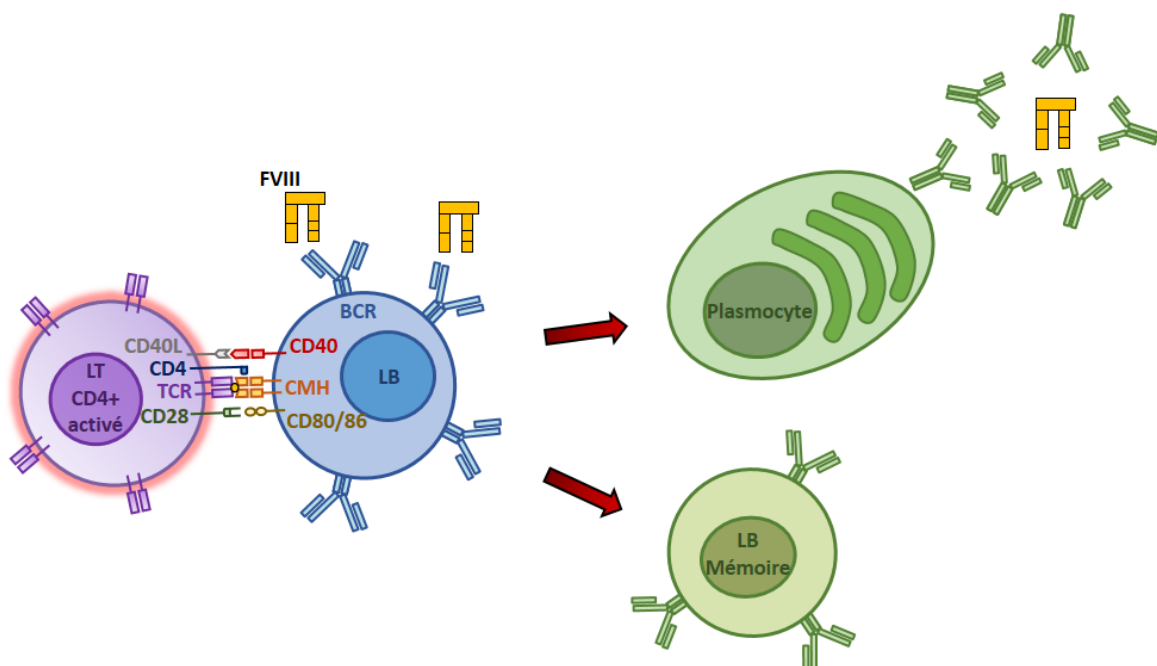


Figure 10. Activation des lymphocytes B. Après internalisation du FVIII par leur BCR, les LB apprêtent et présentent des peptides dérivés du FVIII, chargés sur des molécules du CMH de classe II. La reconnaissance du complexe CMH/peptide par un LT spécifique activé conduit à la maturation et à la différenciation du LB en LB mémoires ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps anti-FVIII.

3.5. Facteurs de risque associés à la survenue d'inhibiteurs

La génération des anticorps inhibiteurs est intrigante, d'autant plus que le FVIII est administré en faible quantité, par voie intraveineuse, une voie peu immunogène, et en l'absence de tout adjuvant. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés ou avancés pour expliquer que cette réponse immunitaire n'apparaissait seulement que chez 30% de la population traitée au maximum.

3.5.1. Nature des produits thérapeutiques administrés

Les différences de composition des FVIII utilisés en thérapie ont été étudiées pour déterminer leur potentielle implication dans la survenue d'anticorps inhibiteurs. En plus de contenir du FVIII, les produits thérapeutiques peuvent contenir des protéines parasites, notamment du vWF dans les FVIII d'origine plasmatique (Basilico et al., 2010). Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer quel FVIII, recombinant ou plasmatique, favorisait l'incidence des anticorps inhibiteurs chez les patients. Goudemand et al. ont ainsi montré en 2006 que l'administration de pdFVIII générait moins d'anticorps inhibiteurs que celle de rFVIII (Goudemand et al., 2006). Ce résultat a été conforté dans des études ultérieures (Collins et al., 2014; Iorio et al., 2010) : récemment, Peyvandi et al. ont observé que les rFVIII présentaient 87% plus de risques d'induire des inhibiteurs que les pdFVIII (Peyvandi et al., 2016b). Ces résultats sont également supportés par des études *in vivo* et *in vitro* qui démontrent un rôle protecteur du vWF dans l'immunogénicité du FVIII (Dasgupta et al., 2007b; Delignat et al., 2012; Kaveri et al., 2007; Sorvillo et al., 2016).

Toutefois, les résultats sont sujets à controverse : des études rétrospectives menées en parallèle n'ont montré aucune différence significative d'incidence d'inhibiteurs entre les patients traités aux pdFVIII et aux rFVIII (Fischer et al., 2015; Franchini et al., 2012; Gouw et al., 2013a). L'hétérogénéité des protocoles appliqués, le nombre limité de patients recrutés et la multitude des approches statistiques utilisées sont autant de facteurs qui ne facilitent pas l'association entre nature de FVIII et survenue d'inhibiteurs.

3.5.2. Facteurs de risque génétiques

Le degré de sévérité de l'hémophilie A est un facteur de risque majeur pour l'apparition des inhibiteurs. Ainsi, les hémophiles A sévères ont-ils une plus forte tendance à développer des inhibiteurs que les hémophiles A modérés ou mineurs (Gouw et al., 2011; Hay, 1998). Par ailleurs, l'incidence des anticorps inhibiteurs chez un patient est aussi corrélée à l'existence, au sein de sa famille, de proches hémophiles présentant des inhibiteurs : le risque d'être réfractaire au traitement est 4 fois plus important quand des membres de sa famille le sont au préalable (Astermark, 2006; Astermark et al., 2001).

La variété des anomalies génétiques a des conséquences multiples sur la production du FVIII et sur sa structure. Ainsi, les mutations qui permettent la mise en circulation d'un FVIII non fonctionnel sont-elles moins associées à l'apparition d'inhibiteurs que celles qui empêchent la synthèse du FVIII. Les larges délétions, les mutations non-sens et l'inversion de l'intron 22

— INTRODUCTION —

générent un FVIII profondément modifié dans sa structure voire pas de FVIII du tout et sont fortement associées à une réponse immunitaire anti-FVIII. A l'inverse, les mutations faux-sens sont en général faiblement associées à la survenue d'inhibiteurs.

Ces anomalies génétiques conditionnent la manière dont le système immunitaire des patients perçoit le FVIII. Chez les hémophiles A sévères qui ne produisent pas de FVIII endogène, il n'y a pas d'éducation thymique au FVIII des lymphocytes T CD4⁺ dans le thymus. Les lymphocytes T spécifiques du FVIII ne sont pas éliminés lors de la sélection négative et il y n'a pas de génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques.

La sévérité de la maladie n'explique pas complètement la survenue de la réponse immunitaire puisque les patients n'ayant pas de FVIII circulant ne développent pas tous des inhibiteurs. Ainsi, les hémophiles présentant une inversion de l'intron 22 n'ont pas de FVIII circulant et ne sont que 25% à développer des anticorps. En 2013, Pandey et al. ont montré que le FVIII pouvait être exprimé à l'intérieur des cellules mononuclées du sang périphérique de ces même patients, comme de donneurs sains (Pandey et al., 2013). Bien que des études ultérieures ont démontré que le FVIII était synthétisé par les cellules endothéliales (Everett et al., 2014; Fahs et al., 2014; Shahani et al., 2014), une expression à bas bruit du FVIII par d'autres populations cellulaires n'est pas à exclure. Dans ce sens, il est intéressant de noter que de faibles quantités d'ARNm codant le FVIII ont été retrouvées dans les cellules endothéliales thymiques médullaires (mTEC) chez la souris (St-Pierre et al., 2013). Ceci soulève la possibilité que le FVIII puisse être produit par les mTEC chez les hémophiles présentant une inversion de l'intron 22 et participer à l'ontogénie des lymphocytes T. Mais au vu de l'incidence des inhibiteurs chez ces patients, cet hypothétique mécanisme ne serait pas suffisant pour rendre tolérant au FVIII.

Le risque de développer des anticorps inhibiteurs a aussi été associé à certains haplotypes du CMH. Ainsi, les allèles de classe II HLA-DRB1*15:01, DQB1*06:02, DQA1*01:02, DRB1*01:01 et DQB1*05:01 sont-ils fréquemment retrouvés parmi les hémophiles A sévères présentant des inhibiteurs (Hay et al., 1997; Oldenburg et al., 1997; Pavlova et al., 2009; Pergantou et al., 2013). Toutefois, les associations déterminées sont parfois faibles et reposent sur des cohortes d'hémophiles de faible effectif. Il est donc nécessaire de confirmer ces résultats à très grande échelle pour clarifier l'importance des haplotypes dans la survenue d'inhibiteurs.

D'autres facteurs de risque incluent des polymorphismes dans les promoteurs de gènes immuno-modulateurs : ainsi, les hémophiles ayant le polymorphisme Gly308Ala sur le promoteur du gène codant le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) ont-ils 72,7% plus de risque de

développer des anticorps anti-FVIII que ceux qui ne le portent pas (Astermark et al., 2006a). De même, des polymorphismes affectant les gènes de l'interleukine-10 (IL-10), du Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) (Astermark et al., 2006b, 2007) et celui de l'Hème Oxygénase-1 (HO-1) (Repressé et al., 2013) ont été décrits. Plus récemment, un polymorphisme sur le gène du Fc gamma Receptor IIa (FcγRIIa) a été associé à une incidence d'inhibiteurs plus importante chez les hémophiles sévères (Eckhardt et al., 2014).

Enfin, l'origine ethnique des patients a également été incriminée dans la survenue d'inhibiteurs : la prévalence des anticorps inhibiteurs chez les patients d'origine africaine ou hispanique est deux fois plus importante que parmi les sujets caucasiens (Aledort and Dimichele, 1998; Astermark et al., 2001; Carpenter et al., 2012).

3.5.3. Facteurs de risque environnementaux

Le fait que des paramètres non génétiques puissent influencer la prédisposition à développer des inhibiteurs est suggéré par l'observation que des jumeaux hémophiles monozygotes ne répondent pas forcément de la même manière au FVIII : certains produisent des anticorps anti-FVIII alors que d'autres non (Astermark et al., 2001).

Parmi les facteurs environnementaux potentiels, l'âge du patient au moment de la première injection de FVIII a été proposé. L'incidence de la réponse immunitaire anti-FVIII est trois fois plus importante lorsque les patients sont traités avant l'âge de 6 mois qu'après l'âge de 12 mois. Plus les patients sont traités jeunes, plus le risque de développer des inhibiteurs est élevé (van der Bom et al., 2003; Lorenzo et al., 2001). Ces résultats n'ont toutefois pas été confirmés dans des études avec des cohortes plus importantes (Chalmers et al., 2007; Santagostino et al., 2005).

Les patients étant traités de différentes manières, la question s'est posée de savoir si la fréquence du traitement pouvait également constituer un facteur de risque. L'étude RODIN menée en 2013 a ainsi montré un risque plus important de développer des inhibiteurs après un traitement à forte dose de FVIII chez des hémophiles sévères par rapport à un traitement à faible dose (Gouw et al., 2013b). D'autre part, le traitement prophylactique en FVIII a été associé à un risque plus faible que les traitements à la demande requérant des doses élevées de FVIII, mais seulement après 20 jours d'exposition au FVIII.

Le statut inflammatoire du patient au moment de l'injection du FVIII a aussi été incriminé dans l'émergence d'anticorps inhibiteurs. Tout événement prompt à activer l'inflammation chez les patients (opération chirurgicale, infection, vaccination) et concomitant à l'injection de FVIII

— INTRODUCTION —

est susceptible de créer un terrain favorable à l'activation du système immunitaire et à la reconnaissance du FVIII comme molécule étrangère. Ainsi, a-t-il été observé que certains hémophiles ont développé une réponse immunitaire anti-FVIII après une opération chirurgicale (Sharathkumar et al., 2003). Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés dans une étude ultérieure (Santagostino et al., 2005), dans laquelle aucune association significative n'a été déterminée entre le statut inflammatoire des patients et le risque de développer des inhibiteurs. D'autre part, des études récentes ont montré que la situation inverse pouvait se mettre en place : Lai et al. ont montré que la vaccination de souris hémophiles contre le virus de la grippe a au contraire diminué l'incidence de la réponse immunitaire anti-FVIII générée après des injections ultérieures répétées de FVIII (Lai et al., 2016). Enfin, la mise en place d'un événement inflammatoire aigu local peut potentialiser la réponse immunitaire anti-FVIII : alors que Peyron et al. ont observé que l'induction chez des souris hémophiles de saignements aigus au niveau des articulations n'exacerbait pas la réponse immunitaire anti-FVIII (Peyron et al., 2015), la même procédure chez des rats hémophiles s'accompagne d'une augmentation de l'immunogénicité du FVIII administré (Lövgren et al., 2016).

Enfin, les événements qui se déroulent *in vivo* après l'administration de FVIII font également l'objet d'études : ainsi, Skupsky et al. proposent un rôle de la fonction du FVIII pour son immunogénicité. L'injection de FVIII s'accompagnerait d'une activation importante du FX dans le microenvironnement, ce qui se traduirait par une production élevée de thrombine (Skupsky et al., 2009). Cette « explosion » de thrombine apporterait des signaux de danger et induirait la maturation des CPA, nécessaire à l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII. Cependant, cette hypothèse a été invalidée par des études ultérieures qui montraient qu'un FVIII non activable avait le même potentiel immunogène qu'un FVIII sauvage (Gangadharan et al., 2014; Meeks et al., 2012). Toutefois, le microenvironnement rencontré par le FVIII semble être une piste intéressante à creuser pour mieux comprendre la mise en place de cette réponse immunitaire délétère.

L'un des aspects de cette thèse vise à approfondir le potentiel rôle de certains composants plasmatiques avec lesquels le FVIII peut entrer en contact une fois administré pour expliquer son immunogénicité. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux interactions entre le FVIII et le système du complément.

4. Le système du complément

4.1 – Présentation

Le système du complément est un ensemble d'une trentaine de protéines plasmatiques qui assure une des premières lignes de défense de l'organisme face aux agents pathogènes. Composante majeure de l'immunité innée, son intervention vise à éliminer les corps étrangers par opsonisation ou cytolysse ainsi qu'à mettre en place un microenvironnement inflammatoire pour assister l'action des cellules du système immunitaire dans la résolution d'une infection.

Le complément s'organise sous la forme d'un ensemble de protéines s'activant en cascade (**Figure 11**), regroupées sous trois voies d'activation distinctes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne, les trois menant à la fin à une voie terminale commune, caractérisée par la formation de la C3 convertase (Merle et al., 2015; Walport, 2001).

Voie classique du complément

La voie classique est initiée par la liaison du composant C1q à ses ligands.

Le C1q est une protéine sécrétée par plusieurs populations myéloïdes (cellules dendritiques, monocytes, macrophages) dont la structure est décrite comme un « bouquet de tulipes » : six têtes globulaires associées à un domaine dont la conformation est similaire à celle du collagène. Le C1q reconnaît de nombreux ligands parmi lesquels on retrouve les IgG (à l'exclusion des IgG4) et les immunoglobulines de classe M (IgM) lorsqu'elles sont associées dans des complexes immuns, les pentraxines telles que le lipopolysaccharide (LPS), la protéine C réactive (Kishore and Reid, 2000; Roumenina et al., 2008), mais aussi des molécules exposées à la surface des cellules mourantes comme la phosphatidylserine, les annexines A2 et A5 ou encore la calréticuline (Martin et al., 2012; Païdassi et al., 2008, 2011). Le C1q est associé par des interactions calcium-dépendantes à des sérine-protéases : C1r et C1s. L'ensemble forme le complexe plasmatique C1qC1r₂C1s₂, appelé complexe C1.

La reconnaissance du ligand par le C1q via ses domaines globulaires engendre un changement de conformation qui conduit, au sein du complexe C1, à l'auto-activation de l'estérase C1r et à l'activation de l'estérase C1s par C1r (Wallis et al., 2010). Ces événements n'auront lieu que si plusieurs têtes du C1q reconnaissent chacune un ligand. Ce dernier doit donc être exposé avec une certaine densité pour pouvoir activer la voie classique.

Sous sa forme active, le complexe C1 peut activer via ses estérases C1s les composants plasmatiques C4 et C2. Le clivage de ces molécules conduit à la génération des fragments C4b

— INTRODUCTION —

et C2a. Ces derniers peuvent s'associer à proximité du complexe C1 pour former un complexe enzymatique C4b2a, appelé C3 convertase. La C3 convertase permet le clivage du composant central du complément C3 et le déclenchement de la voie terminale commune.

Voie des lectines

La voie des lectines débute par la reconnaissance de groupements carbohydrates par le Mannose-Binding Lectin (MBL) principalement, les ficolines ou encore les collectines (Kjaer et al., 2013; Matsushita et al., 1996). Le MBL est une molécule de la famille des collectines dont la structure évoque celle du C1q. Le MBL est capable de se fixer à certains sucres tels que le glucose, le mannose, ou encore le N-acetyl-glucosamine, qui sont plus fréquemment exprimés à la surface des agents pathogènes que sur nos propres cellules.

Les protéines de reconnaissance de la voie des lectines sont associées à des estérases similaires au C1r et au C1s : il s'agit de MBL-Associated Serine Protease-1 (MASP-1) et de MBL-Associated Serine Protease-2 (MASP-2) respectivement (Teillet et al., 2005; Thiel et al., 1997). Après fixation du ligand, MASP-1 peut activer MASP-2. Chacune des MASP peut cliver le composant C2 alors que MASP-2 peut également cliver le composant C4 (Wallis et al., 2010). A l'instar du complexe C1, l'activation du MBL et des MASP associées conduit à la formation de la C3 convertase C4b2a.

Voie terminale commune

Les deux voies d'activation du complément conduisent à l'activation du composant C3. Le clivage de cette molécule bio-inactive libère un fragment en phase fluide, appelé C3a, anaphylatoxine pro-inflammatoire, et un fragment capable de se fixer de manière covalente à la surface des cellules cibles, appelé C3b, opsonine majeure du système du complément. Le C3b se fixe au voisinage des C3 convertases mais peut également s'associer à celles-ci pour former un nouveau complexe enzymatique C4b2a(C3b) ayant une activité C5 convertase.

A la manière de la C3 convertase, la C5 convertase clive le composant C5 et libère un fragment en phase fluide appelé C5a, puissante anaphylatoxine pro-inflammatoire, et un fragment C5b. Ce fragment peut s'associer aux composants C6, C7, C8 et plusieurs molécules de C9 pour former le complexe d'attaque membranaire (C5b-9, Membrane Attack Complex, MAC). Le MAC s'insère dans la membrane des cellules cibles via le composant C8 et l'ensemble forme des pores transmembranaires capables de détruire les cellules cibles par influx d'ions calcique ou par lyse osmotique (Bubeck, 2014).

Voie alterne du complément

La voie alterne a la particularité d'être une voie activée en permanence à bas bruit par un mécanisme appelé « tick-over » (Lachmann and Halbwachs, 1975). Grâce à ce processus, elle assure un niveau basal de protection et permet de réagir rapidement face à l'arrivée d'un organisme pathogène. Cette voie est la plus importante des trois décrites puisqu'elle assure l'amplification de l'activation des deux autres voies si besoin est.

Le « tick-over » correspond à l'hydrolyse spontanée du composant C3 en C3(H₂O). L'hydrolyse du C3 entraîne un changement de conformation qui expose un site de fixation à un acteur plasmatique de la voie alterne, le facteur B (FB). Le complexe C3(H₂O)FB se forme alors, la fixation du FB sur le C3(H₂O) provoque un changement de conformation du FB qui peut par la suite être clivé par une sérine-protéase circulante, le facteur D (FD). Le clivage du FB se traduit par la libération d'un fragment Ba et d'un fragment Bb à l'origine d'une C3 convertase en phase fluide C3(H₂O)Bb. Cette C3 convertase, dite d'initiation, peut interagir et cliver des molécules circulantes de C3 et libérer en phase soluble des fragments C3b. A la manière du C3(H₂O), le C3b libéré peut s'associer au FB et au FD pour former une C3 convertase C3bBb.

Cette nouvelle C3 convertase permet de cliver encore plus de molécules de C3 en C3b qui peuvent alors former de nouvelles C3 convertases avec des FB et FD. Ceci permet alors d'amplifier considérablement l'activation du complément. La capacité d'auto-amplification de la voie alterne permet à celle-ci d'assurer l'activation du complément pour plus de 80%, même si le déclenchement s'est initialement effectué par la voie classique ou la voie des lectines.

A l'instar des voies classique et des lectines, le C3b généré par la C3 convertase alterne peut se fixer sur celle-ci pour lui conférer une capacité de C5 convertase et permettre sa participation à la voie terminale commune du complément.

— INTRODUCTION —

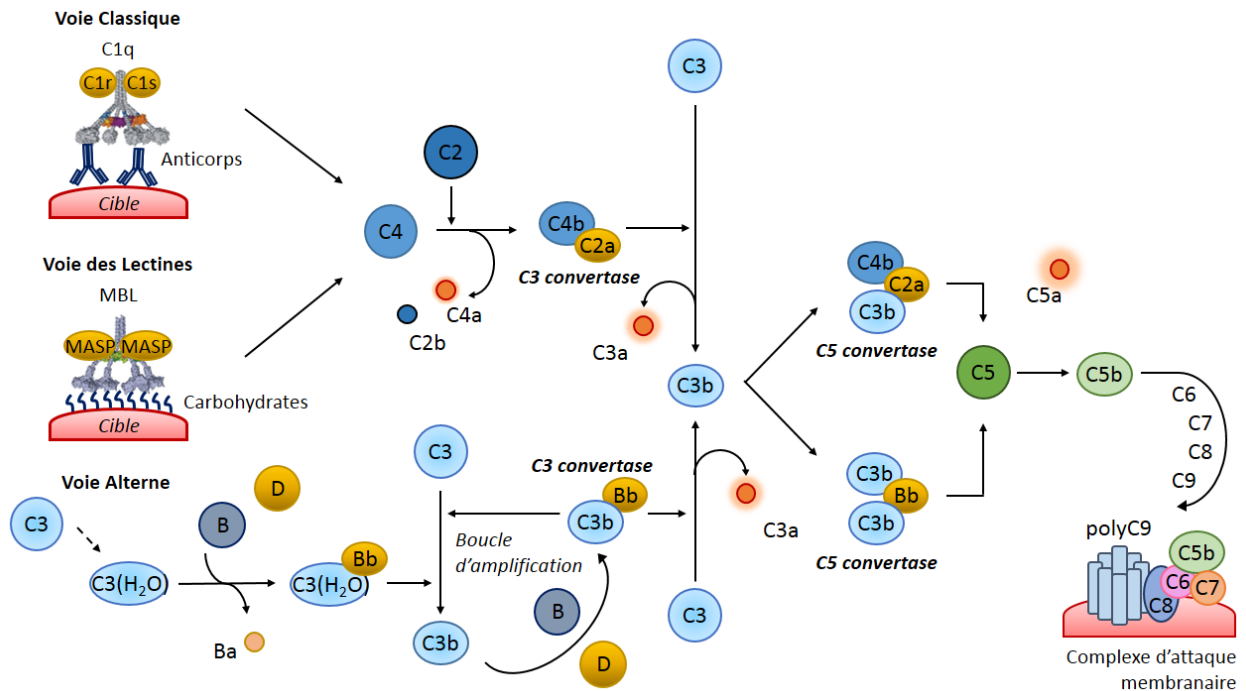


Figure 11. Voies d'activation du complément. Le complément peut être activé par 3 voies: la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. La voie classique s'active après reconnaissance directe d'un antigène par le C1q ou indirecte via des complexes immuns auxquels se fixe le C1q. La fixation du C1q active les estérases C1r et C1s associées. Ceci permet le clivage protéolytique des composants C4 et C2. Les produits C4b et C2a issus du clivage s'associent pour former un complexe enzymatique appelé C3 convertase. La voie des lectines s'active après reconnaissance de groupements carbohydrates par le MBL. La fixation du MBL à sa cible conduit à l'activation des estérases MASP associées. Ces estérases sont également capables de cliver les composants C4 et C2, ce qui permet à terme de former une C3 convertase. La C3 convertase est un complexe enzymatique capable de cliver le C3 en anaphylatoxine C3a et en opsonine C3b. L'opsonine C3b libérée peut s'associer à la C3 convertase pour former une C5 convertase, un complexe enzymatique qui peut cliver le C5 en anaphylatoxine C5a et en fragment C5b. Le fragment C5b libéré peut s'associer aux composants C6, C7, C8 et C9 pour former un pore lytique appelé complexe d'attaque membranaire, capable de s'insérer dans la membrane plasmique des cellules, si ces dernières sont ciblées par le complément. Enfin, la voie alterne est une voie activée en permanence: elle repose sur l'hydrolyse spontanée à bas-bruit du C3. Le produit résultat C3(H₂O) s'associe aux facteurs B et D pour former une C3 convertase d'initiation C3(H₂O)Bb qui permet un premier clivage de C3. Les fragments C3b libérés peuvent s'associer aux facteurs B et D pour former de nouvelles C3 convertases (C3bBb) pour cliver encore plus de C3. L'association de ces C3 convertases à des fragments C3b conduit à la formation de C5 convertases.

4.2 – Fonctions principales du complément

L'action du complément se manifeste par différents mécanismes : la lyse cellulaire, l'opsonisation des cellules cibles et la génération d'une inflammation.

La cytolyse consiste en l'activation complète de la cascade du complément qui se termine par la formation du MAC à travers la membrane des cellules ciblées. Ces pores transmembranaires entraînent une lyse osmotique ainsi qu'un influx calcique qui perturbe le fonctionnement des mitochondries, induit le relargage de cytochrome C et active les processus d'apoptose (Nauta et al., 2002; Triantafilou et al., 2013).

L'opsonisation par les fragments C3b, consécutive à l'activation du composant central C3, conduit à la reconnaissance, la capture et l'élimination des cellules cibles par le système réticuloendothélial. Les fragments C3b ne sont pas les seules opsonines permettant l'endocytose : le C1q et les ficolines peuvent jouer ce rôle. Par ailleurs, le C3b peut être clivé par des protéases et générer des produits de dégradation, tels que le iC3b et le C3d, qui portent aussi cette fonction.

Ces fragments sont reconnus par différents récepteurs exprimés sur les phagocytes :

- Le Complement Receptor 1 (CR1, CD35) : exprimé sur les phagocytes mais aussi sur les érythrocytes, le CR1 lie les fragments C3b. Sur les érythrocytes, il participe à la clairance des complexes immuns sur lesquels s'est activé le complément. Sur les phagocytes, il peut agir en synergie avec les récepteurs Fc pour potentialiser l'internalisation de particules liées aux IgG et au C3b.
- Les Complement Receptor 3 et 4 (CR3, CD11b/CD18 et CR4, CD11c/CD18) : membres de la famille des intégrines, le CR3 et le CR4 sont exprimés sur les cellules immunitaires myéloïdes. Ces récepteurs sont essentiels à l'internalisation de corps associés aux fragments dérivés du C3b appelés iC3b, mais également les fragments C3d pour le CR3.
- Le Complement Receptor de la superfamille des ImmunoGlobulines (CRIg) : récepteur dont l'expression est restreinte notamment aux cellules de Kupffer dans le foie, le CRIg permet la phagocytose de particules liées opsonisées par les fragments C3b ou iC3b (Gorgani et al., 2008).

Les particules internalisées sont à terme dégradées dans les lysosomes des phagocytes.

Enfin, l'activation du complément se manifeste par la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire grâce à la production des anaphylatoxines C3a et C5a. Ces petits fragments,

— INTRODUCTION —

issus du clivage du C3 et du C5 respectivement, contribuent à l'inflammation en interagissant avec leurs récepteurs C3aR et C5aRs (CD88 et C5L2) exprimés à la surface des cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales.

Ces anaphylatoxines sont notamment capables de stimuler la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène par les macrophages et les granulocytes (Elsner et al., 1994a, 1994b), la production d'histamine par les granulocytes et les mastocytes (Kretzschmar et al., 1993; el-Lati et al., 1994) et la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le C3a et plus particulièrement le C5a ont un pouvoir chémo-attractant et permettent de recruter au site d'inflammation des cellules immunitaires telles que les monocytes, les granulocytes et les mastocytes (Hartmann et al., 1997). Les anaphylatoxines peuvent aussi induire la production d'autres médiateurs pro-inflammatoires : ainsi le C3a peut-il stimuler la sécrétion de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β . Enfin, les cellules endothéliales peuvent être activées par le C3a et le C5a et expriment alors des molécules d'adhésion nécessaires au recrutement local de cellules immunitaires (Fischetti and Tedesco, 2006).

4.3 – Régulation du complément

De par son potentiel puissant, le système du complément est extrêmement régulé. Il comprend de nombreux garde-fous pour éviter une hyper-activation des voies du complément qui pourrait mener à une destruction des tissus de l'organisme. De nombreux régulateurs solubles et membranaires ont ainsi été décrits (**Figure 12**, (Kim and Song, 2006; Zipfel and Skerka, 2009)).

Le premier niveau de régulation consiste à réguler le déclenchement des voies du complément. Ainsi l'activation de la voie classique est-elle régulée par un inhibiteur des sérine-protéases appelé C1 inhibiteur (C1Inh, (Ziccardi, 1982)). Le C1Inh est une glycoprotéine qui a la capacité de se fixer de manière covalente et d'inactiver les estérases C1r et C1s, ce qui dissocie le complexe C1, libérant alors du C1q libre et un complexe inactif estérases-C1Inh.

La voie des lectines peut être réprimée par des protéines présentant de fortes homologies de structure avec MASP-1 et MASP-2 telles que MASP-3 et MASP-19 (Degn et al., 2011; Gaboriaud et al., 2013). Incapables de cliver le C4 et le C2, elles peuvent se lier au MBL et entrer en compétition avec MASP-1 et MASP-2. Il est intéressant de noter que le C1Inh est aussi capable de réguler la voie des lectines en bloquant l'activation de MASP-1 et MASP-2. Le C4b Binding Protein (C4BP) régule également la voie classique et la voie des lectines en se fixant au fragment C4b généré au cours de leurs activations. La fixation du C4BP au C4b permet la

— INTRODUCTION —

fixation d'une sérine-protéase plasmatique, le facteur I (FI), à activité inhibitrice (Blom et al., 1999). Le FI inactive alors le C4b et empêche la formation de C3 convertase.

Le second niveau de régulation consiste en l'inhibition des différents fragments générés au cours de l'activation du complément. Le C3b, fragment bioactif séparé du C3, peut ainsi être inactivé par le FI. Le FI clive le C3b en iC3b, qui perd alors sa fonction dans la cascade du complément. L'action du FI nécessite l'intervention de cofacteurs parmi lesquels on trouve des cofacteurs circulants comme le facteur H (FH) ou membranaires comme le Membrane Cofactor Protein (MCP, CD46) et le CR1.

Le FH contrôle l'activation de la voie alterne et la boucle d'activation du complément (Lambris et al., 1996). Cet inhibiteur soluble entre en compétition avec le FB pour se fixer au C3b, ce qui empêche la formation de la C3 convertase (Kazatchkine et al., 1979). Le FH agit également comme cofacteur du FI : le complexe C3b-FH peut être reconnu par le FI et peut provoquer la conversion du C3b en iC3b inactif et la dissociation des C3 convertases formées (Whaley and Ruddy, 1976).

Le MCP est une protéine exprimée à la surface de toutes les cellules nucléées (Barilla-LaBarca et al., 2002). Elle est capable de lier le C3b et, à la manière du FH, induit un changement de conformation du C3b qui est alors reconnu par le FI. Le CR1, en plus d'être un récepteur pour le C3b, est également un cofacteur du FI. Il permet d'induire le clivage du C3b en iC3b mais permet aussi de dégrader le fragment iC3b en d'autres fragments dérivés du C3 (ex : C3c, C3dg) (Lambris et al., 1996).

Enfin, il existe d'autres régulateurs membranaires tels que le Decay Accelerating Factor (DAF, CD55), une glycoprotéine membranaire, qui interagit avec C3b et inhibe la C3 et la C5 convertase en accélérant leur dissociation (Zipfel and Skerka, 2009).

Les étapes finales de la voie terminale commune sont également étroitement régulées pour éviter des dommages accidentels : la présence de CD59 à la surface de nombreux types cellulaires empêche l'insertion du MAC dans la membrane plasmique via une interaction avec le composant C8 présent au sein du MAC soluble, ce qui permet de protéger l'intégrité de nos cellules (Meri et al., 1990).

— INTRODUCTION —

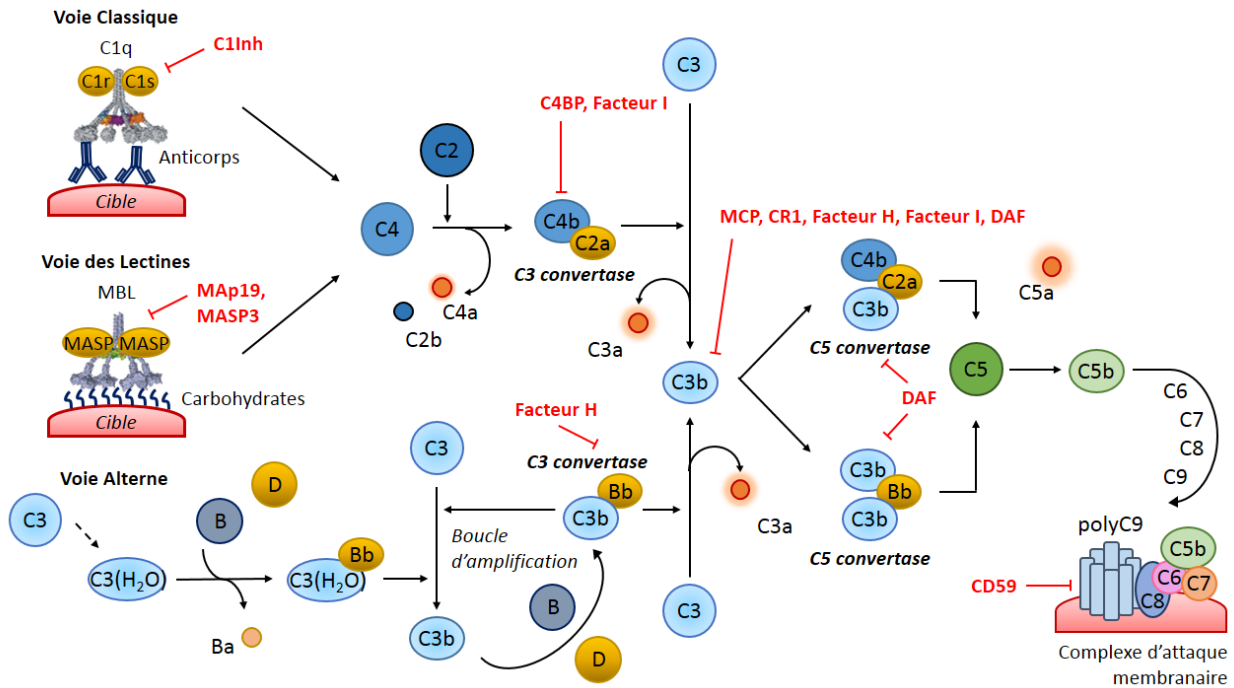


Figure 12. Régulation du complément. Plusieurs niveaux de régulation du complément existent pour éviter une hyper-activation du complément qui pourrait être délétère. Le déclenchement de la voie classique et la voie des lectines sont contrôlés par le C1Inh et des inhibiteurs des MASP (ex : MASP-3, MAP19) respectivement. Les C3 convertases sont aussi régulées grâce à plusieurs protéines telles que le C4BP et le facteur I qui vont inactiver le C4b, ou le facteur H qui peut se fixer au C3b et empêcher la formation de la C3 convertase de la voie alterne. Le fragment bioactif C3b est contrôlé par l'action du facteur I et de cofacteurs tels que le facteur H soluble, le MCP membranaire ou le CR1 membranaire. Le C3b est alors converti en fragment inactif iC3b. Le régulateur membranaire DAF peut également interagir avec C3b et accélérer la dissociation de la C3 et de la C5 convertase. Enfin, la formation du complexe d'attaque membranaire est aussi contrôlée grâce au CD59 présent sur les cellules. Le CD59 peut se fixer au C8 et empêcher l'intégration du complexe d'attaque membranaire dans la membrane plasmique et l'action lytique sur nos propres cellules.

4.4 – Modulation du système immunitaire par le complément

Outre ses fonctions primaires d'élimination des agents pathogènes, le système du complément présente des capacités immuno-régulatrices et peut influencer la mise en place des réponses immunitaires adaptatives.

Complément et lymphocytes B

Il a été démontré il y a 40 ans par Mark Pepys que la déplétion du composant C3 *in vivo* abolissait toute réponse humorale adaptative chez la souris (Pepys, 1972), suggérant la nécessité d'un système du complément intact pour les réponses immunitaires humorales aux pathogènes. Ce résultat a été conforté par l'absence de production de anticorps chez des animaux invalidés

— INTRODUCTION —

pour le gène codant le C3 mais aussi par l'absence de LB mémoires chez les patients déficients en C3 (Ghannam et al., 2008; O'Neil et al., 1988). Plusieurs mécanismes ont depuis été identifiés pour expliquer ce phénomène.

Les études réalisées *in vitro* ont montré que certains fragments dérivés du C3b pouvaient interagir avec les récepteurs du complément exprimés à la surface des LB et que cette fixation participait à leur activation (Pepys, 1974). Ainsi, l'adjonction de plusieurs molécules de C3d à un antigène faiblement immunogène augmente-t-elle dans un modèle *in vivo* jusqu'à 10 000 fois la réponse anticorps dirigée contre ce dernier. *In vitro*, le C3d associé à cet antigène permet de diminuer le seuil d'activation des LB spécifiques incubés en sa présence (Carter and Fearon, 1992; Dempsey et al., 1996; Wang et al., 2004). Nous savons désormais que le rôle du complément sur l'immunité humorale adaptative repose principalement sur l'interaction entre le Complement Receptor 2 (CR2, CD21), exprimé sur les LB et sur les cellules dendritiques folliculaires (FDC), et le fragment C3d du complément associé à un antigène (Carroll, 2000; Hebell et al., 1991; Rickert, 2005). L'importance de CR2 est soutenue par des études *in vivo* dans lesquelles l'invalidation de CR2 empêchait la génération de réponses anticorps pour de faibles doses d'antigène (Ahearn et al., 1996; Molina et al., 1996). A la surface des LB, le CR2 forme un complexe de récepteurs avec la protéine transmembranaire de signalisation CD19 et la tétraspanine CD81 (Cherukuri et al., 2001). Le complexe peut agir en augmentant tout signal transduit par le BCR du LB lorsque celui-ci rencontre un antigène opsonisé par C3d : l'antigène se lie au BCR tandis que le C3d se fixe au CR2, ce qui permet de rassembler les deux partenaires. La coligation du BCR et de CR2 sur les LB favorise également l'apprêtement de l'antigène à l'intérieur des LB ainsi que leur capacité à présenter l'antigène à des LT spécifiques (Cherukuri et al., 2001).

Le complément participe également à la localisation des antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires, de par la présence des FDC. Les FDC sont des cellules stromales capables de sécréter des molécules chémo-attractives pour recruter les LB et de participer à l'architecture des structures lymphoïdes, notamment les centres germinatifs, concentrés en LB. Les FDC participent à la rétention des antigènes dans ces organes et à l'activation des LB en leur présentant l'antigène (Fang et al., 1998). Ainsi, la décomplémentation *in vivo* de souris empêche-t-elle la séquestration des antigènes dans les centres germinatifs de la rate (Papamichail et al., 1975). Les FDC immobilisent les antigènes solubles à leur surface grâce au CR2 qu'elles expriment et à l'opsonisation de ces antigènes par du C3d. Elles contribuent ainsi à la sélection de LB spécifiques de haute affinité. De plus, Barrington et al. ont montré que

— INTRODUCTION —

l'interaction entre CR2 et C3d dans les organes lymphoïdes était nécessaire à la bonne mise en place d'une réponse B mémoire à long terme et l'élaboration rapide d'une réponse anamnesticque (Barrington et al., 2002).

D'autres protéines du complément peuvent également contribuer à la modulation des LB. Ainsi, la protéine C4BP, en plus de réguler l'activation du complément, peut-elle se lier directement avec le CD40 exprimé à la surface des LB (Brodeur et al., 2003). A la manière de CD40L, cette interaction peut induire leur activation. Ceci se traduit par une surexpression de certains marqueurs comme la molécule d'adhésion ICAM-1 (CD54) ou la molécule de costimulation CD86, mais également par une expansion clonale des LB. Enfin, les anaphylatoxines peuvent également interagir avec les LB. C3a peut se lier avec le C3aR, exprimé sur les LB, et réguler négativement les réponses immunitaires polyclonales ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 (Fischer and Hugli, 1997; Morgan et al., 1982). Quant au C5a, ses propriétés chémo-attractantes lui permettent de réguler la migration des LB qui expriment le C5aR, notamment ceux présents dans les centres germinatifs (Ottonello et al., 1999).

Complément et lymphocytes T

Le système du complément peut agir directement sur les LT. Il a récemment été découvert un rôle majeur du complément dans l'homéostasie des LT. Liszewski et al. ont ainsi montré que le complément pouvait s'activer à l'intérieur des LT CD4⁺. Cette activation ne passe pas par l'intermédiaire d'une C3 convertase mais est initiée par une protéase, la cathepsine L. Les LT au repos contiennent du C3 et de la cathepsine L dans des endosomes. Le clivage du C3 par la cathepsine L génère du C3a et du C3b. Le C3a produit dans les LT peut interagir avec du C3aR intracellulaire. Cette interaction C3a-C3aR conduit à l'activation de voies de signalisation, avec notamment la répression de l'expression de la molécule pro-apoptotique Fas, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et l'activation de mTOR, ce qui va permettre la survie des cellules (Liszewski et al., 2013; Mueller-Ortiz et al., 2014). Les régulateurs membranaires du complément peuvent aussi moduler l'activation des LT : il a ainsi été montré que le co-engagement de DAF et du CD3 sur les LT entraînait l'expansion clonale de ces derniers (Capasso et al., 2006). Par ailleurs, en 2006, Wagner et al. ont montré que la stimulation du CR1 exprimé à la surface des LT était capable d'inhiber la prolifération des LT ainsi que la production d'IL-2 (Wagner et al., 2006). Enfin, l'engagement du CD59 à la surface des LT

— INTRODUCTION —

active des voies de signalisation capables de réguler l'expression du TCR à la membrane (Lipp et al., 2014).

Le complément est aussi capable d'orienter les réponses thymo-dépendantes grâce aux anaphylatoxines. Liszewski et al. ont ainsi également montré que l'activation des LT via le TCR provoquait la fusion des endosomes avec la membrane plasmique : dans cette configuration, le C3aR se retrouve à la membrane et son activation par le C3a contribue à polariser le LT vers un phénotype Th1, en synergie avec la voie de signalisation transduite par le MCP membranaire qui est capable de lier du C3b (Le Friec et al., 2012). Ceci est le cas avec le C3a libéré depuis les endosomes mais également avec les anaphylatoxines générées lors d'une activation du complément. Les C3a et C5a produites sont capables d'interagir avec leurs récepteurs exprimés à la surface des LT pour les polariser. Nous savons désormais que l'absence de stimulation des récepteurs à C3a et C5a au cours de l'activation des LT s'accompagne d'une expression intracellulaire élevée de Forkhead Box P3 (Foxp3), facteur de transcription impliqué dans la génération de Tregs (Kwan et al., 2013; Strainic et al., 2013). Ces résultats sont soutenus *in vitro* par le défaut d'induction de Tregs à partir de LT issus de patients déficients en C3 (Ghannam et al., 2008). Enfin, les régulateurs membranaires sont capables de polariser les réponses adaptatives. Il a ainsi été observé que les souris déficientes en DAF présentaient une réponse Th1 prononcée, caractérisée par une production accrue d'interféron- γ (IFN- γ) et d'IL-2 et une réduction dans la sécrétion d'IL-10 (Heeger et al., 2005; Liu et al., 2005). DAF aurait donc un rôle Th1-suppresseur, potentiellement en réprimant la production d'anaphylatoxines C3a (Dunkelberger and Song, 2010), et polariserait les LT vers un phénotype Tregs en favorisant la production d'IL-10 (Capasso et al., 2006). Toutefois à l'inverse, et de manière intéressante, une étude plus récente a montré que les LT de patients déficients en DAF étaient incapables de se polariser vers un phénotype Th1 (Le Friec et al., 2012).

Complément et cellules présentatrices d'antigènes

L'action du complément pour contrôler les réponses T peut se faire directement sur les LT mais aussi en modulant l'initiation des réponses immunitaires et la fonction des CPA. Les CPA expriment une pléthore de récepteurs et de régulateurs du complément à leur surface. Elles sont ainsi promptes à reconnaître et à interagir avec des antigènes opsonisés par le complément. Elles peuvent également adapter rapidement leur comportement en fonction du microenvironnement rencontré.

— INTRODUCTION —

En absence de C1q ou de C3, la capture antigénique se révèle sous-optimale : ainsi, l'opsonisation de cellules apoptotiques par le C1q ou les fragments iC3b s'avère-t-elle être importante pour la phagocytose par des cellules dendritiques (Morelli et al., 2003; Nauta et al., 2004; Verbovetski et al., 2002). Ce mécanisme mobilise les récepteurs du C1q et du iC3b exprimés à la surface des CPA (Fu et al., 2012; Morelli et al., 2003; Nauta et al., 2002; Païdassi et al., 2011). La capture s'accompagne d'une inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-12). C'est d'ailleurs par l'intermédiaire de ce mécanisme que les corps apoptotiques sont retirés de la circulation par le système réticuloendothélial (Takizawa et al., 1996). Enfin, le C3b couplé à un antigène favorise la capture, l'apprêtement de ce dernier par des CPA ainsi que sa présentation à des LT (Fu et al., 2012; Jacquier-Sarlin et al., 1995).

Le complément impacte également la maturation des CPA : le C1q peut se fixer sur des MDCs et induire la translocation du facteur de transcription NF- κ B, ce qui se traduit par une sécrétion de TNF α , d'IL-12 et d'IL-10 (Csomor et al., 2007). Des études postérieures ont cependant montré que le C1q pouvait réguler la différenciation des cellules dendritiques et empêcher la production d'IL-6 en se liant au CD305 membranaire (Son et al., 2012). Il a aussi été montré que la présence de fragments iC3b dans le voisinage des cellules dendritiques dermales inhibait leur développement. L'interaction entre le iC3b et le CR3 exprimé à la surface des cellules entraînent une répression de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD40 et de la sécrétion d'IL-12 et favorisent la production de cytokines anti-inflammatoires telles que le Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2) (Marth and Kelsall, 1997; Sohn et al., 2003; Takahara et al., 2003).

Les cellules dendritiques sont capables de sécréter localement du C3 (Peng et al., 2006). Ce C3 présente un rôle pléiotropique. *In vitro*, cette production s'avère être nécessaire pour que les cellules dendritiques puissent stimuler des LT CD4⁺ et induire chez ces derniers la production d'IFN- γ et d'IL-2. L'administration *in vivo* de ces cellules dendritiques déficientes en C3 s'accompagne d'une réduction dans l'activation des LT. Par ailleurs, l'absence de C3 réprime l'expression du CMH de classe II et des molécules de costimulation et favorise la polarisation des LT vers un profil Th2 et la génération de Tregs. Il est alors intéressant de noter que chez les patients déficients en C3, la réponse Th1 est drastiquement atteinte, tandis que la réponse Th2 demeure normale. A l'inverse, il a été observé dans un modèle murin d'allergie pulmonaire que l'invalidation du C3 diminuait la sévérité de la pathologie et empêchait la production d'IL-4. Ceci supporte donc le fait que le C3 peut favoriser la mise en place d'une réponse effectrice Th2 (Drouin et al., 2001).

Enfin, l'anaphylatoxine C5a agit également sur les CPA pour moduler la réponse T. Ainsi, l'absence de C5 *in vivo* est-elle associée à une réponse Th2 exacerbée dans un modèle expérimental d'asthme : l'absence de signalisation via le C5aR exprimé sur les monocytes conduit à un phénotype anti-inflammatoire (Karp et al., 2000; Köhl et al., 2006). Bien que C5a ait été décrit comme pro-Th1, un rôle dans l'induction des réponses Th2 a également été mis en évidence : C5a peut réprimer la sécrétion d'IL-12 pro-Th1 par des monocytes humains (Wittmann et al., 1999).

L'ensemble des propriétés décrites n'est toutefois pas exhaustif car les protéines du complément présentent des rôles complexes et variés. Cela a toutefois le mérite de montrer que le système du complément n'est pas qu'un simple acteur de l'immunité innée mais également un puissant contrôleur de l'immunité adaptative, dont la présence est importante pour obtenir une réponse immunitaire efficace.

4.5 – Relations entre complément et coagulation

La cascade de la coagulation et la cascade du complément sont habituellement considérées comme deux cascades distinctes. Pourtant, elles ne sont pas si éloignées que cela : lorsqu'une infection se déclare ou qu'un tissu est endommagé, le système du complément s'active et participe à la mise en place d'un microenvironnement immunitaire pro-inflammatoire. Ces situations sont aussi associées à une propension à coaguler localement. A l'inverse, toute brèche vasculaire et saignement consécutif s'accompagnent d'une activation de la coagulation mais aussi de mécanismes inflammatoires parmi lesquels on retrouve le complément pour prévenir toute infection. Complément et coagulation s'activeraient donc de manière concomitante. Descendantes d'une voie de signalisation ancestrale commune (Krem and Di Cera, 2002), ces deux systèmes présentent des similitudes du point de vue biochimique (activation de protéases en cascade) mais aussi de nombreuses connections, au point d'avoir affaire à un large réseau (**Figure 13**).

Le système du complément présente des propriétés prothrombotiques. Ainsi, la voie des lectines est-elle capable d'activer la prothrombine en thrombine (Krarup et al., 2007). *In vitro*, l'estérase MASP-2 peut catalyser la génération de thrombine active, à la manière du complexe prothrombinase, toutefois avec un potentiel d'activation beaucoup plus faible. La production de fibrine se ferait localement, sur les cellules sur lesquelles le MBL se fixerait. De même, le complexe d'attaque membranaire C5b-9 peut catalyser l'activation de la prothrombine en absence du FVa (Wiedmer et al., 1986).

— INTRODUCTION —

Le complément peut donc agir directement sur les acteurs de la cascade de la coagulation mais il peut également impacter les acteurs cellulaires de l'hémostase : ainsi, l'activation du complément peut-elle conduire à la modification des surfaces cellulaires. L'insertion du C5b-9 dans les membranes des plaquettes contribue, à une concentration sublytique, fortement à leur activation (Sims et al., 1988; Wiedmer et al., 1986). Ceci se manifeste par une dépolarisation membranaire (Wiedmer and Sims, 1985) qui favoriserait l'agrégation plaquettaire. La formation du C5b-9 sur les plaquettes induit aussi l'exposition de phosphatidylsérines, phospholipides nécessaires à l'ancrage, l'assemblage et au fonctionnement des complexes pro-coagulants ténase et prothrombinase (Chang et al., 1993; Sims et al., 1988). Le complexe C5b-9 participe également à l'exocytose de granules retenus dans les plaquettes (Ando et al., 1988). Ces granules sécrétoires contiennent de la sérotonine et du thromboxane A₂, molécules vasoconstrictrices et prothrombotiques, libérées pour accélérer la résorption du saignement. Il y a aussi relargage de multimères de vWF qui permettent une adhésion des plaquettes localement (Hattori et al., 1989). L'activation et l'agrégation de ces plaquettes peuvent également être stimulées par l'anaphylatoxine C3a : Polley et al. ont ainsi montré *in vitro* que C3a permettait le relargage de sérotonine à partir de plaquettes purifiées ainsi que leur agrégation (Polley and Nachman, 1983). Enfin, le phénotype des plaquettes peut aussi être modifié par la voie classique du complément : les plaquettes expriment des récepteurs au C1q, dont la fixation peut entraîner l'expression à la membrane d'intégrines prothrombotiques (glycoprotéine GPIIb/IIIa et P-sélectine, (Peerschke et al., 1993)).

Une des autres propriétés du complément est d'induire l'expression de facteur tissulaire. Cette molécule, initiatrice de la voie extrinsèque de la coagulation, se retrouve au niveau du sous-endothélium vasculaire et ne devient accessible qu'en cas de brèche vasculaire. Le facteur tissulaire peut être également retrouvé dans les leucocytes (Muhlfelder et al., 1979). Ainsi, l'activation du complément augmente-t-elle l'expression de facteur tissulaire au niveau de l'endothélium (Ikeda et al., 1997) mais aussi chez les neutrophiles (Ritis et al., 2006) ou encore les monocytes (Langer et al., 2013; Osterud, 1998). L'induction du facteur tissulaire repose notamment sur une interaction entre l'anaphylatoxine C5a et son récepteur CD88 exprimé à leur surface (Girardi et al., 2003) ainsi que sur l'insertion membranaire du complexe C5b-9.

En plus d'activer l'expression de facteur tissulaire, le complément peut déclencher d'autres mécanismes sur les cellules endothéliales. A l'état physiologique, la surface de l'endothélium est recouverte d'héparane sulfate. Ce glycane peut activer dans son microenvironnement l'antithrombine III, un inhibiteur de la thrombine. C5a, en synergie avec des anticorps dirigés

— INTRODUCTION —

contre l'endothélium, est capable de dissocier *in vitro* l'héparane sulfate des cellules endothéliales et ainsi favoriser une coagulation intravasculaire (Platt et al., 1991). Ce mécanisme a été proposé dans la pathogenèse des rejets aigus d'allogreffe. Par ailleurs, la voie classique du complément via le C1q facilite l'adhésion des leucocytes et des plaquettes sur l'endothélium endommagé en induisant l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (E-selectine, VCAM-1, ICAM-1, (Lozada et al., 1995)).

L'activation du complément peut aussi modifier le phénotype des mastocytes et des basophiles. A l'état basal, les mastocytes sont capables de sécréter du tissu-type Plasminogen Activator (t-PA) et de l'héparine, des molécules antithrombotiques qui permettent de prévenir une éventuelle thrombose incontrôlée. *In vitro*, il a été montré que C5a induisait une très forte production de Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) par les mastocytes (Wojta et al., 2002, 2003). Ceci permet d'abroger l'activité antithrombotique de ces cellules et de favoriser les processus d'hémostase. De même, chez les basophiles, C5a stimule la sécrétion de PAI-1 (Wojta et al., 2002).

Enfin le complément peut également inhiber les processus de fibrinolyse : le C4BP est un cofacteur impliqué dans l'inactivation du fragment C4b issu des voies classique et des lectines du complément mais il peut s'associer à la protéine S, cofacteur de la protéine C activée, impliquée dans la dégradation du FVa et du FVIIIa. La formation du complexe C4BP/protéine S diminue la disponibilité en protéine S et entrave les mécanismes antithrombotiques (Rezende et al., 2004).

Les interactions entre complément et coagulation sont bidirectionnelles. Aussi, de manière réciproque, les protéases de la cascade de la coagulation peuvent activer le système du complément. Ainsi, le FXIIa, initiateur de la voie intrinsèque de la coagulation, est-il capable de déclencher la voie classique du complément, en interagissant avec l'estérase C1r, ce qui permet de catalyser l'activation du composant C1 (Ghebrehwet et al., 1981). De récentes études ont montré que le composant central du complément C3 pouvait être directement activé par plusieurs protéases de la coagulation (Amara et al., 2010). Ainsi, le C3 peut-il être clivé *in vitro* et libérer l'anaphylatoxine C3a et l'opsonine C3b, toutes deux biologiquement actives, après action du FXa, de la plasmine, de la thrombine, du FIXa ou encore du FXIa. Ces protéases n'ont toutefois pas le même potentiel d'activation : le FXa et la plasmine catalysent beaucoup plus le clivage du C3 que le FXIa.

— INTRODUCTION —

Le composant terminal du complément C5 peut aussi subir le même processus (Amara et al., 2010; Huber-Lang et al., 2006). Huber-Lang et al. ont ainsi observé une production d'anaphylatoxines C5a chez des souris déficientes en C3, chez lesquelles la formation de C5 convertase était impossible. Cette production de C5a était inhibée après administration d'hirudine, un inhibiteur spécifique de la thrombine. L'activation du C5 par la thrombine conduit à la production d'une forme particulière de C5b, dénommée C5b_T, capable de former un complexe d'attaque membranaire C5b_T-9 sensiblement plus puissant que le C5b-9 classique (Krisinger et al., 2012). La thrombine constitue ainsi une quatrième voie d'activation pour le complément.

Enfin, d'autres acteurs de la coagulation peuvent aussi contrôler l'activation du complément. Ainsi, Rayès et al. ont montré en 2014 que le vWF pouvait se lier au FH et augmenter son activité de cofacteur du FI (Rayès et al., 2014). Le vWF favorise donc l'inactivation du C3b. Par ailleurs, le vWF a récemment été décrit comme modulant la fixation et l'activité cytolytique du complément à la surface des cellules endothéliales (Noone et al., 2016).

Les cascades du complément et de la coagulation sont en somme fortement intriquées. Les communications entre ces deux entités s'avèrent nombreuses et permettent une action synergique en vue de résoudre un saignement ou une infection mais également une régulation croisée pour éviter toute réaction incontrôlée délétère pour l'organisme.

— INTRODUCTION —

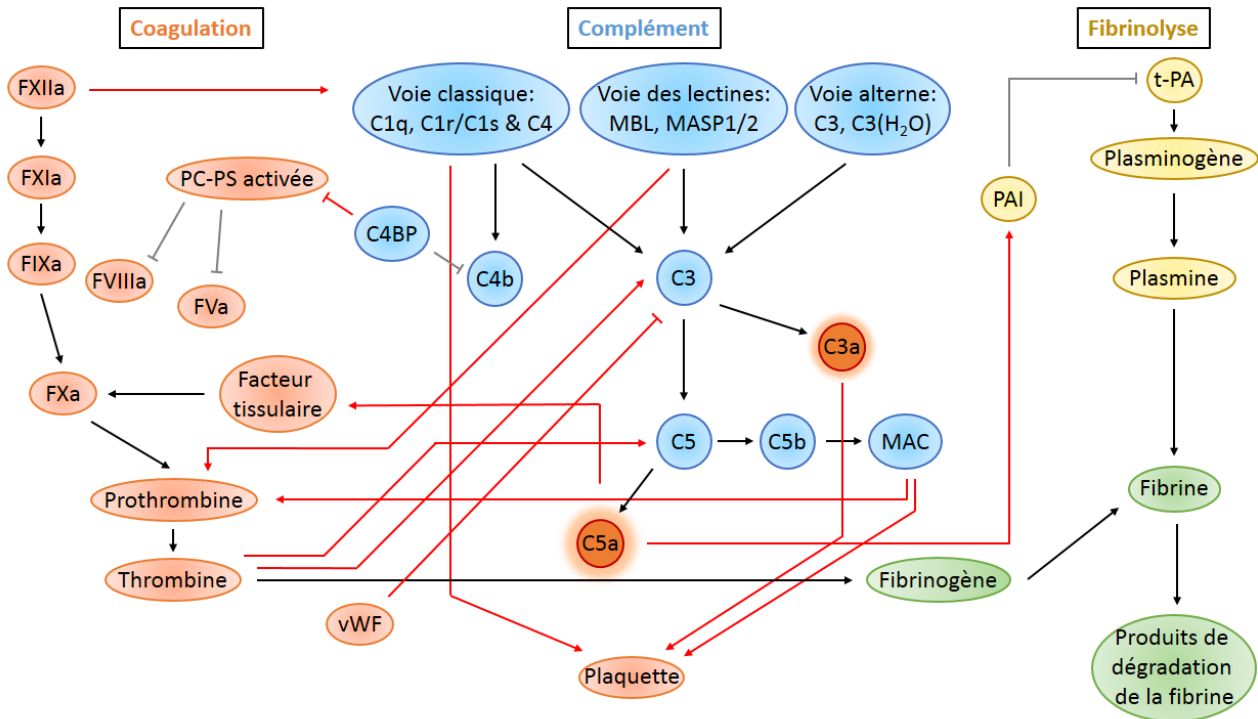


Figure 13. Dialogue entre complément et coagulation. Les systèmes de la coagulation et du complément communiquent de manière bidirectionnelle par l'intermédiaire de leurs composants. La coagulation peut activer le complément : le FXIIa de la coagulation est capable d'activer la voie classique du complément. La thrombine est capable d'activer directement le composant C3 en C3a et C3b ainsi que le composant C5 en C5a et C5b, indépendamment de l'activation des trois voies du complément. Le complément peut favoriser l'activation de la coagulation : la voie des lectines et le MAC peuvent activer la prothrombine en thrombine. L'anaphylatoxine C5a peut favoriser la sécrétion de facteur tissulaire prothrombotique. Le complément est capable de favoriser l'activation des plaquettes grâce au C1q qui se fixe dessus, grâce à l'anaphylatoxine C3a et grâce au MAC qui peut s'y insérer et stimuler, à des concentrations sublytiques, l'activation des plaquettes. D'autres acteurs de la coagulation contrôlent l'activation du complément : ainsi le vWF favorise-t-il l'inactivation du C3b en se liant au FH et en augmentant son activité de cofacteur du FI. Le complément peut aussi bloquer les processus antithrombotiques : le C4BP peut inhiber le complexe protéine C/protéine S, impliqué dans l'inactivation des facteurs de la coagulation. L'anaphylatoxine C5a peut quant à elle stimuler la sécrétion de PAI-1 qui participe à l'inactivation de la fibrinolyse (D'après (Rittirsch et al., 2008)).

5. Objectifs de la thèse

Le but de ma thèse est d'approfondir la compréhension que nous avons des étapes initiales de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique. Mon travail de thèse s'est organisé selon deux axes.

La première partie de ma thèse repose sur l'hypothèse selon laquelle le microenvironnement rencontré par le FVIII après administration *in vivo* joue un rôle important dans l'élaboration de la réponse immunitaire anti-FVIII. Parmi les constituants de ce microenvironnement, on retrouve le système du complément dont les molécules sont capables d'interagir avec les protéines de la cascade de la coagulation. D'autre part, le système du complément est capable de moduler la mise en place des réponses immunitaires adaptatives en ciblant les différents acteurs cellulaires du système immunitaire. Sachant que l'implication du complément dans l'hémophilie A n'a jamais été étudié jusqu'à maintenant, j'ai donc évalué le rôle potentiel du complément sur la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII, en particulier sur l'initiation de la réponse immunitaire.

La seconde partie de ma thèse s'articule autour de l'implication de la structure du FVIII pour sa reconnaissance et sa prise en charge par le système immunitaire. Des études récentes ont montré des liens entre structure du FVIII et immunogénicité (Herczenik et al., 2012a; Wroblewska et al., 2012). Ainsi, a-t-il été démontré l'importance du domaine C1 du FVIII pour son internalisation par des CPA ainsi que pour l'immunogénicité du FVIII *in vivo*. Etant donné que le domaine C1 présente de fortes homologies de structure avec le domaine C2, je me suis demandé si le domaine C2 pouvait également participer à la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII, dans la capture du FVIII par les CPA.

RESULTATS

1. L'activation du complément potentialise la capture du facteur VIII par les cellules présentatrices d'antigènes

L'administration intraveineuse de FVIII thérapeutique pour prévenir ou traiter les hémorragies conduit dans jusqu'à 30% des cas à l'apparition d'anticorps inhibant l'activité pro-coagulante du FVIII injecté. L'immunogénicité du FVIII est intrigante car la protéine est administrée en faible quantité par voie intraveineuse et en absence d'adjuvant. La réponse immunitaire dirigée contre le FVIII est initiée par l'endocytose du FVIII par des CPA qui, une fois ayant reçu un signal de danger, activent des lymphocytes T CD4⁺ naïfs spécifiques du FVIII (Lacroix-Desmazes et al., 2008). Si les étapes effectrices de la réponse adaptative ont bien été documentées, l'étape d'initiation reste mal connue à ce jour. Une fois administré, le FVIII se retrouve dans le sang et peut interagir avec toutes les protéines en circulation, parmi lesquelles on trouve les protéines constituant le système du complément. Acteur majeur de l'immunité innée, le système du complément participe également aux réponses immunitaires adaptatives (Dunkelberger and Song, 2010). Alors que le complément est impliqué dans la mise en place des réponses immunitaires contre des agents infectieux, son implication dans les réponses immunitaires dirigées contre les protéines thérapeutiques telles que le FVIII n'a jamais été étudiée jusqu'à présent.

Dans cette étude, je me suis demandé quel potentiel rôle pouvait jouer le complément dans la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII. *In vivo*, la déplétion transitoire du complément dans un modèle murin d'hémophilie A sévère réduisait drastiquement le taux d'anticorps inhibiteurs anti-FVIII, générés suite à l'administration répétée de FVIII. A l'inverse, l'activation chronique du complément favorisait la génération d'anticorps anti-FVIII. Je me suis intéressé à la possible implication du complément dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII. *In vitro*, j'ai essayé de déterminer si le complément pouvait être à l'origine des signaux de danger nécessaires à la maturation des CPA, ce qui ne semble pas être le cas. Mes résultats ont également montré que la présence du complément favorisait spécifiquement l'internalisation du FVIII par des MO-DCs ou purifiées directement du sang mais pas par les macrophages. En particulier, le composant C3 augmente l'endocytose du FVIII par les MO-DCs ainsi que sa présentation antigénique à des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques. Le C3 est une molécule bio-inactive mais son clivage libère un fragment C3b bioactif. De manière similaire au C3, le fragment C3b potentialisait de manière spécifique la capture du FVIII par des MO-DCs.

— RESULTATS —

Jusqu'à présent, les études sur l'immunogénicité des protéines thérapeutiques et les mécanismes d'endocytose *in vitro* avaient toujours été effectuées en absence de complément ou en présence de sérum décomplémenté. Pour la première fois, mes résultats montrent l'importance jouée par le complément dans l'immunogénicité du FVIII. Les fragments de clivage consécutifs à l'activation du complément présentent un important rôle adjuvant dans l'internalisation du FVIII, une protéine thérapeutique particulièrement immunogène chez les patients traités. Des études approfondies devront être menées pour déterminer la contribution respective des différentes voies d'activation du complément dans l'immunogénicité du FVIII. Par ailleurs, la déplétion transitoire du complément pourrait constituer une potentielle stratégie thérapeutique pour prévenir le développement des anticorps inhibiteurs chez les patients hémophiles.

— RESULTATS —

Title: Complement C3 facilitates endocytosis of therapeutic factor VIII by antigen-presenting cells

Running title: Complement mediates FVIII endocytosis

Julie Rayes^{*1,2,3}, **Mathieu Ing**^{*1,2,3}, Ivan Peyron^{1,2,3}, Sandrine Delignat^{1,2,3}, Laurent Gilardin^{1,2,3}, Carl-Wilhelm Vogel^{4,5}, David C. Fritzinger⁴, John Lambris⁶, Véronique Frémeaux-Bacchi^{1,2,3,7}, Srinivas V Kaveri^{1,2,3,8}, Lubka T Roumenina^{1,2,3}, Sébastien Lacroix-Desmazes^{1,2,3,8}

¹INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 1138, Paris, France; ³Université Paris Descartes, UMR S 1138, Paris, France; ⁴University of Hawaii Cancer Center, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96813, USA; ⁵Department of Pathology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96813, USA; ⁶Department of Pathology & Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA; ⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'Immunologie Biologique, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France; ⁸Laboratoire International Associé INSERM (France)-ICMR (India).

***contributed equally to the work**

Corresponding author: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, 75006 France - Tel: +33 1 44 27 82 02 - Fax: +33 1 44 27 81 94; Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count: Abstract: 212; Text: 4313; Figures: 5; Supplementary figures: 4; References: 44

Abstract

Development of neutralizing antibodies against therapeutic Factor VIII (FVIII) is the most serious complication of the treatment of hemophilia A. Increasing evidence shows the multifactorial origin of the anti-FVIII immune response, combining both genetic and environmental factors. While a role for the complement system on innate as well as adaptive immunity has been documented, the implication of complement activation on the onset of the anti-FVIII immune response is unknown. Here, using animal models of *in vivo* complement depletion or chronic activation, as well as *in vitro* assays for FVIII endocytosis by antigen-presenting cells and presentation to T cells, we investigated a role for complement in the immune response against therapeutic FVIII. Complement C3 depletion, using transient exhaustion of complement by humanized cobra venom factor, lead to a reduction in the levels of inhibitory anti-FVIII IgG in FVIII-treated hemophilia A mice in primary immune responses. Conversely, congenital complement activation in complement factor H-deficient mice, resulting in chronic inflammation, was associated with an exacerbation of the immune response to exogenous FVIII. Complement C3 and its cleavage product C3b enhanced FVIII endocytosis by human dendritic cells and FVIII presentation to a FVIII-specific CD4⁺ T-cell hybridoma. Taken together, our results suggest an important adjuvant role for the complement cascade in the immune response to therapeutic FVIII.

Keywords

Hemophilia A, Factor VIII, Anti-drug antibodies, Complement, Dendritic cells

Salient points

1. Complement activation modulates the immune response to therapeutic FVIII in experimental severe hemophilia A
2. Complement C3 facilitates FVIII endocytosis by human dendritic cells

Introduction

Hemophilia A is a rare X-linked inherited hemorrhagic disorder consecutive to the absence of functional pro-coagulant factor VIII (FVIII). Prevention or treatment of bleeding consists in replacement therapy with exogenous FVIII. However, up to 30% of the patients develop antibodies of IgG isotype that neutralize the procoagulant activity of therapeutic FVIII, and are referred to as FVIII inhibitors (1). The immune response that develops against therapeutic FVIII is thought to be a classical T-cell dependent immune response to a foreign glycoprotein antigen. Thus, the antibody response and the nature of the T cells implicated have been extensively characterized (2). The development of a naïve T-cell-dependent immune response requires that the antigen-presenting cells (APCs) that have endocytosed the target antigen receive appropriate maturation signals, referred to as ‘danger signals’, in order to mature and present the processed antigen to CD4⁺ T cells in an immunogenic context. In the case of the immune response to therapeutic FVIII, the nature of the danger signals that adjuvant the anti-FVIII immune response and permit activation of naïve FVIII-specific CD4⁺ T cells is not known. A role for bleeding and inflammation in the development of FVIII inhibitor has been proposed repeatedly (3–5).

Although several recent studies have demonstrated novel cross-talks between the coagulation cascade and the complement system (6, 7), the contribution of complement activation to the anti-FVIII immune response has not been studied so far. The complement system plays major roles in the development of immune responses (8). It is an integral part of the innate host defense. Activation of the complement cascade leads to opsonisation and lysis of pathogens, release of soluble anaphylatoxins that mediate inflammation and chemotaxis (9–11). Complement also triggers adaptive immunity. Activation products of the central complement component C3 opsonize antigens, thus allowing their long-term trapping by follicular dendritic cells (12), to participate in antigen uptake by APCs and presentation to and priming of CD4 and

— RESULTS —

CD8⁺ T cells (13–17), and to enhance humoral immune responses by diminishing the threshold for B-cell activation (18–20). Inappropriate complement triggering is pathogenic and has been associated with autoimmune reactions (21).

In the present work, we investigated the role of the complement system in the development of the anti-FVIII immune response. We demonstrate that depletion of complement by humanized cobra venom factor (hCVF) dampens the intensity of the anti-FVIII immune response *in vivo*. We also show that C3 and the C3-derived activation fragment C3b facilitate FVIII endocytosis by human dendritic cells *in vitro*.

Material and methods

Antibodies and reagents. Complement human proteins Factor B, Factor D, C3, C3b and C3-depleted serum were purchased from Complement Technology (Comptech, TX, USA) and Merck Millipore (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, United Kingdom). Human serum was obtained from AB blood-type healthy donors. Antibodies against CD1a, CD14, CD40, CD83, CD86, HLA-DR, CD206, low density lipoprotein receptor-related protein (LRP, CD91), CD209, CD68 and APC-labeled Annexin V were purchased from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA). Antibody against CD20 was purchased from eBiosciences (San Diego, CA, USA). Humanized cobra venom factor HC3-1496 (hCVF) and C5a receptor antagonist PMX53 have been described previously (22–24).

Animals and administration of FVIII and ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I repeats-13). Wild-type mice (Janvier, Saint-Berthevin, France), FVIII exon 16-invalidated mice (gift from Pr. H.H. Kazazian, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA), and complement factor H (CFH)-deficient mice (gift from Pr. M. Pickering, Imperial College London, London, United Kingdom) were on the C57Bl/6 background and were 8 to 15 weeks old. Mice were handled in agreement with French ethical authorities (authorization #23BA53). Mice were injected intravenously with 1 µg human recombinant FVIII (Helixate® NexGen, CSL-Behring, Marburg, Germany) or with 1 µg human recombinant ADAMTS-13 (a kind gift from Baxter, Maurepas, France) once a week for 4 weeks. Blood was collected 5 days after the last FVIII administration. Plasma was isolated and kept at -80°C until use. For the secondary response experiment, mice were sensitized with 4 injections of 1 µg of human recombinant FVIII, once a week for 4 weeks. Mice were then challenged 5 weeks after the last injection with 1 µg of human recombinant FVIII. Blood was collected 7 and 14 days after challenge. Plasma was isolated and kept at -80°C until use.

— RESULTS —

***In vivo* complement blockade.** Complement was depleted in FVIII-deficient mice by intraperitoneal injection of 20 µg of humanized cobra venom factor HC3-1496 (hCVF). C3 levels in plasma were measured by sandwich ELISA, using a polyclonal goat anti-mouse C3 antibody (MP Biomedicals, Illkirch, France) to capture C3 and a biotinylated polyclonal goat anti-mouse C3 antibody, followed by streptavidin-HRP (R&D systems, Lille, France) and the HRP o-Phenylenediamine Dihydrochloride substrate (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), to reveal bound C3. In order to block the C5a receptor, the C5a receptor antagonist PMX53 was injected intraperitoneally to CFH-deficient mice at a dose of 1 mg/kg, everyday for 4 weeks. hCVF and PMX53 administration occurred 6 hours prior to FVIII administration or FVIII challenge.

Titration of anti-FVIII IgG, FVIII inhibitors and anti-ADAMTS-13 IgG. ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with FVIII (1 µg/ml, Recombinate®, Baxter, Maurepas, France) overnight at 4°C. After blocking with PBS-1% bovine serum albumin (BSA), plasma was incubated for 1 hr at 37°C. Bound IgG were revealed using a HRP-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Anaheim, CA, USA) and the OPD substrate. Absorbance was read at 492 nm. The monoclonal mouse anti-FVIII IgG mAb6 (gift from Dr J.M. Saint-Remy, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium) was used as a standard. FVIII inhibitors were measured by incubating heat-inactivated mouse plasma with human standard plasma (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) for 2 hr at 37°C. The residual FVIII pro-coagulant activity was measured using a chromogenic assay following the manufacturer's recommendations (Siemens Healthcare Diagnostics). Results are expressed in Bethesda titers (BU/ml) that correspond to the reciprocal dilution of the mouse plasma that yields 50% residual FVIII activity. Anti-ADAMTS-13 IgG were measured in the plasma of the mice on ELISA plates coated with 2 µg/ml human recombinant ADAMTS13. Bound IgG were revealed using a HRP-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody.

— RESULTS —

***In vivo* half-life of FVIII.** Mice were injected intravenously with human recombinant FVIII (100 μ l at 10 nM, Helixate® NexGen) 6 hours after complement depletion. Blood was collected using heparinized capillaries at 10, 25, 55, 115, 235, 355, 385 and 475 min. FVIII:Ag in plasma was measured by sandwich ELISA, using a mouse monoclonal anti-C2 domain IgG (ESH-8, Sekisui Diagnostics, Kings Hill, United Kingdom) to capture FVIII. Bound FVIII was revealed using a biotinylated monoclonal mouse anti-human FVIII antibody GMA-8015 (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT, USA), streptavidin-HRP and the OPD substrate. Experimental data were fitted with a one-phase exponential decay equation using GraphPad Prism.

Generation of immature monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) and monocyte-derived macrophages (MO- Φ). 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 were incubated in RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with GM-CSF (1000 IU/10⁶ cells) and IL-4 (500 IU/10⁶ cells) (Miltenyi Biotec) for 5 days to generate immature MO-DCs. The immature status was confirmed by flow cytometry (LSR II, BD Biosciences, Le Pont au Claix, France) with a CD1a, CD14, CD80, CD86, CD83, CD40 and HLA-DR staining. To differentiate monocytes into macrophages, cells were plated in RPMI-1680 supplemented with M-CSF (ImmunoTools, Friesoythe, Germany, 100 ng/10⁶ cells) for 5 days. Macrophage phenotype was confirmed by flow cytometry with a CD68 staining.

Isolation of circulating blood DCs. Circulating dendritic cells were isolated from the blood of healthy donors using the Blood Dendritic Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). Purity was assessed by flow cytometry using an exclusion staining based on CD3, CD14 and CD20, and was >80%.

— RESULTS —

Uptake of antigen by immature MO-DCs. FVIII (20 or 50 nM) or recombinant human ADAMTS-13 (50 nM) conjugated to Dylight 633 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) were incubated with 20% normal serum, heat-inactivated serum or C3-depleted serum in RPMI-1640 at 37°C for 1 hr. When indicated, FVIII or Dylight 633-labeled ADAMTS-13 were incubated with C3 (250 µg/ml), factor B (50 µg/ml) and factor D (1 µg/ml) and/or C3b (250 µg/ml) in 20 mM HEPES 150 mM NaCl 10 mM MgCl₂ for 1 hr at 37°C. Samples were then incubated with 5-day-old immature MO-DCs (2.10⁵ cells/100 µl) for 2 hr at 4 or 37°C. Cells were washed with ice-cold phosphate buffer saline, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). In the case of FVIII, cells were permeabilized using 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) and stained with a FITC-conjugated monoclonal mouse anti-human FVIII IgG (77IP52H7, LFB, Les Ulis). Cells were analyzed by flow cytometry and data were computed using the BD FACS Diva software (6.1 version, BD Biosciences). The uptake was quantified as the difference in the median fluorescence intensities between 37°C and 4°C ($\Delta\text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}-4^{\circ}\text{C}}$) to exclude the signal generated by the binding of FVIII to the cells surface.

Stimulation 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 (25). FVIII (10 nM) was incubated with 20% normal serum, heat-inactivated serum or C3-depleted serum in RPMI-1640 supplemented with 2 mM CaCl₂ and 10 mM MgCl₂ for 1 hr at 37°C. Samples were then incubated with 5-day-old MO-DCs (10⁴ cells/condition) generated from healthy donors with the DRB1*0101 haplotype, for 2 hr at 37°C to allow FVIII uptake. MO-DCs were then washed, suspended in X-VIVO¹⁵ medium and co-cultured with 10⁵ 1G8-A2 CD4⁺ T cells for 18 hr at 37°C. Controls included T cells incubated alone, or incubated with MO-DCs in the presence of concanavalin A (2 µg/ml, Sigma-Diagnostics, MO, USA) or in the absence of FVIII. Levels of

— RESULTS —

interleukine-2 secreted in the supernatant by T cells were assessed using BD OptEIA™ mouse IL-2 ELISA set, following the manufacturer's recommendations (BD Biosciences).

Maturation of MO-DCs in the presence of complement. Normal serum, heat-inactivated serum or C3-depleted serum were incubated in RPMI-1640 for 1 hr at 37°C. Samples were then incubated with 5-day-old immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells/100 μ l) for 24 hr at 37°C. Cell surface was stained for CD40, CD83, CD86 and HLA-DR, and dead cells were discriminated with propidium iodide (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich). As a positive control, immature MO-DCs were incubated with lipopolysaccharide (LPS, 0.1 μ g/ml, Sigma-Aldrich). MFI was measured by flow cytometry.

Results

Complement modulates the immune response against FVIII in FVIII-deficient mice

We investigated whether the complement system was at play in the primary immune response to therapeutic FVIII. In a first approach, FVIII-deficient mice were treated with hCVF prior to each administration of FVIII, in order to transiently deplete the complement C3 molecule in the blood. Injection of hCVF was followed by a $\geq 90\%$ decrease of circulating C3 levels that lasted for at least 6 hr (Supplementary Fig. S1). The efficacy of hCVF-mediated C3 depletion was retained following repeated weekly administration to the same mice, indicating the absence of induction of a neutralizing immune response against hCVF (data not shown). FVIII-deficient mice treated with hCVF prior to FVIII infusion demonstrated significantly reduced levels of anti-FVIII IgG titers in the plasma, as compared to the PBS control group (65 ± 67 vs. 267 ± 245 $\mu\text{g/ml}$ mAb6-equivalent, respectively, mean \pm SD, $p < 0.0001$, Fig. 1A), as well as reduced inhibitory titers (66 ± 55 vs. 195 ± 97 BU/ml, respectively, $p < 0.0001$, Fig. 1B). Depletion of C3 using hCVF did not affect significantly the half-life of FVIII in FVIII-deficient mice (Supplementary Fig. S2). Of note, injection of FVIII into FVIII-deficient did not activate complement (data not shown). Mice treated with hCVF prior to injection of ADAMTS13, used as a control antigen, developed levels of anti-ADAMTS13 IgG similar to that developed by PBS-treated mice (Fig. 1C).

In a second approach, wild-type C57BL6 mice or complement factor H (CFH)-deficient mice were treated with FVIII. CFH-deficient mice represent a model of continuous activation of C3 and complement-associated inflammation due to the production of the C3a and C5a anaphylatoxins (26). They develop spontaneously at late age C3 glomerulopathy due to C3 activation fragments deposition in the kidneys. In these mice, the C3 levels are very low due to consumption and the C5a levels are high (26, 27). FVIII administration to CFH-deficient mice

— RESULTS —

resulted in a 3-fold increase in plasma levels of anti-FVIII IgG as compared to control mice (794±580 vs. 364±362 µg/ml, respectively, $p<0.005$, Fig. 1D). The effect was reverted when FVIII-treated CFH-deficient mice were injected with PMX53, a selective antagonist of the C5a receptor (317±211 µg/ml, $p<0.005$).

We also investigated whether the complement system was playing a role in the secondary immune response to FVIII. FVIII-deficient mice were injected once a week for four weeks with FVIII; 5 weeks after the last injection, mice were challenged with FVIII following depletion of complement with hCVF (Fig. 2A). Irrespective of treatment with hCVF, mice developed high anti-FVIII IgG titers: 6.5±2.8 versus 8.4±3.0 fold-increase in anti-FVIII IgG levels 7 days after challenge, and 26.4±8.0 versus 29.7±12.3 fold-increase 14 days after challenge (Fig. 2B and 2C).

Complement C3 participates in FVIII endocytosis by MO-DCs and blood DCs but not MO- Φ

The effect of complement on the early steps of the anti-FVIII immune response, in particular with respect to the capture of FVIII by APCs and ensuing presentation to CD4⁺ T lymphocytes, was investigated. We first assessed FVIII endocytosis by MO-DCs using flow cytometry (Fig. 3A). Incubation of FVIII with immature human MO-DCs in the presence of normal serum (NS) resulted in a 1.86±0.61-fold increase in FVIII uptake as compared to incubation in the presence of heat-inactivated serum (HIS) ($p<0.01$). Of note, incubation of immature MO-DCs did not significantly modify the expression of LRP (CD91) and CD206, two endocytic receptors for FVIII, or of DC-SIGN (CD209) (Supplementary Fig. S3). Incubation of FVIII with purified circulating blood DCs in the presence of NS yielded a 3-fold increase in FVIII uptake (Fig. 3B, $p<0.05$), while it had only a marginal effect on FVIII uptake in the case of MO- Φ (Fig. 3C).

— RESULTS —

Interestingly, the presence of complement did not significantly alter the endocytosis by MO-DCs of human recombinant ADAMTS-13, used as a control antigen (Fig. 3D).

Because complement C3 molecule is the central component of the complement cascade and because C3 depletion using hCVF drastically reduced the immune response to FVIII *in vivo*, we assessed the involvement of C3 in FVIII endocytosis by dendritic cells. The incubation of FVIII and MO-DCs with C3-depleted serum (Δ C3) lead to endocytosis levels similar to that observed in the case of HIS (Fig. 4A and B). Incubation of MO-DCs with HIS, NS or Δ C3 lead to similar degrees of cell surface expression of phosphatidylserine (PS), a ligand for activated FVIII at the surface of activated cells (28), as assessed using Annexin V (Supplementary Fig. S4A). The latter data rule out the possibility that differences in FVIII endocytosis are related to differences in induction of surface expression of PS (i.e., apoptosis) by MO-DCs.

To confirm that the reduced FVIII endocytosis observed upon C3 depletion results in a reduced presentation to CD4⁺ T lymphocytes, we assessed the activation of a CD4⁺ T-cell hybridoma (1G8-A2) by MO-DCs incubated with FVIII in the presence of the different serum preparations. Importantly, the use of the T-cell hybridoma allows working with FVIII concentrations closer to that reached in patients upon replacement therapy. The activation of 1G8-A2, assessed by the secretion of interleukine-2 (IL-2) (25), was maximal when FVIII was incubated with MO-DCs in the presence of NS (541±123 pg/ml of IL-2, Fig. 4C). In contrast, IL-2 secretion was significantly reduced when FVIII was co-incubated with MO-DCs in the presence of HIS or of Δ C3 serum (217±132 and 238±61 pg/ml of IL-2, respectively) as compared to NS ($p \leq 0.01$). There was no activation of 1G8-A2 when MO-DCs were incubated with the different serum preparations in the absence of FVIII (not shown).

Since the activation of complement leads to the cleavage of C3 and generation of the C3-derived bioactive fragment C3b, we evaluated the role of C3b in FVIII endocytosis by MO-DC in the

— RESULTS —

absence of serum proteins. We co-incubated FVIII with either purified C3b or with an artificially reconstituted C3 convertase containing C3, factor B and factor D. The reconstituted C3 convertase leads to the generation of C3b as confirmed by Western Blot (data not shown). Samples were then added to MO-DCs and FVIII endocytosis was monitored by flow cytometry (Fig. 4D). Co-incubation of immature MO-DCs with the C3 convertase or with C3b did not induce detectable apoptosis as assessed by the surface expression of PS (Supplementary Fig. S4B). FVIII endocytosis was significantly higher when FVIII was incubated in the presence of the whole C3 convertase (1.88 ± 0.28 -fold increase) or of C3b (1.78 ± 0.40 -fold increase) than when FVIII was incubated with factors B and D alone ($p \leq 0.05$). In contrast, incubation of ADAMTS-13 with the C3 convertase or with C3b did not result in increased endocytosis by MO-DCs (Fig. 4E).

Complement does not induce the maturation of MO-DCs

Using immature human MO-DCs as a model of APCs, we investigated whether complement activation induced the maturation of APCs *in vitro*. The maturation status of MO-DCs was assessed by flow cytometry on viable cells after 24 hr of incubation with HIS, NS or Δ C3 serum. NS, HIS or Δ C3 did not alter the phenotype of the MO-DCs, as shown by the stable expression of co-stimulatory CD40, CD80, CD86, and maturation molecules CD83, and of HLA-DR (Fig. 5). In contrast, LPS induced a marked activation of MO-DCs, with a high MFI for each molecule.

Discussion

We investigated a role for complement in the development of the immune response against therapeutic FVIII in a mouse model of severe hemophilia A. *In vivo*, a transient depletion of component C3 in naïve FVIII-deficient mice using hCVF resulted in a drastically reduced production of antibodies to exogenous FVIII. Our results are in agreement with other studies showing that deficiency in C3 in knock-out mice or transient reduction in C3 are associated with a significant reduction in T-cell dependent immune responses (20, 29). A certain degree of specificity for FVIII was observed as complement depletion failed to reduce the anti-ADAMTS-13 immune response. Human recombinant ADAMTS-13 was used as a control antigen for human recombinant FVIII, with the rationale that i) recombinant ADAMTS-13 is being developed as a drug for replacement therapy to be used in patients with congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP), which is reminiscent of the development of recombinant FVIII for hemophilia A patients; ii) ADAMTS-13, like FVIII, is endocytosed by MO-DCs in a CD206-dependent manner (30), and iii), as is seen in the case of FVIII, autoantibodies to endogenous ADAMTS-13 may develop leading to acquired TTP. Interestingly, and in contrast with studies reporting a role for complement C3 and complement receptors on the maintenance of memory immune responses (31, 32), complement C3 depletion failed to prevent upregulation of the anti-FVIII immune response in primed animals.

An important aspect of the complement activation is a release of pro-inflammatory C3a anaphylatoxin as well as the most potent anaphylatoxin C5a. Of note, the humanized form of CVF used in the present study lacks C5-convertase activity and hence does not generate the potent pro-inflammatory C5a anaphylatoxin (23, 24). In order to assess *in vivo* the potential role of inflammation-associated complement activation in the immune response, we studied the immune response to FVIII in CFH-deficient mice that are characterized by systemic uncontrolled complement activation and inflammation (26). In contrast to the administration of

— RESULTS —

hCVF, the absence of endogenous CFH promotes the generation of the C5-convertase and the continuous release of the pro-inflammatory C5a anaphylatoxin. C5a has been shown to mediate the recruitment of monocytes, and to induce their differentiation into inflammatory dendritic cells, and maturation both *in vitro* and *in vivo* (33). In agreement with our hypothesis, the administration of FVIII to CFH-deficient mice resulted in a drastic increase in anti-FVIII IgG titers as compared to wild-type mice, which was prevented upon co-administration of an antagonist of the C5aR to mice. To our knowledge, this is the first demonstration of a role of complement as a source of pro-inflammatory signals that adjuvant the anti-FVIII immune response in hemophilia A. Interestingly, administration of the C5aR antagonist to CFH-deficient mice reduced the intensity of the anti-FVIII immune response to the levels obtained in wild-type mice, but did not abrogate FVIII immunogenicity. Taken together, the data suggest that pro-inflammatory C5a may exacerbate the anti-FVIII immune response, but is dispensable in its initiation phase. Of note, links between the inflammatory status and the risk for patients with severe hemophilia A to develop an immune response to therapeutic FVIII have been proposed. While we recently observed that bleeding does not bring adjuvant signals to the anti-FVIII immune response in mice (34), polymorphisms in the genes encoding inflammation-related TNF- α and heme-oxygenase-1 (HO-1) have been associated with a higher incidence of FVIII inhibitors (35–37). Likewise, the control of inflammation in mice by induction of HO-1 expression has been shown to protect mice from the development of inhibitory anti-FVIII IgG (4).

Because complement C3 has been shown to play a role in antigen uptake by professional APCs and presentation to CD4⁺ and CD8⁺ T cells (13), we investigated the role of complement in the endocytosis and presentation of FVIII by human APCs *in vitro*. Inactivation of complement resulted in baseline levels of FVIII endocytosis by MO-DCs, as previously described (30, 38, 39). Similar levels of endocytosis were observed when the serum was immune-depleted for C3.

— RESULTS —

In contrast, the use of normal serum that allows activation of complement, lead to an increased uptake of FVIII in the case of both MO-DCs and circulating blood DCs. In line with these data, normal serum enhanced presentation of FVIII to a FVIII-specific T-cell hybridoma, as compared to serum lacking active C3. Furthermore, *in vitro* reconstitution of the C3-convertase, or addition of the C3-activation fragment C3b, in the absence of other complement molecules, was sufficient to restore close to maximal levels of FVIII endocytosis. While our results rule out a role for anaphylatoxin C5a on *in vitro* FVIII endocytosis, they do not exclude however a possible implication of C3a in modulating the uptake of FVIII. Indeed, C3a binding to its receptor C3aR has been shown to enhance dendritic cells capacity to internalize antigens and stimulate T cells (15). Importantly, complement activation or addition of C3b had no effect on ADAMTS-13 endocytosis by MO-DCs, further suggesting some degree of specificity of the observed phenomenon towards FVIII.

The effect of complement on endocytosis was dependent on the cell type (i.e., blood DCs as well as MO-DCs, but not MO- Φ) and on the antigen (i.e., FVIII, but not ADAMTS-13), suggesting the implication of particular endocytic pathway(s) in the presence of complement activation. The induction of the expression of endocytic receptors for FVIII at the surface of the cells upon activation of complement is not probable owing to the short incubation times used in our study. Accordingly, activation of complement on MO-DCs did not alter the surface expression of LRP (CD91) and CD206, which are known endocytic receptors for FVIII (38, 40, 41). Of note, the C3 convertase or addition of exogenous C3b did not induce the expression of phosphatidylserine at the surface of MO-DCs. Whether complement activation may induce the rapid surface expression of yet unidentified endocytic receptor for FVIII may not be excluded however.

We and others have reported earlier on the potential role of von Willebrand factor (VWF) in controlling the uptake of FVIII by MO-DCs (42, 43). The present work suggests that VWF does

— RESULTS —

not interfere with the role of complement on the immune response to FVIII. Indeed, endocytosis assays, that were performed in conditions where FVIII (50 nM) was in a molar excess over VWF (20% serum), yielded essentially similar results as T-cell activation assays, in which FVIII (10 nM) and VWF were incubated at a close to equimolar concentration. Furthermore, we did observe an effect of *in vivo* hCVF-mediated complement depletion on the onset of the anti-FVIII immune response, i.e., in a context where the exogenous FVIII injected to FVIII-deficient mice binds almost instantaneously to the endogenous VWF. Taken together, these data suggest that VWF does not prevent an adjuvant role of C3 on the anti-FVIII immune response and it remains to be investigated whether FVIII and VWF are co-endocytosed in a context where activation of the complement cascade occurs.

Taken together, our results highlight a new link between inflammation, complement and the anti-FVIII immune response. It is tempting to speculate that different elements of the complement system play complementary roles in the initiation of the anti-FVIII immune response. In such a model, the administered FVIII may bind to complement C3 breakdown fragments C3b, thus favoring its endocytosis by APCs and presentation to T cells, without affecting the maturation state of APCs. Conversely, C5a generation may provide the pro-inflammatory mediators that promote the maturation of FVIII-loaded APCs, and allow naïve FVIII-specific T cells activation. Obviously, part of the anti-FVIII immune response may not depend on C3b and on activation of the complement cascade, as is suggested by the facts that FVIII demonstrates substantial levels of endocytosis in the absence of complement activation, that FVIII-deficient mice still develop anti-FVIII IgG when treated with hCVF, and that blocking C5aR in CFH-deficient mice does not abrogate the immune response to exogenous FVIII, but resumes anti-FVIII IgG levels similar to that achieved in wild-type mice. The question remains of the nature of the signals responsible for complement C3 activation at time of FVIII administration. Whether baseline levels of FVIII activation pertain in hemophilia A

— RESULTS —

patients, possibly as a result of the spontaneous tick-over of C3, leading to permanent C3b generation (44), or related to infection or uncontrolled bleeding, remains to be established. Future work shall decipher the respective contribution of the different pathways of complement activation in the inhibitory anti-FVIII immune response, as well as whether temporary C3 depletion with hCVF is a promising therapeutic strategy to inhibit anti-FVIII antibodies development in hemophilia A patients.

Acknowledgements

This study 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. Recombinant ADAMTS-13, FVIII and FH-deficient mice were kind gifts from Baxter Innovations GmbH (Vienna, Austria), CSL-Behring (Marburg, Germany) and Professor Matthew Pickering (Imperial College London, UK), respectively. MI and IP were recipients of fellowships from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. LG was the recipient of a 'poste d'accueil INSERM' fellowship. We also would like to thank the Centre d'Imagerie Cellulaire et Cytométrie platform for their assistance.

Authors' contributions

Planned the work: JR, MI, VFB, LTR, SVK, SLD

Performed experiments: JR, MI, IP, SD, LG

Contributed essential material; CWV, DCF, JL

Analyzed the data: JR, MI, VFB, LTR, SLD

Wrote the report: JR, MI, LTR, SLD

JR and MI contributed equally to the work

None of the authors has conflict of interest

References

1. Ehrenforth S, et al. (1992) Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet Lond Engl* 339(8793):594–598.
2. Lacroix-Desmazes S, et al. (2008) Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 112(2):240–249.
3. Skupsky J, Zhang A-H, Su Y, Scott DW (2009) A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 114(21):4741–4748.
4. Dimitrov JD, et al. (2010) Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 115(13):2682–2685.
5. Kurnik K, Auerswald G, Kreuz W (2014) Inhibitors and prophylaxis in paediatric haemophilia patients: focus on the German experience. *Thromb Res* 134 Suppl 1:S27-32.
6. Amara U, et al. (2010) Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol Baltim Md 1950* 185(9):5628–5636.
7. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8(10):776–787.
8. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT (2015) Complement system part II: role in immunity. *Mol Innate Immun*:257.
9. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11(9):785–797.
10. Dunkelberger JR, Song W-C (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20(1):34–50.
11. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT (2015) Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Mol Innate Immun*:262.
12. Prodinger WM (1999) Complement receptor type two (CR2,CR1): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping. *Immunol Res* 20(3):187–194.
13. Jacquier-Sarlin MR, Gabert FM, Villiers MB, Colomb MG (1995) Modulation of antigen processing and presentation by covalently linked complement C3b fragment. *Immunology* 84(1):164–170.
14. Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF (2002) Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* 8(4):373–378.
15. Li K, et al. (2008) Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor-mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation. *Blood* 112(13):5084–5094.
16. Peng Q, et al. (2008) Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood* 111(4):2452–2461.

— RESULTATS —

17. Strainic MG, et al. (2008) Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* 28(3):425–435.
18. Carter RH, Fearon DT (1992) CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256(5053):105–107.
19. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271(5247):348–350.
20. Hebell T, Ahearn JM, Fearon DT (1991) Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 254(5028):102–105.
21. Ballanti E, et al. (2013) Complement and autoimmunity. *Immunol Res* 56(2–3):477–491.
22. Woodruff TM, et al. (2006) Therapeutic activity of C5a receptor antagonists in a rat model of neurodegeneration. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 20(9):1407–1417.
23. Vogel C-W, Finnegan PW, Fritzinger DC (2014) Humanized cobra venom factor: structure, activity, and therapeutic efficacy in preclinical disease models. *Mol Immunol* 61(2):191–203.
24. Vogel C-W, Fritzinger DC (2010) Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* 56(7):1198–1222.
25. Delignat S, et al. (2014) Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 20(4):486–492.
26. Pickering MC, et al. (2002) Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat Genet* 31(4):424–428.
27. Alexander JJ, Chaves L, Chang A, Quigg RJ (2012) The C5a receptor has a key role in immune complex glomerulonephritis in complement factor H-deficient mice. *Kidney Int* 82(9):961–968.
28. Gilbert GE, Furie BC, Furie B (1990) Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 265(2):815–822.
29. Fischer MB, et al. (1996) Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol Baltim Md 1950* 157(2):549–556.
30. Sorvillo N, et al. (2012) The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. *Blood* 119(16):3828–3835.
31. Da Costa XJ, et al. (1999) Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22):12708–12712.

— RESULTATS —

32. Gonzalez SF, Jayasekera JP, Carroll MC (2008) Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus. *Vaccine* 26, Supplement 8:I86–I93.
33. Soruri A, et al. (2003) Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. *J Immunol Baltim Md 1950* 171(5):2631–2636.
34. Peyron I, et al. (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(1):e94-98.
35. Astermark J, et al. (2006) Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 108(12):3739–3745.
36. Pavlova A, et al. (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(12):2006–2015.
37. Repessé Y, 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(10):1650–1655.
38. Dasgupta S, et al. (2007) A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21):8965–8970.
39. Repessé Y, et al. (2012) Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 129(4):1172-1173-1175.
40. Navarrete A-M, et al. (2010) Endocytic receptor for pro-coagulant factor VIII: relevance to inhibitor formation. *Thromb Haemost* 104(6):1093–1098.
41. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG (1999) Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 274(53):37685–37692.
42. Dasgupta S, et al. (2007) VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* 109(2):610–612.
43. Herczenik E, et al. (2012) Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol* 129(2):501–509, 509–5.
44. Lachmann PJ, Halbwachs L (1975) The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin Exp Immunol* 21(1):109–114.

Legends to Figures

Figure 1. Complement modulates the primary immune response to therapeutic FVIII *in vivo*. Panels A and B. FVIII (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was injected intravenously to FVIII-deficient mice 6 hours after an intraperitoneal injection of hCVF (20 μg) or PBS, once a week for 4 weeks. At day 28, blood was collected. Anti-FVIII IgG titers in plasma were assessed by ELISA (panel A, expressed in arbitrary units (A.U.) using the monoclonal mouse anti-FVIII antibody mAb6 as a standard) and FVIII inhibitory titers by chromogenic assay (panel B, expressed in Bethesda units (BU) per milliliter). Results are representative of 3 independent experiments. Panel C. Wild-type C57Bl/6J mice were injected intraperitoneally with PBS (full circles) or hCVF (20 μg , empty circles), and 6 hours later, with ADAMTS-13 (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$). The treatment was performed once a week for 4 weeks. At day 28, blood was collected. Anti-ADAMTS-13 IgG were assessed in serum by ELISA. Results are expressed in optical densities measured at 492 nm (A.U.). Panel D. FVIII (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was injected intravenously to wild-type (WT, full circles) or CFH-deficient (CFH^{-/-}, empty squares) C57Bl/6 mice, once a week for 4 weeks. CFH-deficient mice received either PBS or the C5a receptor antagonist PMX53 (1 mg/kg by intraperitoneal route, full squares) every day, for 4 weeks. Anti-FVIII IgG titers in plasma at day 28 were assessed by ELISA. In all panels, horizontal bars represent medians, and statistical differences were assessed using the double-sided nonparametric Mann-Whitney test.

Figure 2. Complement depletion does not play a role in the secondary anti-FVIII immune response. Panel A. FVIII (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was injected intravenously to FVIII-deficient mice once a week for 4 weeks. Five weeks after the last injection, mice were injected intraperitoneally with PBS (full circles) or hCVF (20 μg , empty circles), and 6 hours later, challenged with FVIII (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$). Blood was collected 0, 7 and 14 days (week 9, 10 and 11 respectively) after the

— RESULTS —

challenge and anti-FVIII IgG titers in plasma were assessed by ELISA. Panels B and C. IgG titers are expressed in arbitrary units (A.U.), using the monoclonal mouse anti-FVIII antibody mAb6 as a standard (panel B), or as a fold-increase change compared to titers obtained at day 0 (panel C).

Figure 3. Complement enhances FVIII endocytosis by human professional antigen-presenting cells. FVIII (50 nM, panel A) or Dylight 633-conjugated ADAMTS-13 (50 nM, panel D) were incubated in 20% normal serum (NS) or in 20% heat-inactivated serum (HIS) for 1 hr at 37°C. Mixtures were added on 5-day-old immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in RPMI-1640, panels A and D), purified blood DCs (panel B) or 5-day-old MO- Φ (panel C) for 2 hr at 4°C or 37°C. MFI was measured by flow cytometry using a FITC-coupled anti-FVIII antibody in the case of FVIII, or directly in the case of labeled ADAMTS-13. MFI values measured at 4°C were subtracted from values measured at 37°C, in order to eliminate the signal due to the binding of FVIII to the cell surface. Results represent the fold-change of $\Delta\text{MFI}_{37^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}}$ measured for each condition versus $\Delta\text{MFI}_{37^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}}$ obtained in the presence of HIS. Graphs depict means \pm SD of at least 3 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided nonparametric Mann-Whitney test (ns: not significant).

Figure 4. Complement C3 enhances FVIII endocytosis by dendritic cells and presentation to CD4⁺ T cells. Panels A and B. FVIII (50 nM, panels A and B) was incubated for 1 hr at 37°C in 20% normal serum (NS), heat-inactivated serum (HIS) or C3-depleted serum (ΔC3). Mixtures were added on immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in RPMI-1640) for 2 hrs at 4°C or 37°C. FVIII was then detected with a FITC-coupled anti-FVIII antibody. MFI values measured at 4°C were subtracted from values measured at 37°C. Panel A depicts histograms from FVIII-

— RESULTS —

positive cells incubated with HIS (solid line), NS (bold line) and Δ C3 (dashed line). The grey histogram depicts the fluorescence of cells incubated alone. Panel B depicts the fold-change of Δ MFI_{37°C-4°C} measured for each condition versus Δ MFI_{37°C-4°C} obtained in the presence of HIS. Results are expressed as means \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments. Panel C. Dendritic cells were differentiated from monocytes of healthy donors with the HLA-DRB1*0101 haplotype. Five-day-old immature MO-DCs (10^4 cells in X-VIVO¹⁵) were incubated with 10 nM FVIII in the presence of 20% normal serum (NS), heat-inactivated serum (HIS) or C3-depleted serum (Δ C3) for 2 hr at 37°C. Cells were washed and incubated with a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted mouse CD4+ T-cell hybridoma for 18 hr at 37°C. Culture supernatants were collected and analyzed for IL-2 secretion. Results are expressed as means \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments. Panels D and E. FVIII (50 nM, panel D) or Dylight 633-conjugated ADAMTS-13 (50 nM, panel E) were incubated alone (Control), in the presence of factor B (FB, 50 μ g/ml) and factor D (FD, 1 μ g/ml) with or without C3 (250 μ g/ml), or in the presence of C3b (250 μ g/ml) for 1 hr at 37°C. Samples were then incubated with 5-day-old immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in X-VIVO¹⁵) for 2 hr at 4°C or 37°C. MFI was measured by flow cytometry using a FITC-coupled anti-FVIII antibody in the case of FVIII or directly in the case of labeled ADAMTS-13. MFI values measured at 4°C were subtracted from values measured at 37°C. Results represent the fold-change of Δ MFI_{37°C-4°C} measured for each condition versus Δ MFI_{37°C-4°C} measured with FVIII alone (Control). Results are expressed as means \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided nonparametric Mann-Whitney test (ns: non significant).

Figure 5. Complement does not induce the maturation of dendritic cells in the presence of FVIII *in vitro*. Five-day-old immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in RPMI-1640) were cultured with

— RESULTS —

FVIII (35 nM) and 10% normal serum (NS), heat-inactivated serum (HIS), C3-depleted serum (Δ C3), or with LPS (1 μ g/ml) at 37°C for 24 hr. The expression of different maturation markers was assessed as MFI by flow cytometry. Dead cells were excluded with a propidium iodide staining (5 μ g/ml). Graphs depict the MFI measured for CD40 (panel A), CD83 (panel B), CD80 (panel C), HLA-DR (panel D) and CD86 (panel E). Means \pm SD are from 7 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided nonparametric Mann-Whitney test (ns: non-significant).

Supplementary Figure S1. Efficacy of complement depletion by hCVF in FVIII-deficient mice. The time-course of C3 depletion by hCVF after infusion into FVIII-deficient mice was measured in the plasma 3, 5 and 24 hr after hCVF injection using an ELISA.

Supplementary Figure S2. Half-life of FVIII in FVIII-deficient mice upon complement depletion. FVIII-deficient mice were treated with PBS (full circles) or hCVF (20 μ g, grey circle) to deplete complement. Six hours later, mice were administered with FVIII (10 nM). Residual FVIII antigen was measured using ELISA at different time points following FVIII administration (n=4-6 mice per time point). Data are plotted as a percentage of the initial FVIII level (measured 5 minutes after administration) versus time and represent means \pm SEM. Experimental data were fitted with the one-phase exponential decay equation ($R^2 \geq 0.63$).

Supplementary Figure S3. Expression of endocytic receptors on MO-DCs incubated in normal serum. Five-day-old immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells resuspended in RPMI-1640) were incubated in 20% normal (NS) or heat-inactivated serum (HIS) for 1 hr at 37°C. The expression of LRP (CD91), MMR (CD206) and DC-SIGN (CD209) was analyzed by flow cytometry.

— RESULTS —

Results are means \pm SD of 4 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided nonparametric Mann-Whitney test (ns: not significant).

Supplementary Figure S4. Lack of apoptosis of MO-DCs incubated with the C3 convertase. Panel A. Five day-old immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in RPMI-1640) were incubated in 20% normal serum (NS), heat-inactivated serum (HIS) or C3-depleted serum (Δ C3) for 2 hr at 37°C. Panel B. MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in X-VIVO¹⁵) were incubated alone (Control), in the presence of factor B (FB, 50 μ g/ml) and factor D (FD, 1 μ g/ml) with or without C3 (250 μ g/ml), or in the presence of C3b (250 μ g/ml) for 2 hr at 37°C. Cells were stained for phosphatidylserine surface expression using APC-labeled annexin-V, following the manufacturer's recommendations.

Figure 1

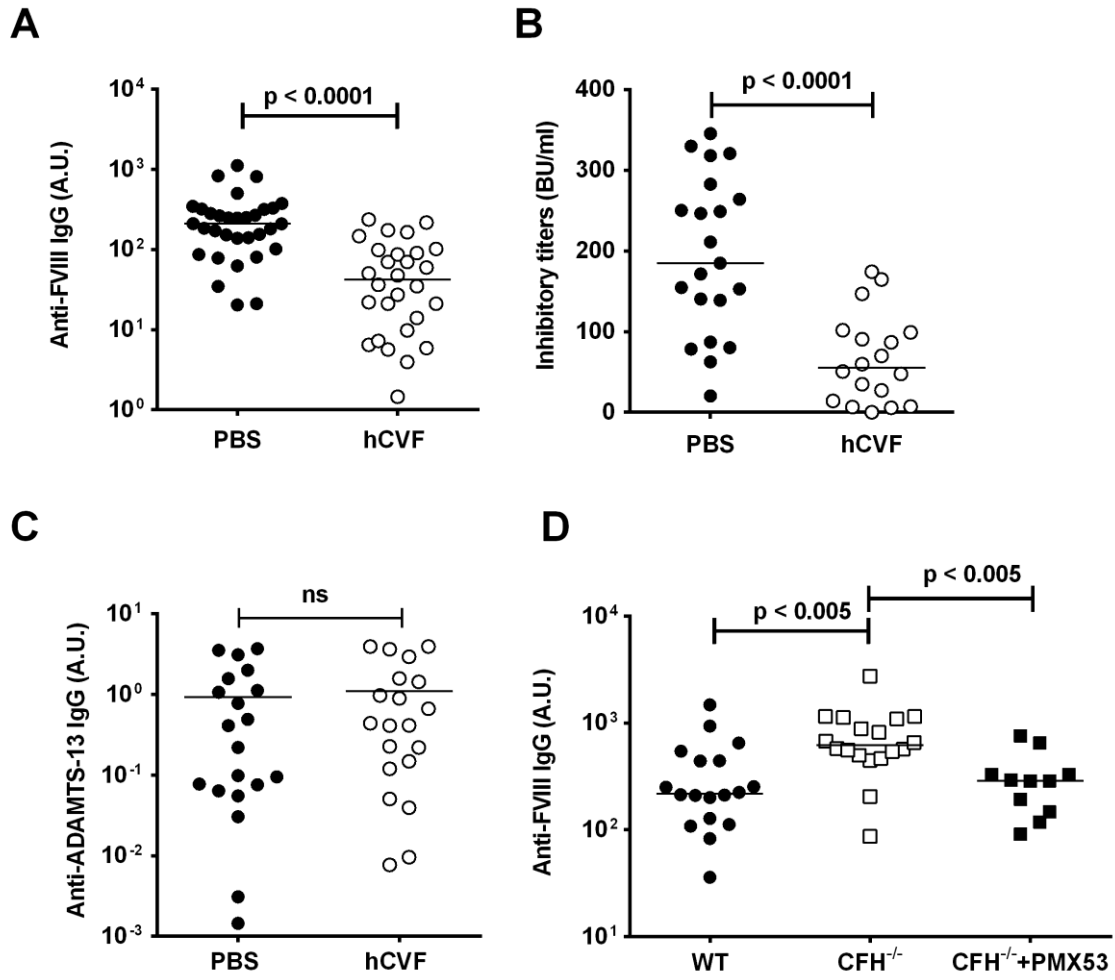


Figure 2

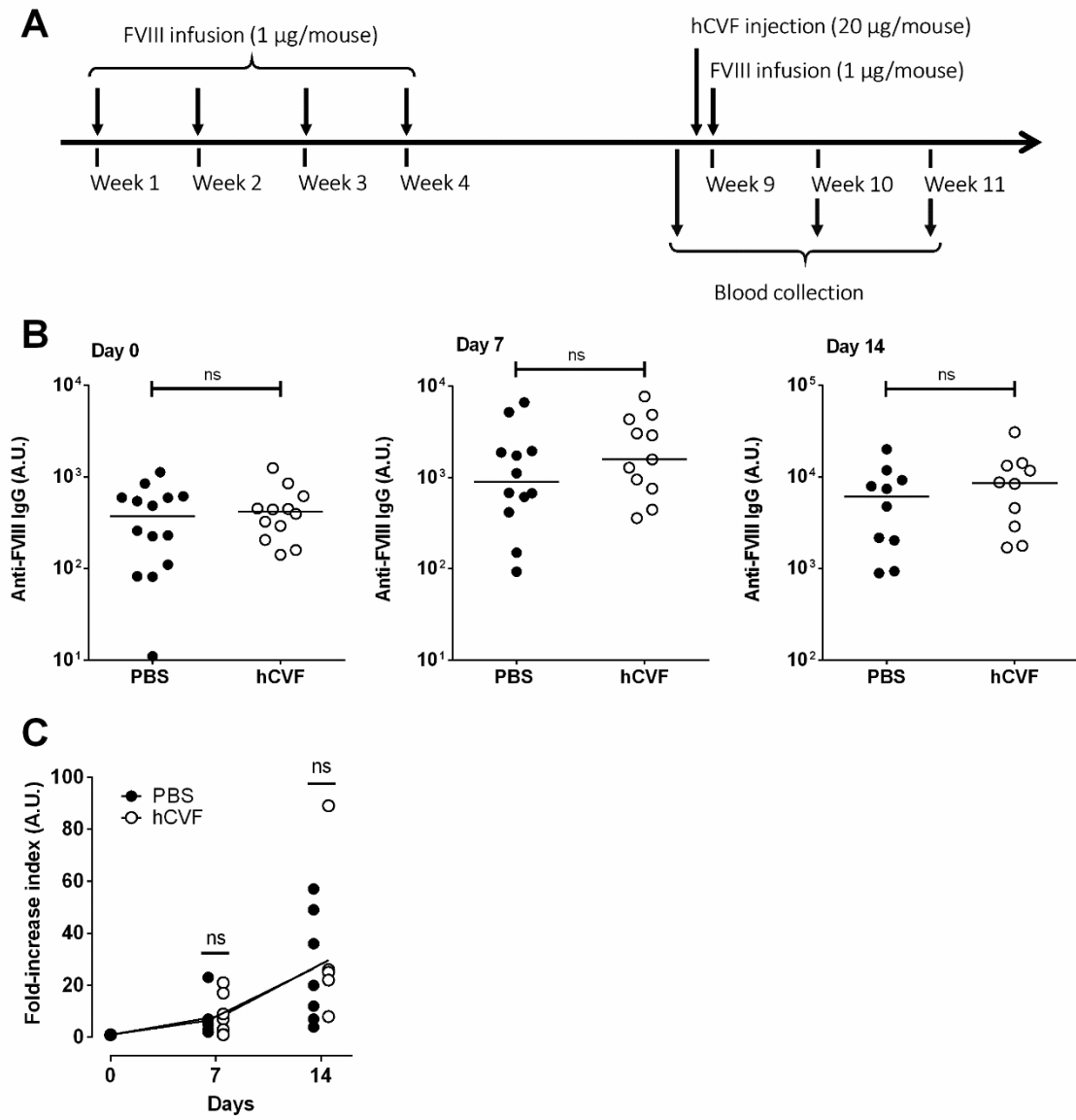


Figure 3

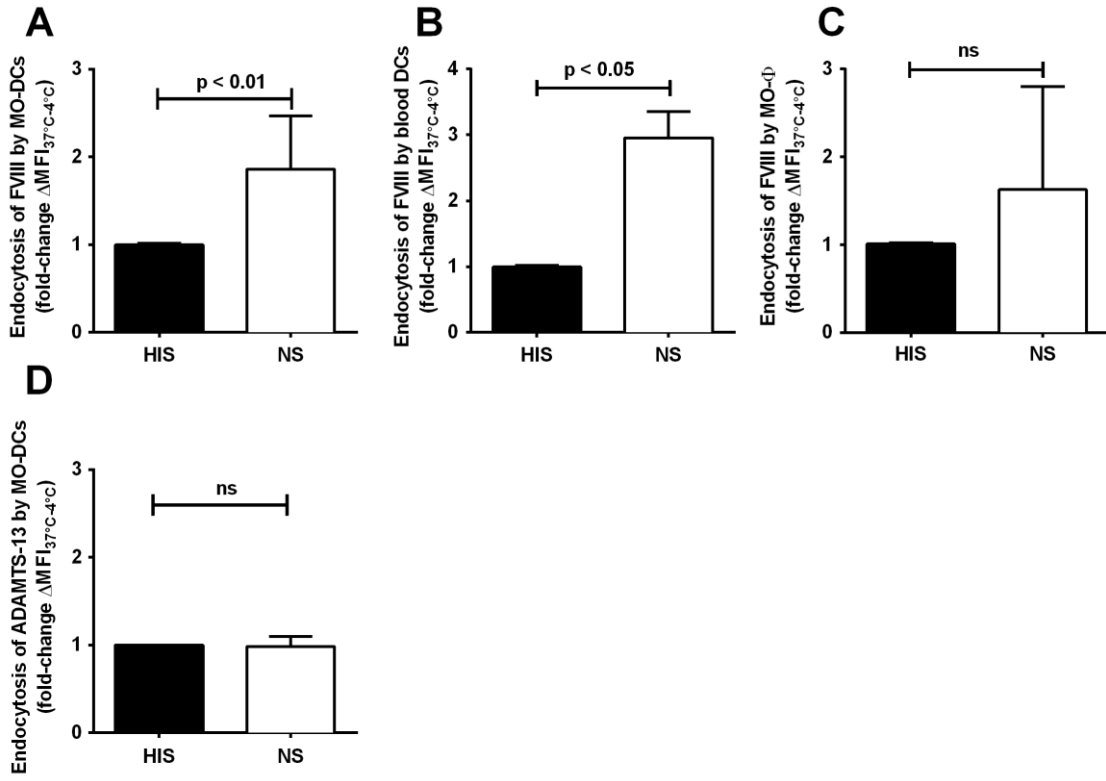


Figure 4

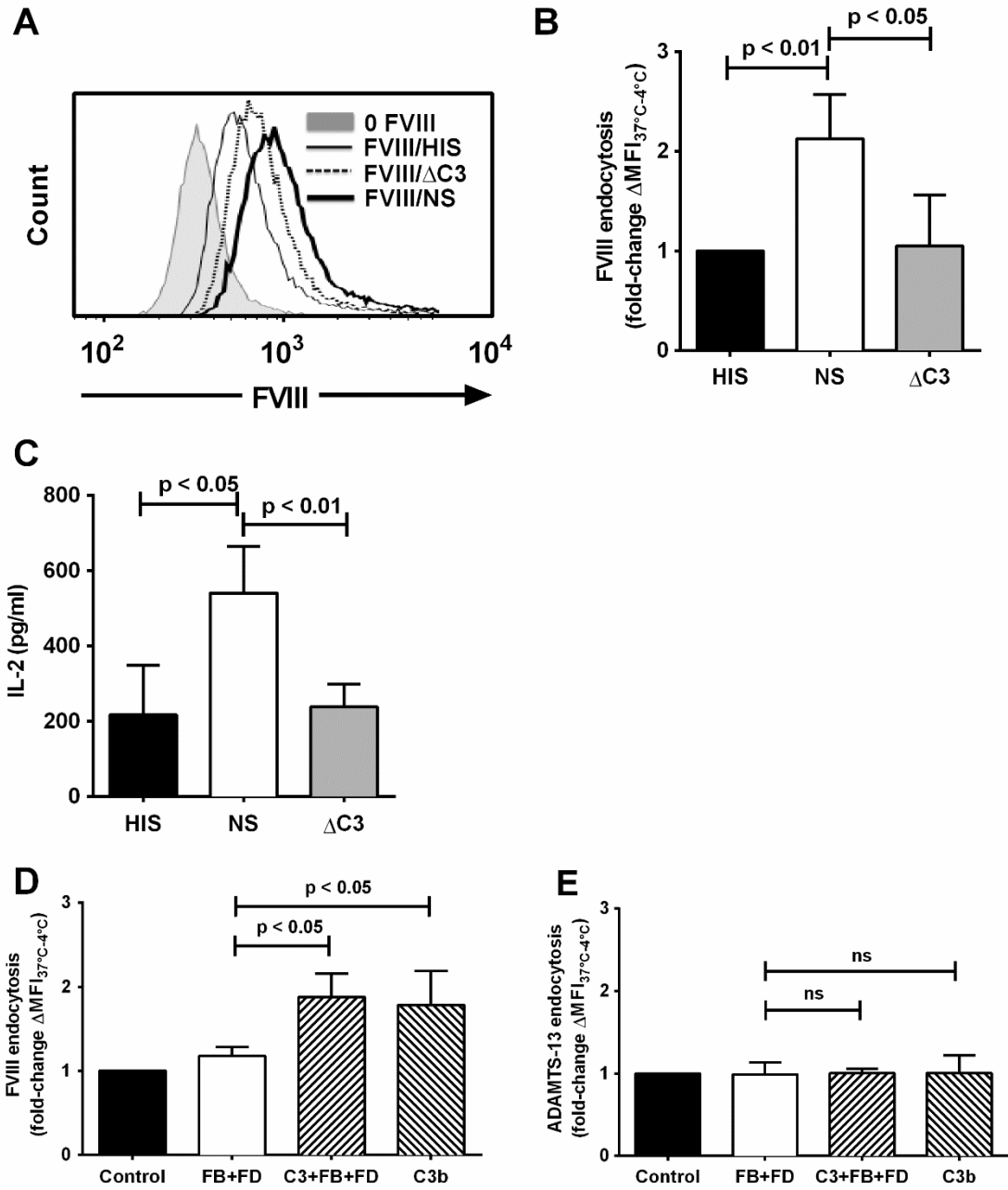
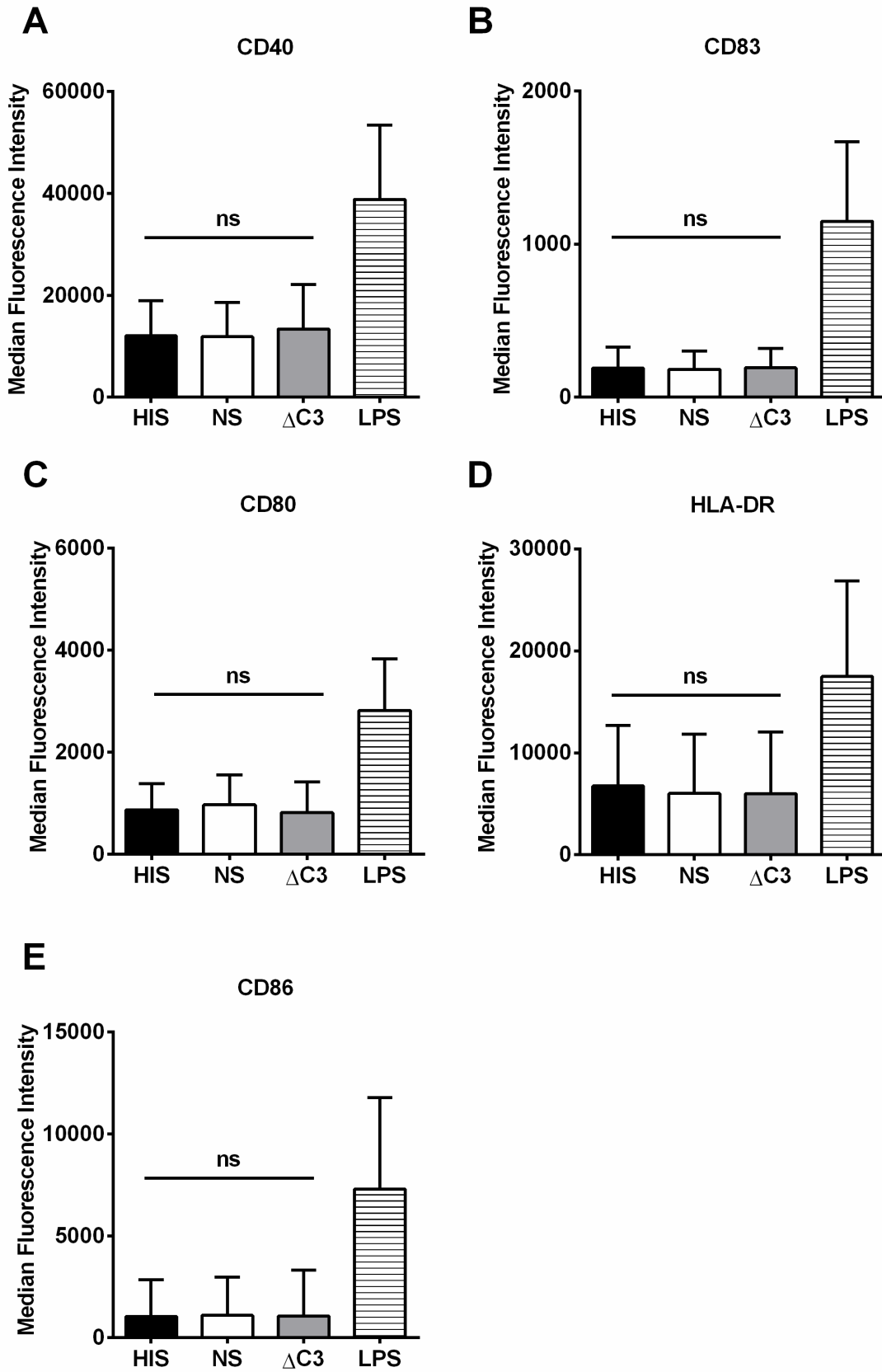
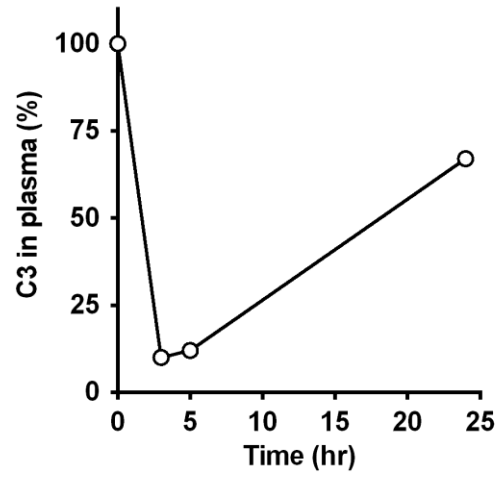


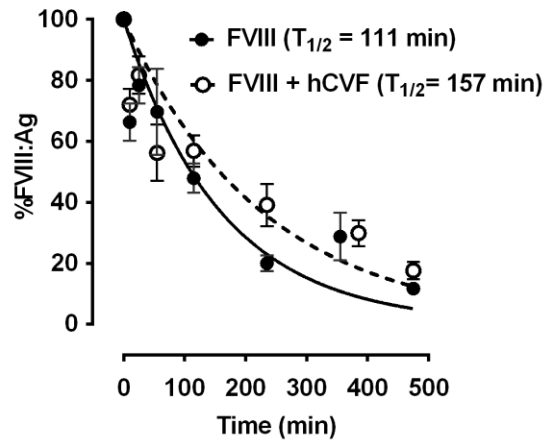
Figure 5



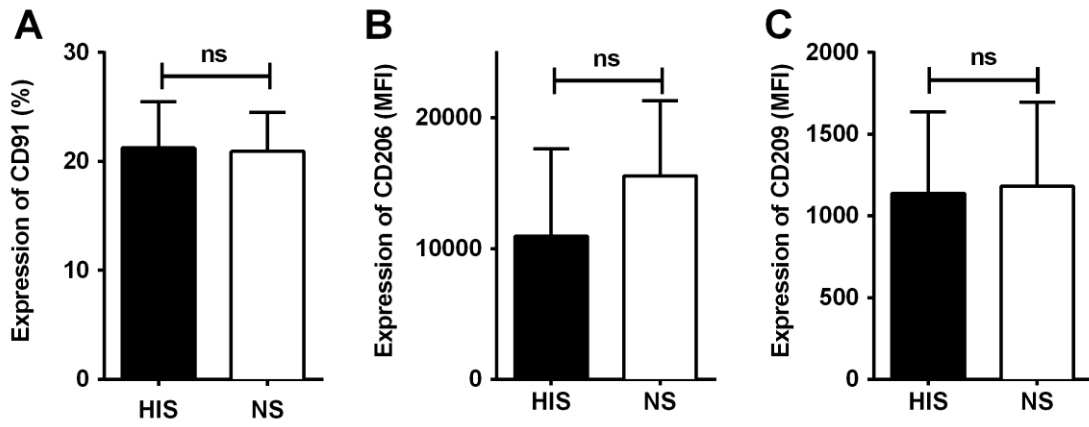
Supplementary Figure 1



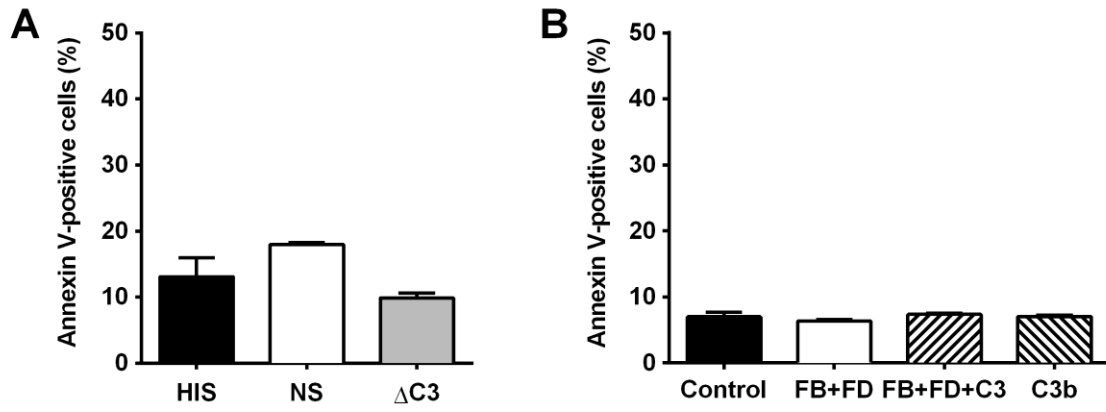
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



2. Le composant C1q du complément favorise l'internalisation et la présentation antigénique du FVIII par des cellules dendritiques *in vitro*

Après avoir déterminé que l'activation du complément et les fragments d'activation du complément étaient impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII, je me suis demandé si d'autres molécules du complément pouvaient également y participer. Je me suis intéressé en particulier au composant C1q du complément : le C1q, molécule initiatrice de la voie classique du complément, participe à la reconnaissance des agents pathogènes et des cellules apoptotiques et favorise leur internalisation par les phagocytes (Gaboriaud et al., 2012; Trouw et al., 2008). Outre ses fonctions d'activation du complément, le C1q présente aussi des propriétés immuno-régulatrices. Ainsi est-il également capable de réguler ou de potentialiser l'état d'activation des CPA. Partant de ces faits, j'ai étudié le rôle potentiel du C1q sur l'endocytose du FVIII par des CPA *in vitro*.

Dans un premier temps, par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), j'ai mis en évidence une interaction entre le FVIII et le C1q. Ensuite, en utilisant des MO-DCs comme modèle de CPA, j'ai montré que l'incubation des MO-DCs avec du FVIII et des doses croissantes de C1q augmentait la quantité de FVIII internalisée. Cette augmentation de l'endocytose du FVIII était corrélée à une augmentation de la présentation de peptides dérivés du FVIII à des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du FVIII.

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de trouver un nouveau ligand du FVIII, capable de potentialiser sa capture par des CPA *in vitro*. Le mécanisme moléculaire d'entrée du FVIII en présence du C1q reste à découvrir. Il n'est ainsi pas exclu que le complexe FVIII/C1q puisse interagir avec un récepteur du C1q exprimé à la surface des CPA. Enfin, le C1q est connu pour orienter les fonctions des cellules dendritiques. Il serait intéressant de déterminer s'il favorise l'induction de tolérance ou, au contraire, s'il potentialise la réponse immunitaire envers le FVIII thérapeutique.

Complement C1q promotes FVIII endocytosis and presentation by dendritic cells

Mathieu Ing^{1,2,3}, Julie Rayès^{1,2,3}, Sandrine Delignat^{1,2,3}, Srinivas V Kaveri^{1,2,3}, Lubka T Roumenina^{1,2,3}, Sébastien Lacroix-Desmazes^{1,2,3}

¹INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 1138, Paris, France; ³Université Paris Descartes, UMR S 1138, Paris, France

Corresponding author: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, 75006 France - Tel: +33 1 44 27 82 02 - Fax: +33 1 44 27 81 94; Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count: Text: 1023; Figures: 1; Supplementary figures: 0; References: 15

— RESULTATS —

The treatment of patients with severe hemophilia A using exogenous factor VIII (FVIII) is associated, in up to 30% of the cases, with the occurrence of inhibitory anti-FVIII antibodies.¹ The nature of the CD4⁺ T lymphocytes and B lymphocytes implicated in the effector phase of the anti-FVIII immune response, as well as the properties of the inhibitory anti-FVIII IgG have been well documented. In contrast, the mechanisms underlying the initial steps of the immune response remain poorly understood.² The endocytosis of FVIII by model professional antigen-presenting cells (APCs) has been thoroughly studied allowing identification of key residues of FVIII involved in the internalization process.³⁻⁵ However, all studies were performed in serum-free medium or in the presence of heat-inactivated serum, thus leaving aside a potential role played by the complement system, which has been shown to have important function both in innate and adaptive immune responses.

The complement molecule C1q constitutes one of the first recognition units of the complement system. Upon recognition of various ligands such as microbial surfaces, apoptotic cells or immunoglobulins,⁶ C1q induces complement activation by the classical pathway and enhances phagocytosis by the reticulo-endothelial system.⁷ C1q also participates in the onset of primary immune responses and modulates the phenotype of APCs.^{8,9} Based on these evidences, we assessed the role of C1q in the endocytosis of FVIII by human monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) and the subsequent presentation to FVIII-specific CD4⁺ T cells.

We first investigated the binding of C1q to FVIII by ELISA. Human recombinant FVIII (Helixate® NexGen, Marburg, Germany), as well as activated factor VII (FVIIa, NovoSeven®, Novo Nordisk, La Défense, France) and human serum albumin (HSA, Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies, Les Ulis, France), used as control antigens, were immobilized on ELISA plates (Maxisorp, Nunc, Roskild, Denmark) at 20 nM in 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.4, 1 hr at 37°C. After blocking with TBS-5% BSA, C1q was incubated for 1 hr at 37°C. Bound C1q was revealed using a sheep polyclonal anti-human C1q coupled to

— RESULTS —

horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, United Kingdom) and the ortho-phenylene diamine substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). C1q bound to immobilized FVIII in a dose-dependent manner, but not to FVIIa or HSA (Fig. 1A). Pre-incubation of C1q with soluble FVIII prevented in a dose-dependent manner the binding of C1q to immobilized FVIII (Fig. 1B), suggesting that C1q is able to interact with FVIII in solution.

In order to assess the involvement of C1q in FVIII capture by APCs, we derived 5 day-old immature dendritic cells from monocytes of healthy blood donors (Ethical committee permission obtained for the use of buffy bags) in the presence of GM-CSF (1000 IU/10⁶ cells) and IL-4 (500 IU/10⁶ cells) (Miltenyi Biotec) for 5 days. The immature status was confirmed by flow cytometry with a CD1a, CD14, CD80, CD86, CD83, CD40 and HLA-DR staining (not shown). Co-incubation of FVIII (50 nM) and MO-DCs (2.10⁵ cells/100 μ l) with C1q enhanced FVIII uptake from 100% in the absence of C1q to 337 \pm 174 % (mean \pm SD) at a 10-fold molar excess of C1q (Fig. 1C). We then determined whether the increase in FVIII endocytosis in the presence of C1q was correlated to an increased FVIII presentation to a HLA-DRB1*0101-restricted mouse CD4⁺ T-cell hybridoma specific for the T²⁰¹²-T²⁰²³ epitope of human FVIII (data not shown). MO-DCs (10⁴ cells/100 μ l) from healthy donors with the DRB1*0101 haplotype were incubated with FVIII (10 nM) and increasing concentrations of C1q, and co-cultured with the CD4⁺ T-cell hybridoma (10⁵ cells). Levels of secreted interleukin-2 (IL-2) (OptEIA™ mouse IL-2 ELISA, BD Biosciences) were used as marker of T-cell activation. In agreement with endocytosis data, IL-2 secretion increased from 126.4 \pm 62.7 pg/ml (mean \pm SD) in the absence of C1q to 462.4 \pm 80.1 pg/ml with a 10-fold molar excess of C1q (Fig. 1D). Of note, T cells incubated with MO-DCs and C1q alone did not secrete detectable levels of IL-2.

Taken together, the data give novel insights on the capture of FVIII by APCs. We have previously found that complement activation and complement C3-derived fragment potentiate FVIII internalization by dendritic cells (Rayes et al., *in preparation*). Our results identify C1q

— RESULTS —

as a novel binding partner for FVIII that may constitute a new pathway for FVIII endocytosis. The molecular mechanisms underlying the uptake of FVIII by dendritic cells remain to be deciphered. We found that, *in vitro*, C1q interacts with immobilized FVIII as well as FVIII in fluid phase. APCs express several receptors for C1q (C1qR),¹⁰ that are implicated in pathogen uptake. One may hypothesize that C1q binds FVIII in the blood facilitating FVIII uptake by C1q receptors. Alternatively, C1q may interact with FVIII that is already bound at the cell surface, thereby facilitating the internalization process in a C1qR-dependent or independent manner. The role of C1q on FVIII uptake is in accordance with previous studies demonstrating that the opsonisation of apoptotic cells by C1q targets them to APCs for clearance.¹¹ In our case, however, the internalization of FVIII did not lead to the mere catabolism of FVIII but to its processing and presentation of FVIII-derived peptides on MHCII molecules to CD4⁺ T cells. Recent evidence suggest the capacity of dendritic cells from previously treated patients with severe hemophilia and without inhibitors to activate intracellular indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)-dependent regulatory mechanisms;¹² in contrast, dendritic cells from inhibitor-positive patients are not able to induce the IDO1 signaling pathway. The triggering of a regulatory phenotype of dendritic cells by C1q has been investigated in several studies with opposite conclusions. Teh et al. reported reduced pro-inflammatory cytokine production, increased interleukin-10 release and decreased number of Th1 and Th17 T cells by C1q-stimulated human monocyte-derived dendritic cells.¹³ Conversely, immobilized C1q was found to activate dendritic cells in a lipopolysaccharide-like manner and to induce pro-Th1 interferon- γ production by co-cultured allogeneic CD4⁺ T cells.¹⁴ Besides, dendritic cells from C1q-deficient mice present with impaired capacity to sustain the polarization of T cells towards the Th1 phenotype as compared to wild-type mice.¹⁵ C1q thus displays a dual role that can dampen or enhance immune responses. Additional work is required to delineate whether the

— **RESULTATS** —

involvement of C1q in FVIII uptake favors tolerance to FVIII or plays an adjuvant role on the anti-FVIII immune response.

References

1. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Güngör T, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet Lond Engl.* 1992 Mar 7;339(8793):594–8.
2. 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 Jul 15;112(2):240–9.
3. Dasgupta S, Navarrete A-M, Bayry J, Delignat S, Wootla B, André S, 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 May 22;104(21):8965–70.
4. Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, Kaijen P, van den Biggelaar M, Meijer AB, et al. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Feb;129(2):501–9, 509-5.
5. Wroblewska A, van Haren SD, Herczenik E, Kaijen P, Ruminska A, Jin S-Y, et al. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood.* 2012 May 31;119(22):5294–300.
6. Gaboriaud C, Frachet P, Thielens N, Arlaud G. The human C1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands. *Mol Innate Immun.* 2012;2:92.
7. Trouw LA, Blom AM, Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol.* 2008 Mar;45(5):1199–207.
8. Baruah P, Dumitriu IE, Malik TH, Cook HT, Dyson J, Scott D, et al. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. *Blood.* 2009 Apr 9;113(15):3485–93.
9. Montfoort N van, Jong JMH de, Schuurhuis DH, Voort EIH van der, Camps MGM, Huizinga TWJ, et al. A Novel Role of Complement Factor C1q in Augmenting the Presentation of Antigen Captured in Immune Complexes to CD8+ T Lymphocytes. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7581–6.
10. Vegh Z, Kew RR, Gruber BL, Ghebrehiwet B. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. *Mol Immunol.* 2006 Mar;43(9):1402–7.
11. Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, et al. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Sep 1;173(5):3044–50.
12. Matino D, Gargaro M, Santagostino E, Di Minno MND, Castaman G, Morfini M, et al. IDO1 suppresses inhibitor development in hemophilia A treated with factor VIII. *J Clin Invest.* 2015 Oct 1;125(10):3766–81.

— **RESULTATS** —

13. Teh BK, Yeo JG, Chern LM, Lu J. C1q regulation of dendritic cell development from monocytes with distinct cytokine production and T cell stimulation. *Mol Immunol.* 2011 May;48(9–10):1128–38.
14. Csomor E, Bajtay Z, Sándor N, Kristóf K, Arlaud GJ, Thiel S, et al. Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Mol Immunol.* 2007 Jul;44(13):3389–97.
15. Cutler AJ, Botto M, van Essen D, Rivi R, Davies KA, Gray D, et al. T cell-dependent immune response in C1q-deficient mice: defective interferon gamma production by antigen-specific T cells. *J Exp Med.* 1998 Jun 1;187(11):1789–97.

Acknowledgements

This study 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 a grant from Pfizer (Contract #141559A20). MI was the recipient of a fellowship from Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Authors' contributions

Planned the work: MI, JR, SVK, SLD

Performed experiments: MI, JR, SD

Analyzed the data: MI, JR, LTR, SLD

Wrote the report: MI, JR, SLD

None of the authors has conflict of interest

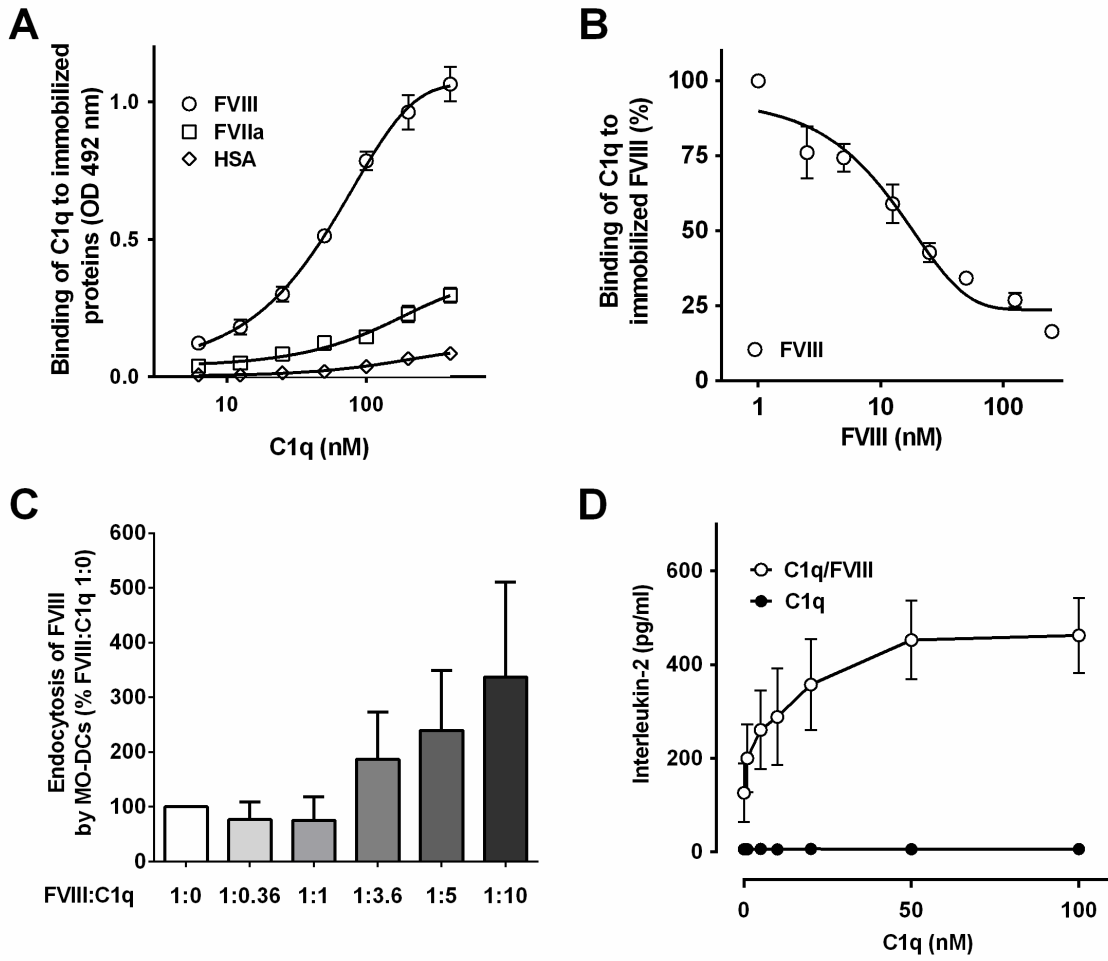
Legends

Figure 1. Complement C1q interacts with FVIII and enhances its uptake by dendritic cells. Panel A. C1q was incubated with immobilized FVIII, FVIIa and HSA (20 nM) for 1 hr at 37°C. Bound C1q was revealed with polyclonal anti-C1q HRP antibody and substrate. Panel B. C1q (25 nM) was pre-incubated with varying concentrations of FVIII for 1 hr at 37°C, prior to incubation on FVIII-coated ELISA plates. The residual C1q binding was assessed using polyclonal anti-C1q HRP antibody and substrate. Data depict means±SD, expressed in arbitrary units of optical density measured at 492 nm, and are representative of at least 3 independent experiments. Panel C. FVIII (50 nM) was incubated for 1 hr at 37°C with increasing molar ratio of C1q. Mixtures were added on immature MO-DCs ($2 \cdot 10^5$ cells in X-VIVO¹⁵) for 2 hrs at 4°C or 37°C. FVIII was detected after fixing with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), permeabilization using 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) and staining with a FITC-conjugated monoclonal mouse anti-human FVIII IgG (77IP52H7, LFB, Les Ulis). Cells were analyzed by flow cytometry and data were computed using the BD FACS Diva software (6.1 version, BD Biosciences). MFI values measured at 4°C were subtracted from values measured at 37°C. Results are depicted as percentages of median fluorescence intensities (MFI), whereby 100% corresponds to the MFI obtained in the absence of C1q. Results are expressed as means±SD and are representative of at least 3 independent experiments. Panel D. Five-day-old immature dendritic cells (10^4 cells in 100 μ l X-VIVO¹⁵) differentiated from monocytes of healthy donors with the HLA-DRB1*0101 haplotype were incubated in the presence of increasing concentrations of C1q with or without 10 nM of FVIII for 2 hr at 37°C. After washing, MO-DCS were then incubated with a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted mouse CD4+ T-cell hybridoma (10^5 cells) for 18 hr at 37°C. Culture supernatants were collected and analyzed for IL-2 secretion. Results are expressed as means±SD and are representative of at least 3 independent experiments. Controls included T cells incubated alone, or incubated with MO-

— RESULTATS —

DCs in the presence of concanavalin A (2 µg/ml, Sigma-Diagnostics, MO, USA) or in the absence of FVIII (data not shown).

Figure 1



3. Les domaines C1 et C2 du facteur VIII sont importants pour son endocytose par les cellules dendritiques

Les mécanismes d'entrée du FVIII dans les CPA font à l'heure actuelle l'objet de nombreuses investigations. Si des études se sont attachées à identifier les récepteurs potentiels impliqués dans la reconnaissance du FVIII et son internalisation (Dasgupta et al., 2007a; Navarrete et al., 2010), des études en parallèle se sont intéressées aux domaines du FVIII et aux acides aminés engagés dans l'interaction avec les cellules. Ainsi, Herczenik et al. ont-ils récemment montré le rôle important du domaine C1 du FVIII pour son internalisation par des cellules dendritiques *in vitro* et pour son immunogénicité *in vivo* (Herczenik et al., 2012a). Par la suite, Wroblewska et al. ont déterminé par mutagenèse dirigée les acides aminés du domaine C1 participant à cette interaction (Wroblewska et al., 2012). Le domaine C2 du FVIII présente de fortes homologies de structure avec le domaine C1 ainsi des propriétés biochimiques similaires. Dans cette étude, je me suis intéressé au potentiel rôle du domaine C2 dans la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII, et plus spécifiquement dans l'endocytose du FVIII par les CPA.

Le masquage du domaine C2 du FVIII à l'aide d'un anticorps monoclonal (BO2C11) réduisait drastiquement l'endocytose du FVIII par des MO-DCs et sa présentation antigénique *in vitro*. La réduction était spécifique de l'épitope du domaine C2 ciblé par BO2C11. *In vivo*, l'administration de FVIII complexé à BO2C11 chez des souris déficientes en FVIII diminuait fortement le taux d'anticorps inhibiteurs anti-FVIII. Par mutagenèse dirigée, j'ai généré des FVIII mutés dans le domaine C2 et incapables de se lier à BO2C11. Mes résultats montrent *in vitro* que l'arginine en position 2215 est impliquée dans l'internalisation du FVIII par les cellules dendritiques. Ces données confortent le rôle du domaine C2 dans l'endocytose du FVIII. Au vu des résultats publiés, les résultats laissent imaginer un effet synergique entre les domaines C1 et C2 pour la reconnaissance du FVIII par les CPA *in vitro*. Toutefois l'introduction des mutations dans le domaine C2, mais également de manière surprenante dans le domaine C1, n'altérerait pas l'immunogénicité du FVIII chez les souris déficientes en FVIII. Etant donné que la fixation de BO2C11 au FVIII bloque sa capacité à interagir avec le vWF, sa protéine chaperonne en circulation, j'ai cherché à savoir si la réduction de la réponse immunitaire anti-FVIII par BO2C11 était liée à une clairance accrue du FVIII. *In vivo*, l'immunogénicité du FVIII en présence de BO2C11 n'était pas modifiée par sa capacité à lier ou non le vWF. Enfin, en testant les mutants du domaine C2 et du domaine C1 du FVIII chez des souris déficientes à la fois en FVIII et en vWF, j'ai observé une diminution significative de

— RESULTATS —

la réponse immunitaire dirigée contre le mutant du domaine C1. Toutefois, cela n'était pas le cas avec le mutant du domaine C2.

Mes résultats montrent donc que le domaine C2 du FVIII, à l'instar du domaine C1, est impliqué dans l'endocytose du FVIII menant à son apprêtement et sa présentation aux lymphocytes T CD4⁺. La contribution respective des deux domaines dans la capture du FVIII par les CPA reste encore à élucider : ont-ils un rôle redondant ? Synergique ? Modifier certains résidus basiques du domaine C2 a permis d'altérer l'endocytose du FVIII *in vitro* mais n'a modifié en rien son immunogénicité *in vivo*. Il est possible que des expériences supplémentaires de mutagenèse dirigée, ciblant notamment des résidus hydrophobes, apportent plus de précision quant à l'implication du domaine C2 dans la capture du FVIII *in vivo*. Alors qu'un rôle protecteur du vWF exogène dans la réponse immunitaire anti-FVIII a été proposé, mes résultats montrent que la présence de vWF endogène ne modifie en rien l'immunogénicité du FVIII exogène *in vivo*. Enfin, la présence de vWF *in vivo* masque l'effet protecteur des mutations des domaines C.

Une partie des résultats présentés dans l'étude actuelle a fait l'objet d'une précédente soutenance de thèse (Bagirath Gangadharan. Structural and functional aspects of factor VIII in the initiation of the anti-factor VIII immune response. Immunology. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. English.).

— RESULTATS —

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: 249

Words in text: 4261

Number of B&W figures: 5

Number of color figure: 0

Number of supplementary figures: 2

Number of references: 47

*** 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 VWF, thus potentially biasing FVIII immunogenicity by perturbing its half-life. Interestingly, a FVIII^{Y1680C} mutant, that is unable to 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 VWF. 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.

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 immune responses.

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 remains unclear. Recently, Herczenik *et al.* (10) demonstrated that KM33, a mouse 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 transiently reduced immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A (11). Together, these results point to the significance of membrane-binding residues

— RESULTS —

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 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.

Material and Methods

Antibodies. The monoclonal mouse anti-FVIII (mAb6), the human anti-A2 (BO2BII) and anti-C2 (BO2C11) domain antibodies were a kind gift from Drs JM Saint-Remy and M Jacquemin, KUL, Leuven, Belgium). The monoclonal mouse anti-C1 (KM33) was a gift from Dr J Voorberg (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands). The anti-A2 domain (GMA-8015) and anti-C2 domain (ESH8) mouse monoclonal antibodies were purchased from Green Mountain Antibodies (Burlington, VT, USA) and Sekisui Diagnostics (Kings Hill, United Kingdom), respectively. Biotin-labelled 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 generated by papain or pepsin digestion following manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Production and purification of wild-type and mutated FVIII. cDNAs encoding human B domain-deleted FVIII, containing a 14-amino acid segment, SFSQNPPVLKRHQR, in place of the B domain in a mammalian expression plasmid designated ReNeo with a geneticin resistance has been described previously (15). Wild-type FVIII ReNeo was used as a template to produce cDNAs encoding R2215A, R2220A, R2215A-R2220A, R2090A-K2092A-F2093A and Y1680C FVIII by splicing-by-overlap extension mutagenesis as described in Supplemental methods. Presence of the mutations was confirmed by standard sequencing analysis. Stable expression, purification, and characterization of wild-type and mutated FVIII from baby hamster kidney-derived cells 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 5000-9000 IU/mg. In parallel, the ability of the different FVIII molecules to generate activated factor X was assessed in a chromogenic assay, following the manufacturer's recommendations (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). The reaction was stopped at 10 min using 20% acetic acid and the absorbance measured at 405 nm.

— RESULTS —

Validation of wild-type and mutated FVIII. 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 biotinylated GMA-8015 (1 µg/ml), followed by streptavidin coupled to horseradish peroxidase (R&D systems, Lille, France) 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 harvested 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 MO-DCs. After 5 days, MoDCs differentiation efficacy was assessed by flow cytometry using a CD14 staining (M5E2 clone, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). 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 knock-out exon 16 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.

In vitro FVIII uptake by immature MoDCs and BMDCs. 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 days-old immature MoDCs/or 9 days-old immature BMDCs ($0.2 \cdot 10^6$ cells/100 µl) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium for 30 min at 37°C or 4°C. Cells

— RESULTS —

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 stained using biotinylated GMA-8015 (2 µg/ml), followed by streptavidin-PE (1 µg/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 ($\Delta\text{MFI}_{37^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}}$) to exclude the signal generated by the binding of FVIII to the cells 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/BMDCs and co-cultured with 100,000 T cells in X-VIVO 15 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 µg/ml, Sigma-Aldrich) or in the absence of FVIII. Levels of interleukine-2 secreted in the supernatant by T cells were assessed using BD OptEIA™ mouse IL-2 ELISA set, following the manufacturer's recommendations (BD Biosciences).

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 mice were from Pr. H.H. Kazazian (University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA) and Dr. C Denis (INSERM U770, Le Kremlin-Bicêtre, France), respectively. Mice were injected intravenously once a week for 4 weeks with either i) full length FVIII (0.2 µg) 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^{C1} or FVIII^{R2215-20A} (0.5 or 1 µg). 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).

— RESULTS —

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, mouse plasma was incubated for 1 hr at 37°C. Bound IgG were revealed using a horseradish peroxidase-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Anaheim, CA, USA) and the OPD. Absorbance was read at 492 nm. The monoclonal mouse anti-human FVIII IgG mAb6 was used as a standard. Inhibitory titers were measured 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-knock out exon 16 mice were injected intravenously with wild-type and mutated FVIII (10 nM in 100 µl). Blood was collected in 0.129 M sodium citrate at different time points after FVIII administration. FVIII levels in mouse plasma was determined in a chromogenic assay. Data are plotted as a percentage of the initial FVIII level, measured 5 minutes after FVIII infusion, versus time (mean±SEM). 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 (PS) membrane surfaces (18). 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. 1A). 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. 1B), 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 R2215 or R2220 did not alter binding to VWF (Fig. 2B), but resulted in diminished

— RESULTS —

binding to BO2C11 (Fig. 2C). Substitution at R2220 resulted in a near complete inhibition of FVIII interaction with BO2C11 (Fig. 2C). 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 (mouse 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), but preserved binding to VWF, 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 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 of C1 (data not shown). 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 a strong antibody response

— RESULTS —

not only to FVIII^{HSQ} but also to FVIII^{C1} (Fig 5A). 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 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 *in vitro* endocytosis 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. 2) when FVIII^{Y1680C} was pre-incubated with BO2C11 Fab fragments. In contrast,

— RESULTS —

the immunogenicity of FVIII^{R2215-20A} in double FVIII/VWF-deficient mice (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).

Discussion

The endocytosis of an antigen by APCs is not sufficient for the induction of a naive CD4⁺ T-cell-dependent immune response. It is however a pre-requisite to its presentation to antigen-specific CD4⁺ T cells. Over the years, several receptors have been identified for FVIII (5, 6, 19, 20) that have mostly been implicated in FVIII catabolism (8, 21). 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 PS and to platelets (22, 23). 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 (24) and is a major membrane binding motif containing several basic residues (25, 26), 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*. 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 competitor for PS binding, does not inhibit FVIII endocytosis by MoDCs (10), we do not favor PS-dependent uptake mechanisms. Rather,

— RESULTS —

we speculate that FVIII uptake involves charged interactions with a putative highly negatively-charged receptor or a potential role for coreceptors such as heparin sulfate proteoglycans. The respective contribution, either redundant, additive or synergic, 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. Of note, ESH8 increased FVIII uptake process. However, ESH8 was previously shown to inhibit thrombin cleavage of FVIII bound to vWF (27). We speculate that our observation may also be related to a conformation change that orients FVIII to aid its uptake process once bound to ESH8.

While co-incubation of FVIII prior to injection to FVIII-deficient mice, with BO2C11 or with KM33 (10) reduces or delays 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 non-specific 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 (28), and the triple FVIII^{C1} mutant retains its ability to bind 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 VWF binding and demonstrates reduced endocytosis *in vitro*, was as immunogenic as FVIII^{HSQ} in mice lacking VWF. Because the C1 domain has repeatedly been identified as the major membrane interactive motif, with the C2 domain providing additional membrane-binding affinity (22, 25, 26), 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

— RESULTS —

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 (29). Unexpectedly, the present results indicate that the presence of endogenous VWF, or the capacity of exogenous FVIII to bind to 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 is suggested by a suspected reduced prevalence of FVIII inhibitors in hemophilia A patients treated with exogenous VWF-containing FVIII concentrates as compared to patients receiving recombinant or highly purified products (30–32). Controversial results have however been obtained upon studying large retrospective and prospective patient cohorts (33, 34). 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 (35–38), although contradictory results have occasionally been generated (39). *In vitro*, a protective role for VWF on FVIII endocytosis by human MoDCs was clearly shown (10, 40). Even though FVIII internalization is markedly reduced, recent work by Sorvillo et al. demonstrated that there is a significant presentation of FVIII-processed peptides (41). Likewise, under shear stress, VWF fails to block FVIII internalization by macrophages, and both VWF and FVIII co-localize within the same cells (42). This is in agreement with the observation that exogenous FVIII and exogenous VWF were indirectly suggested to be co-detected in splenic macrophages after injection to double FVIII/VWF-deficient mice (43). The internalization of FVIII and VWF by macrophages under shear was however inhibited by the LRP antagonist Receptor Associated Protein (RAP), suggesting that this process is more relevant to FVIII catabolism than immunogenicity. Taken together, the data suggest that the endogenous VWF does not regulate the immunogenicity of exogenously administered FVIII. 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

— RESULTS —

circulation, as shown in patients with type 3 von Willebrand disease (44). Conversely, VWF-binding may mediate, at least in part, the catabolic endocytosis of therapeutic FVIII (19, 45), which is further suggested by the fact that the half-life of modified Fc-fused or PEGylated FVIII barely exceeds that of VWF (46, 47).

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 Dr Pete Lollar (Aflac Cancer and Blood Disorders Center, Department of Pediatrics, Emory University, Atlanta, GA, USA). We would like to extend our acknowledgments to the Centre d'Explorations Fonctionnelles for assistance (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France).

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 (2006) Factor VIII structure and function. *Int J Hematol* 83(2):103–108.
2. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K (1998) The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 92(11):3983–3996.
3. Ehrenforth S, et al. (1992) Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet Lond Engl* 339(8793):594–598.
4. Lacroix-Desmazes S, et al. (2008) Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 112(2):240–249.
5. Lenting PJ, et al. (1999) The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 274(34):23734–23739.
6. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG (1999) Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 274(53):37685–37692.
7. Dasgupta S, et al. (2007) A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21):8965–8970.
8. Dasgupta S, et al. (2008) Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica* 93(1):83–89.
9. Repessé Y, et al. (2012) Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 129(4):1172–1173–1175.
10. Herczenik E, et al. (2012) Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol* 129(2):501–509, 509–5.
11. Wroblewska A, et al. (2012) Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood* 119(22):5294–5300.
12. Meems H, et al. (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(8):1114–1121.
13. Lü J, Pipe SW, Miao H, Jacquemin M, Gilbert GE (2011) A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood* 117(11):3181–3189.
14. Spiegel PC, Jacquemin M, Saint-Remy JM, Stoddard BL, Pratt KP (2001) Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood* 98(1):13–19.
15. Healey JF, et al. (1998) Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood* 92(10):3701–3709.
16. Lutz MB, et al. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223(1):77–92.

— RESULTATS —

17. Delignat S, et al. (2014) Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 20(4):486–492.
18. Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P (2007) 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* 110(13):4234–4242.
19. Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL (2001) Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 276(15):11970–11979.
20. Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJM, Mertens K (2005) The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost JTH* 3(6):1257–1265.
21. Navarrete A-M, et al. (2010) Endocytic receptor for pro-coagulant factor VIII: relevance to inhibitor formation. *Thromb Haemost* 104(6):1093–1098.
22. Meems H, Meijer AB, Cullinan DB, Mertens K, Gilbert GE (2009) Factor VIII C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 contribute to membrane binding and cofactor activity. *Blood* 114(18):3938–3946.
23. Bloem E, et al. (2013) Factor VIII C1 domain spikes 2092-2093 and 2158-2159 comprise regions that modulate cofactor function and cellular uptake. *J Biol Chem* 288(41):29670–29679.
24. Ngo JCK, Huang M, Roth DA, Furie BC, 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(4):597–606.
25. Scandella D, et al. (1995) 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* 86(5):1811–1819.
26. Gilbert GE, Kaufman RJ, Arena AA, Miao H, Pipe SW (2002) 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* 277(8):6374–6381.
27. Saenko EL, Shima M, Gilbert GE, Scandella D (1996) 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* 271(44):27424–27431.
28. Chiu P-L, et al. (2015) Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood* 126(8):935–938.
29. Oldenburg J, Lacroix-Desmazes S, Lillicrap D (2015) Alloantibodies to therapeutic factor VIII in hemophilia A: the role of von Willebrand factor in regulating factor VIII immunogenicity. *Haematologica* 100(2):149–156.

30. Goudemand J, et al. (2006) Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* 107(1):46–51.
31. Calvez T, Laurian Y, Goudemand J (2008) 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 JTH* 6(2):390–392.
32. Peyvandi F, et al. (2016) A randomized trial of factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *N Engl J Med* 374(21):2054–2064.
33. Gouw SC, et al. (2007) 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(11):4693–4697.
34. Gouw SC, et al. (2013) Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 368(3):231–239.
35. Delignat S, et al. (2012) Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 18(2):248–254.
36. Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy J-MR, Kotitschke R, 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(2):221–229.
37. Delignat S, et al. (2007) Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica* 92(10):1423–1426.
38. Kallas A, Kuuse S, Maimets T, 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(6):911–919.
39. Qadura M, et al. (2009) Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood* 114(4):871–880.
40. Dasgupta S, et al. (2007) VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* 109(2):610–612.
41. Sorvillo N, et al. (2016) von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica* 101(3):309–318.
42. Castro-Núñez L, Dienava-Verdoold I, Herczenik E, Mertens K, Meijer AB (2012) Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. *J Thromb Haemost JTH* 10(9):1929–1937.
43. van Schooten CJ, et al. (2008) Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 112(5):1704–1712.

— RESULTATS —

44. Goodeve AC, et al. (2001) A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 85(5):929–931.
45. Pegon JN, et al. (2012) Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 97(12):1855–1863.
46. Mahlangu J, et al. (2014) Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood* 123(3):317–325.
47. Konkle BA, et al. (2015) Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. *Blood* 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. FVIII (20 nM) was pre-incubated 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}). 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 FVIII or FVIII 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). Graph is representative of 4 experiments (means±SEM). Panel C. Hemophilic E16 knock-out mice (n=6/group) were injected once a week for 4 weeks with 0.2 µg of B-domain containing FVIII pre-incubated with 6 µM F(ab')₂ of BO2C11 (closed square) or a human IgG4 isotype control (closed circle). After four weeks, the anti-FVIII antibody response was measured. Anti-FVIII IgG titers are defined as arbitrary units based on standard curves generated using a purified mouse monoclonal anti-FVIII IgG (mAb6) serially diluted on FVIII-coated ELISA plates. 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. 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 (mouse anti-C1 domain antibody, Panel F) were immobilized on

— RESULTS —

microtiter plates. After blocking, FVIII^{HSQ}, FVIII^{R2215A}, FVIII^{R2220A}, FVIII^{R2215-20A} or FVIII^{C1} were serially diluted across the plate 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*. 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 at 37°C. Internalized FVIII was detected as described above. Results are expressed as the percentage of median fluorescence intensity (MFI), whereby 100% corresponds to MFI obtained with wild-type FVIII (FVIII^{HSQ}). Panels B and D represent activation of a FVIII-specific HLA-DRB1*0101-restricted T-cell hybridoma by 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 4 times weekly with 1 µg of 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 a purified mouse monoclonal anti-FVIII IgG (mAb6) serially diluted on FVIII-coated ELISA plates. 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 FVIII^{HSQ} and FVIII^{Y1680C} to VWF was studied using an ELISA as described in the methods section. Results are expressed in arbitrary units. Panel B. FVIII^{HSQ} (10 nM, closed circles) or FVIII^{Y1680C} (closed square) in 100 µl were administered into FVIII-deficient mice and the residual FVIII activity was measured at different time points (n=3 mice per time point) using a chromogenic assay. The data is plotted as percentage of initial FVIII activity (measured 5 minutes after

— RESULTS —

administration) 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 absence of VWF. Cells were subsequently washed, fixed, permeabilized and stained for FVIII using of an 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), where 100% corresponds to MFI observed for 10 nM FVIII^{HSQ}. Panels D and E. FVIII-deficient mice were administered FVIII^{HSQ} (closed circles) or FVIII^{Y1680C} (closed square), intravenously for four weeks at weekly intervals. 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 FVIII^{Y1680C} (0.4 µg, closed circle) or FVIII^{Y1680C} pre-incubated with a 2-fold molar excess of BO2C11 Fab (closed square) intravenously for four weeks at weekly intervals. 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 a purified mouse monoclonal anti-FVIII IgG (mAb6) serially diluted on FVIII-coated ELISA plates. The graph depicts a pool of two independent experiments. Panel B. FVIII^{HSQ}, FVIII^{C1} or FVIII^{R2215-20A} (10 nM in 100 µl) 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 is plotted as percentage of initial FVIII levels (measured 5 minutes after administration) versus time (mean±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 4 times weekly with 0.5µg 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

— RESULTS —

depict medians. Statistical significances were assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney U test (ns: not significant).

Supplementary Figure 1. The anti-C2 antibody BO2C11 inhibits FVIII presentation *in vitro*. Panel A. 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 FVIII or FVIII 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). Data are depicted as % of IL-2 expression versus FVIII^{HSQ} alone. Results are representative of three experiments (means±SEM).

Supplementary Figure 2. Inhibition of the anti-FVIII immune response *in vivo* upon co-incubation of FVIII with BO2C11. FVIII-deficient mice were injected weekly with 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).

Figure 1

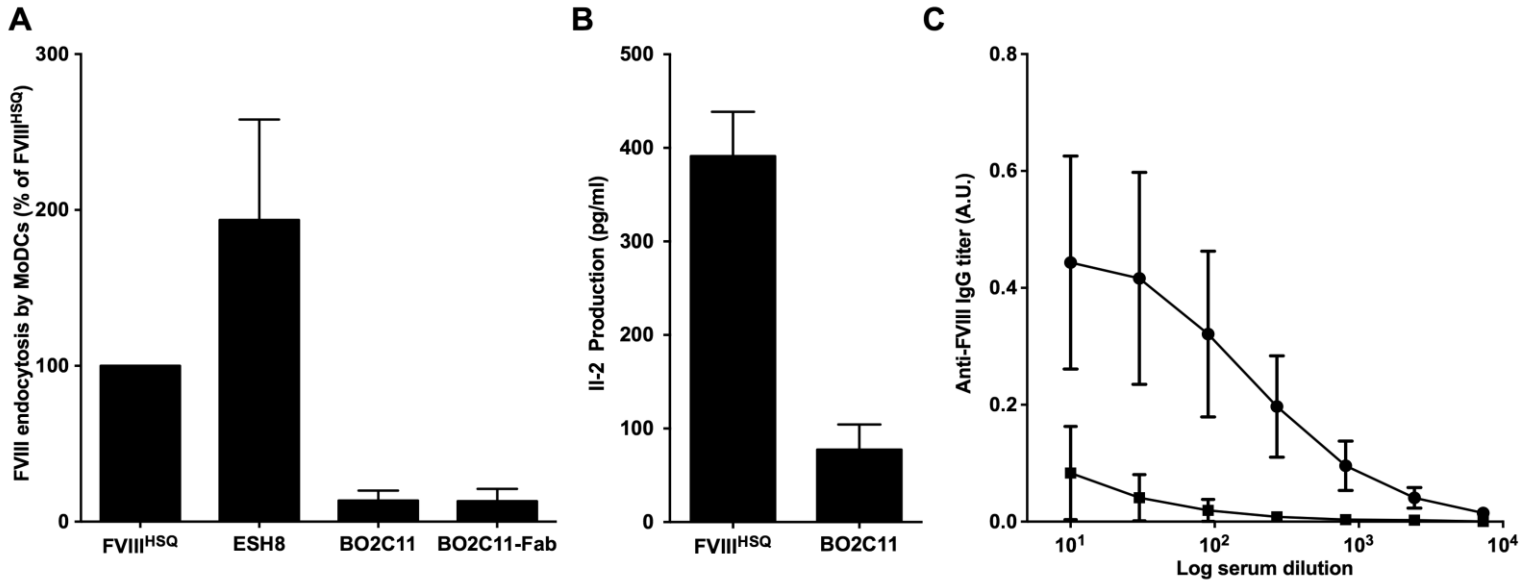


Figure 2

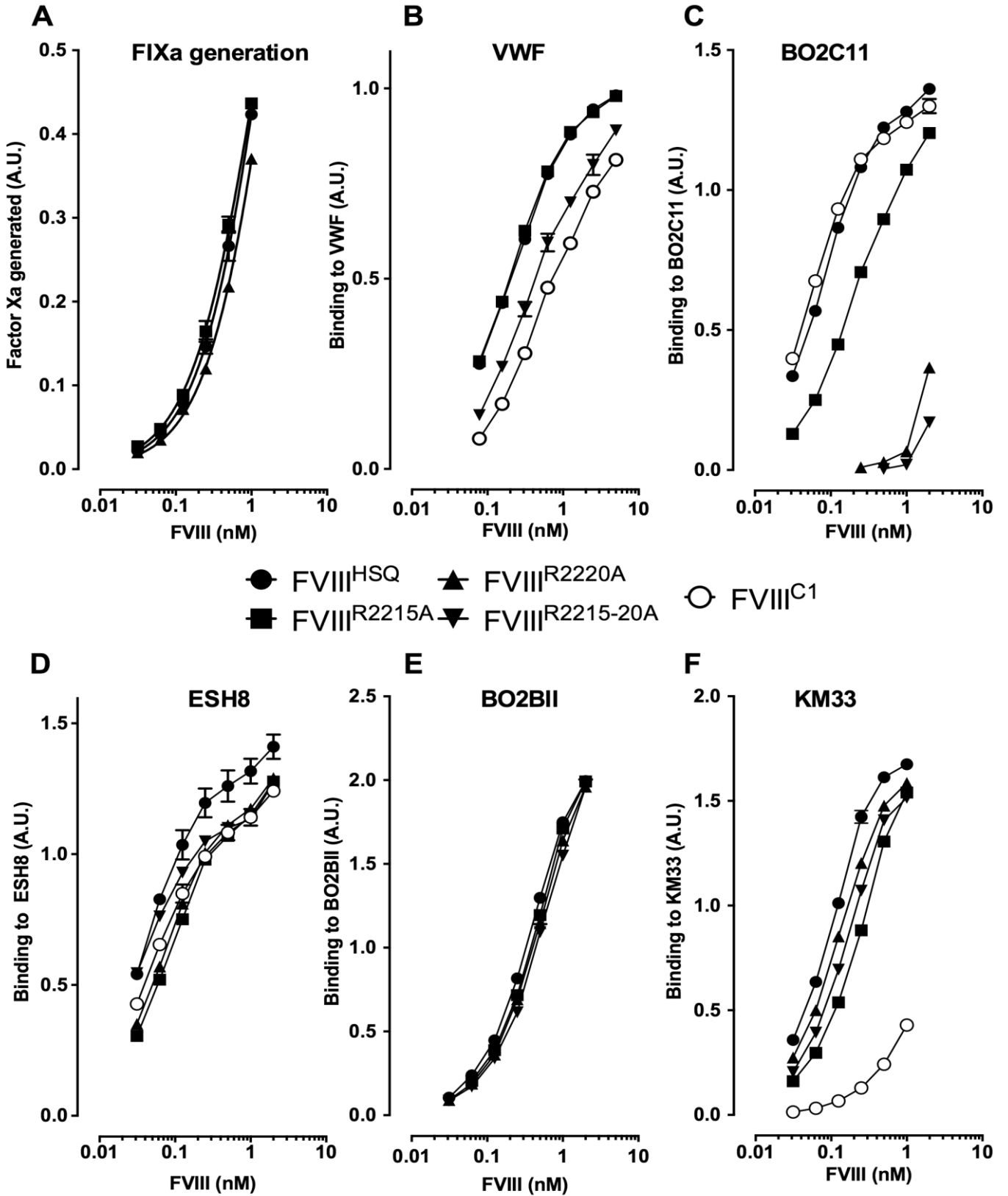
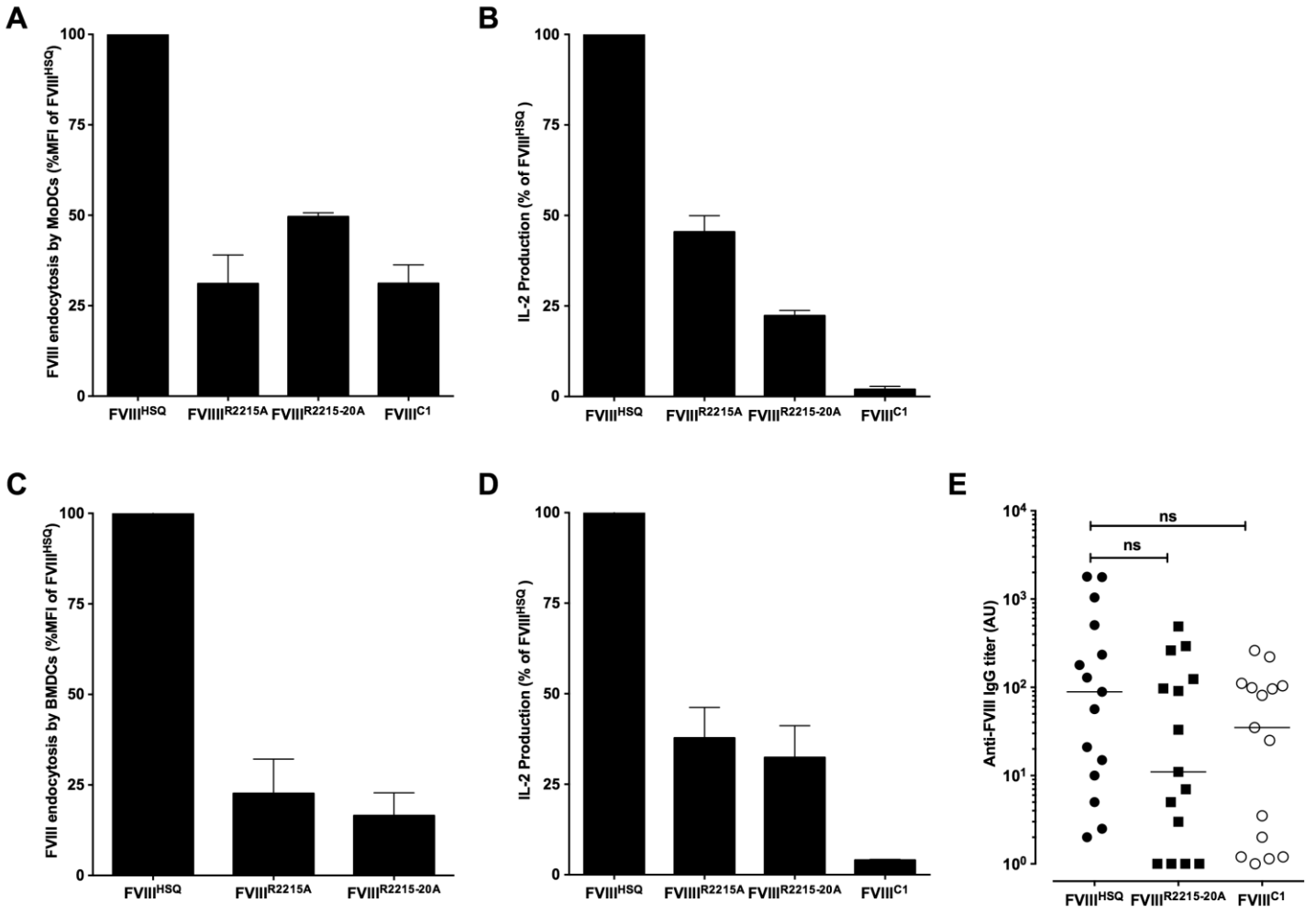


Figure 3



— RESULTS —

Figure 4

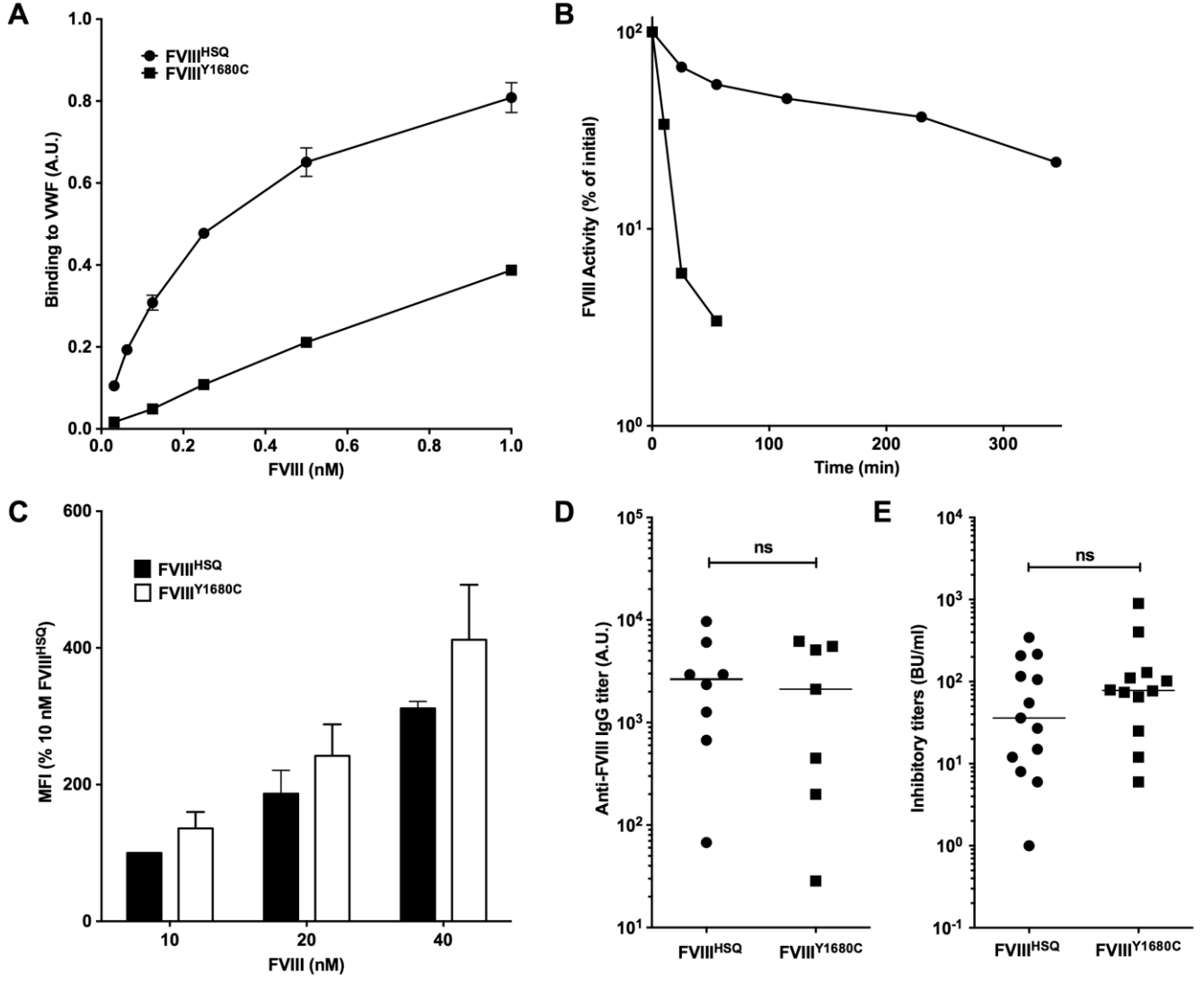
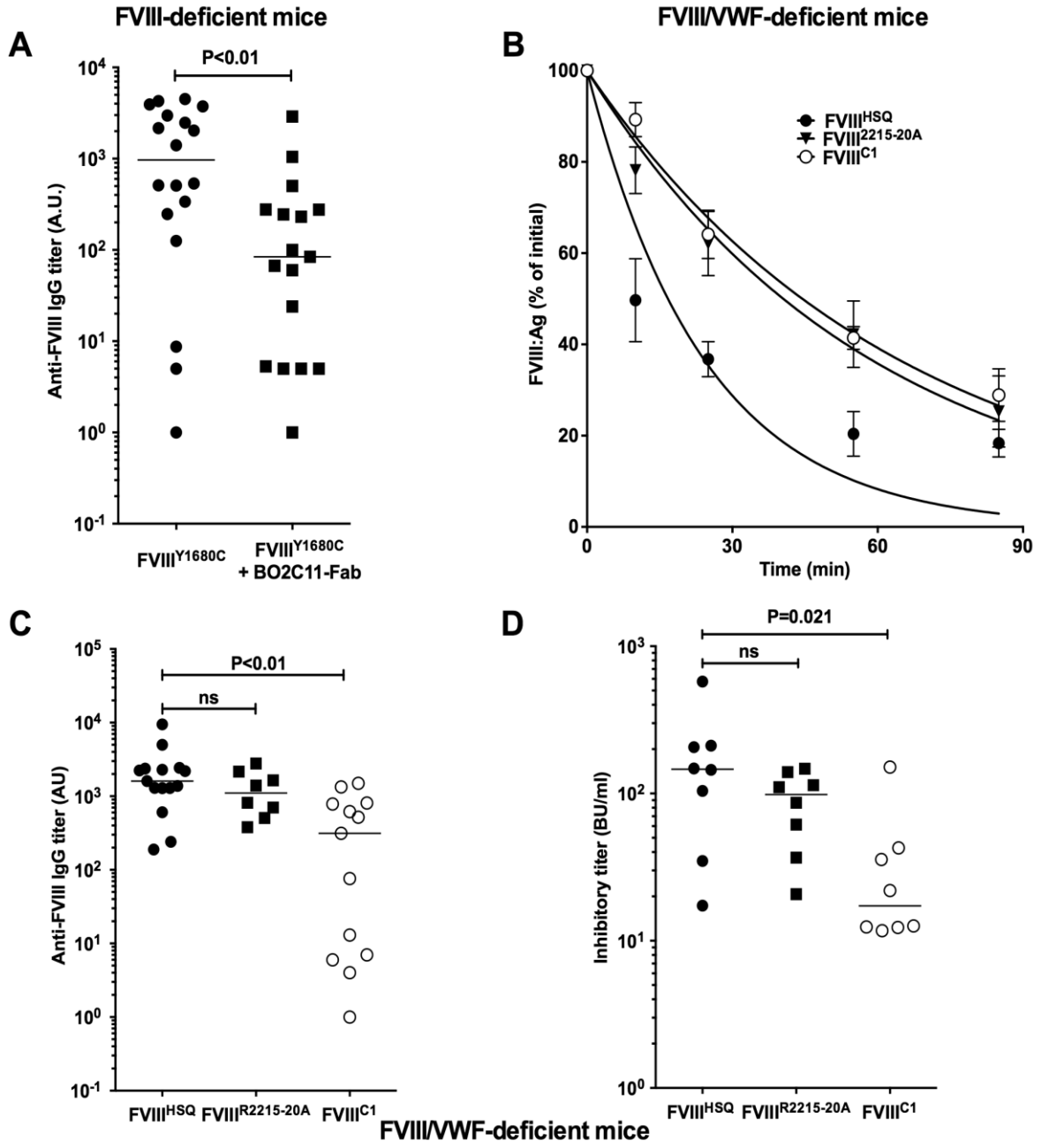
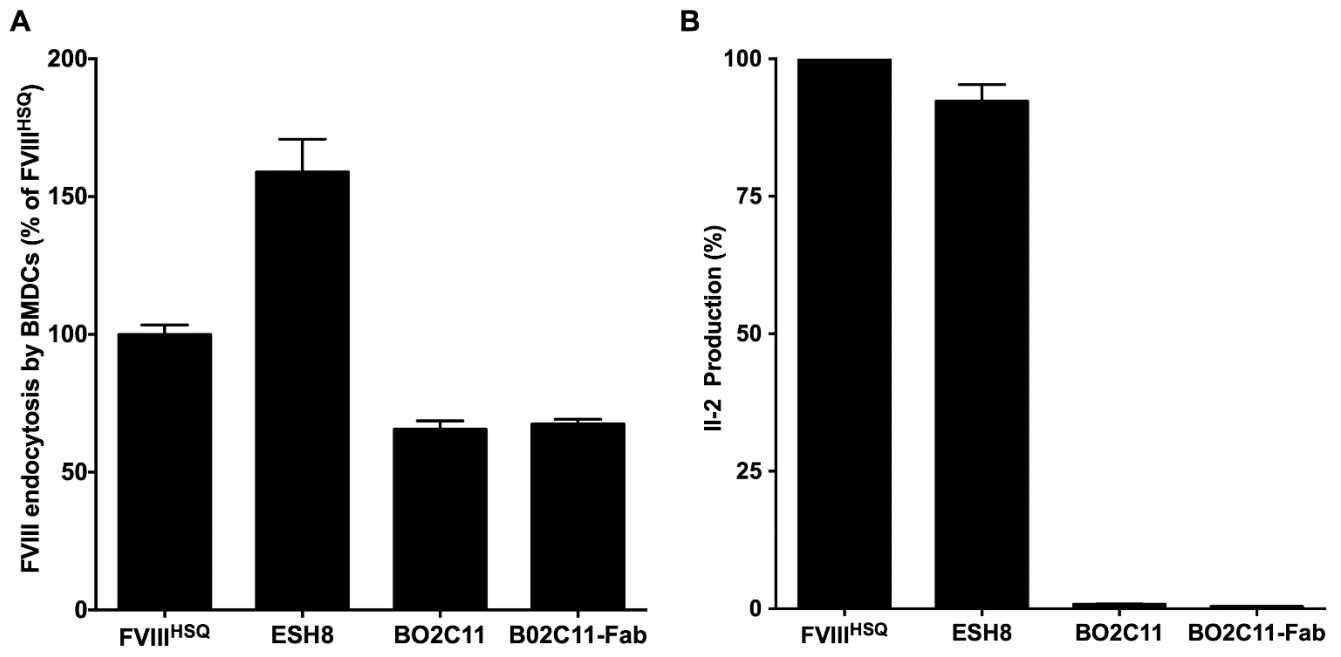


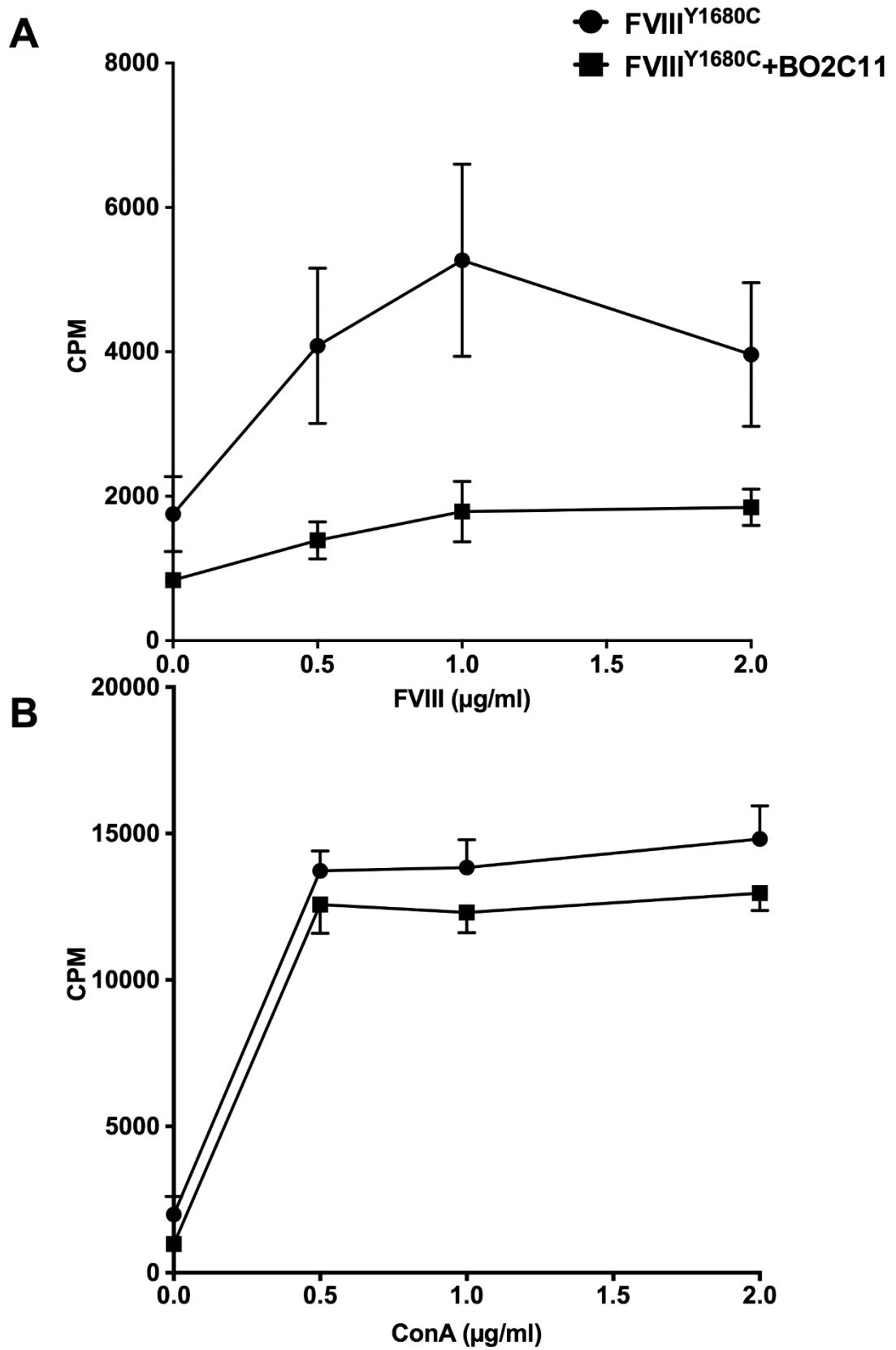
Figure 5



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



DISCUSSION

La survenue des anticorps inhibiteurs chez les patients hémophiles constitue la complication la plus redoutée dans la prise en charge de la maladie et conduit à une impasse thérapeutique majeure. L'immunogénicité du FVIII thérapeutique est d'autant plus intrigante qu'il est administré en faible quantité aux patients, par voie intraveineuse, qui n'est pas connue pour être une voie immunogène, et en absence d'adjuvant. Si la phase effectrice de la réponse immunitaire contre le FVIII, la nature des LB et des LT impliqués et les propriétés des anticorps inhibiteurs anti-FVIII ont été largement documentées, les étapes précoces de la réponse immunitaire sont en revanche mal connues. L'objectif de ma thèse a été d'étudier i) le potentiel rôle adjuvant du système du complément sur la réponse immunitaire anti-FVIII (articles 1 et 2) ainsi que ii) l'implication de certains domaines du FVIII dans son immunogénicité, en particulier dans l'internalisation du FVIII par des CPA (article 3).

1. Rôle du complément dans la réponse immunitaire anti-FVIII

De nombreuses études se sont attelées à comprendre par quels moyens le FVIII était reconnu et capturé par les CPA professionnelles. Ainsi, plusieurs récepteurs ont-ils été identifiés dans le processus d'internalisation (Navarrete et al., 2010). Cependant, tous ces travaux ont été menés en utilisant des milieux de culture sans sérum ou en présence de sérum décomplémenté, inactivé à la chaleur. *De facto*, ces conditions occultent le rôle que peut potentiellement jouer le système du complément. Ceci est d'autant plus étonnant qu'une fois administré aux patients, le FVIII est susceptible d'interagir avec tous les composants plasmatiques en circulation, parmi lesquels on retrouve les molécules du complément.

Outre ses fonctions classiques dans la surveillance et l'élimination directe des pathogènes, le complément est de plus en plus étudié pour ses fonctions hors immunité innée. Ainsi, les molécules du complément peuvent-elles également agir sur les CPA, sur les LB ou les LT, ou encore au niveau des organes lymphocytes secondaires (Barrington et al., 2002), pour moduler la mise en place des réponses immunitaires et ainsi contribuer au développement de l'immunité adaptative. Si de nombreux travaux étayent l'implication du complément dans les réponses immunitaires contre les bactéries et les virus (Walport, 2001), rien en revanche n'est connu sur son potentiel rôle dans les réponses immunitaires dirigées contre les protéines thérapeutiques. Enfin, dernier aspect, un nombre croissant d'études constate un rôle majeur du complément dans la modulation de la cascade de la coagulation. Partant de ces observations, j'ai étudié la contribution potentielle du complément dans l'établissement de la réponse immunitaire anti-FVIII.

On sait que la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII suit un schéma classique : elle requiert l'internalisation du FVIII par des CPA professionnelles et la présentation de peptides dérivés du FVIII à des LT naïfs spécifiques, ce qui conduit à leur activation. L'activation complète des LT nécessite la présence de signaux de danger dans le microenvironnement. A ce jour, si plusieurs facteurs de risque ont été proposés, l'origine des signaux de danger demeure inconnue. J'ai donc cherché de savoir si le complément pouvait apporter ces signaux adjuvants.

Activation du complément et immunogénicité du FVIII *in vivo*

La contribution du complément à l'immunogénicité du FVIII a d'abord été évaluée dans un modèle murin d'hémophilie A sévère. L'utilisation de Cobra Venom Factor humanisé (CVFh) pour éliminer le complément a montré que la déplétion du complément chez des souris hémophiles traitées par des injections itératives de FVIII réduisait le taux d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs générés. Le CVFh est une protéine recombinante capable d'activer le complément. Elle présente de fortes homologies de structure et de fonction avec le fragment C3b humain. Elle peut s'associer au facteur B et au facteur D pour former une C3 convertase similaire à celle de la voie alterne du complément, à la différence qu'il s'agit d'une C3 convertase très stable et insensible à la régulation par les facteurs H et I (Vogel and Fritzinger, 2010). Il y a donc une activation continue du composant central du complément C3, ce qui finit par épuiser rapidement toutes les molécules de C3 disponibles. A l'inverse d'une C3 convertase classique, la C3 convertase générée par le CVFh est dépourvue d'une activité C5 convertase, ce qui empêche la production de l'anaphylatoxine très inflammatoire C5a.

L'utilisation de cet outil idéal a aussi été motivée par le fait que la déplétion du complément a lieu sur un laps de temps court, ce qui permet un retour à la normale rapidement et permet d'éviter des dommages collatéraux si cette déplétion durait plus longtemps. En effet, une autre stratégie possible aurait été d'étudier l'immunogénicité du FVIII dans des modèles murins invalidés pour le gène du C3. Or, les souris déficientes en C3 ont la particularité d'être plus susceptibles aux infections bactériennes à streptocoques. Elles présentent des altérations pérennes de l'immunité innée, avec une réduction de l'activité des mastocytes et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Prodeus et al., 1997), mais aussi de l'immunité adaptative, avec une altération profonde des réponses humorales. Leur utilisation n'est donc pas pertinente dans notre contexte.

Mes résultats montrent donc que l'activation du complément contribue à la mise en place de la réponse immunitaire contre le FVIII. Ces résultats sont en accord avec les études publiées qui démontrent que l'absence de C3 ou le blocage du C3 par un anticorps monoclonal sont associés

— DISCUSSION —

à une réduction des réponses immunitaires humorales induites par des antigènes thymo-dépendants (Hebell et al., 1991). Cependant, dans notre étude, un degré de spécificité a toutefois pu être observé puisque la déplétion du complément n'altérait pas la réponse immunitaire dirigée contre A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type I repeats-13 (ADAMTS-13), une protéine thérapeutique utilisée en thérapie de substitution chez les patients atteints de purpura thrombotique thrombocytopénique et employée ici contre antigène contrôle. L'administration simultanée ou rapprochée dans le temps de deux protéines peut conduire à un phénomène de « compétition antigénique » : ainsi, a-t-il été découvert que l'immunisation d'animaux avec deux antigènes entraînait une diminution de la réponse immunitaire contre l'un des antigènes voire envers les deux (Brody and Siskind, 1969). Il est dès lors aisé d'imaginer que l'administration de CVFh détourne la réponse immunitaire anti-FVIII. Cependant, les résultats obtenus avec ADAMTS-13 permettent d'infirmer cette hypothèse et montrent qu'il s'agit bien d'un effet du système du complément sur la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII.

Plusieurs travaux font état d'une implication du complément dans la mise en place et la maintenance des réponses mémoires humorales. Gonzalez et al. ont observé que des souris déficientes en C3 injectées avec le virus de la grippe ne développaient pas d'immunité à long terme et ne survivaient pas après un rappel plusieurs semaines après immunisation (Gonzalez et al., 2008). Ces résultats corroborent ceux de Da Costa et al. qui avaient montré que l'absence de C3 ou l'invalidation de la voie classique chez des souris immunisées empêchaient la mise en place de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que l'induction d'une réponse anticorps forte après un rappel d'antigène (Da Costa et al., 1999). Le C3 joue ainsi un rôle crucial dans l'induction d'une réponse humorale et le maintien d'anticorps spécifiques du virus de la grippe après immunisation. Un des mécanismes avancés par lequel le C3 favorise ces réponses humorales serait l'abaissement du seuil d'activation des LB et le maintien en vie des LB activés dans les centres germinatifs (Carter and Fearon, 1992; Fearon and Carroll, 2000). L'absence de réponse mémoire chez les souris déficientes en C3 pourrait aussi être liée à une rétention plus faible des antigènes en absence de C3 à la surface des FDC dans les organes lymphoïdes secondaires (Barrington et al., 2002).

Alors que les études publiées se focalisent sur la mise en place de la réponse anamnétique, j'ai voulu savoir si le complément pouvait jouer un rôle sur la réponse mémoire anti-FVIII lorsque l'immunisation est déjà établie au préalable. Les résultats obtenus montrent que, bien que la déplétion de complément impacte la génération de la réponse primaire anti-FVIII, ce n'est plus

le cas en réponse secondaire. Il est possible que la présence de LB mémoires de haute affinité et de plasmocytes à longue durée de vie spécifiques du FVIII compense l'action de la déplétion du complément. En effet, les études précédemment cités accordent une place importante au CR2 dans l'induction de la réponse secondaire. Le CR2 participe à l'activation des LB naïfs et à la rétention des antigènes et des complexes immuns dans les organes lymphoïdes (Proding, 1999). Etant donné que les sous-populations de LB et les plasmocytes sécréteurs d'anticorps anti-FVIII générés au cours de l'immunisation perdent l'expression du CR2 (Moir and Fauci, 2009), il est alors aisé d'imaginer que l'élimination du complément aurait un rôle mineur sur eux et par conséquent sur le cours de la réponse immunitaire secondaire. Par ailleurs, il aurait été intéressant de déterminer si la déplétion du complément au cours de la mise en place de la réponse primaire anti-FVIII engendrait non seulement une réduction de la production d'anticorps inhibiteurs à court terme seulement mais également à long terme.

Rôle du complément dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII

Si le complément participe à l'induction d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs, peut-il intervenir au niveau des étapes précoces de la réponse immunitaire ? Les résultats obtenus *in vitro* montrent que la présence de complément favorise de manière spécifique l'internalisation du FVIII par différents types de CPA professionnelles ainsi que la présentation antigénique du FVIII à des LT CD4⁺ spécifiques. De plus, il a été mis en évidence un rôle prédominant du composant central C3 dans la capture du FVIII. Le C3 est une molécule bio-inactive en soi mais qui peut être activée en phase soluble par une C3 convertase et libérer un fragment bioactif C3b. La génération d'une C3 convertase artificielle *in vitro* pour examiner le rôle potentiel de ce fragment a montré que le fragment C3b potentialise l'internalisation du FVIII par des cellules dendritiques. Par ailleurs, le fragment C3b seul arrive à doubler le niveau d'endocytose du FVIII et permet d'atteindre un niveau similaire à celui de la C3 convertase, confirmant le rôle central du C3b dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII.

Ces résultats sont similaires à ce qui avait déjà été décrit: ainsi avait-il été démontré que le fragment C3b associé à la toxine tétanique favorisait son interaction et son endocytose par des CPA mais aussi un meilleur apprêtement et une meilleure présentation antigénique (Jacquier-Sarlin et al., 1995; Rey-Millet et al., 1994; Serra et al., 1997; Villiers et al., 1996), via le CR1 et le CR2 exprimés par les cellules utilisées. L'action de la C3 convertase sur le C3 conduit aussi au relargage de l'anaphylatoxine C3a, qui pourrait également jouer sur la capture du FVIII par les cellules dendritiques. En effet, Li et al. ont démontré que l'interaction entre C3a et son

récepteur C3aR à la surface des cellules dendritiques augmentait leur capacité à phagocyter l'ovalbumine ainsi que leur capacité à sécréter des cytokines pour polariser les LT (Li et al., 2008). Les auteurs avancent ici l'hypothèse selon laquelle la signalisation via le C3a et le C3aR entraînent une réorganisation du cytosquelette et une augmentation des processus de macropinocytose. Alors que les voies d'internalisation du FVIII n'ont toujours pas été découvertes, il serait pertinent de voir si cela pourrait aussi constituer un moyen d'entrer pour le FVIII.

Le rôle du complément dans les phénomènes d'internalisation a également été décrit pour d'autres molécules du système du complément, notamment le composant C1q. Ainsi Bobak et al. ont-ils montré que le C1q purifié stimulait la fonction phagocytaire de monocytes ou de macrophages humains, en absence de toute autre molécule du complément (Bobak et al., 1987). Il a été montré que le C1q, indépendamment de sa capacité à activer la voie classique du complément, jouait un rôle majeur dans l'élimination des corps apoptotiques (Bohlsion et al., 2007; Taylor et al., 2000; Vandivier et al., 2002), en servant de médiateur physique entre les phagocytes et les cellules apoptotiques auxquelles il s'est fixé (Ogden et al., 2001). Mes résultats ont permis de montrer que le C1q favorisait *in vitro* la capture du FVIII et sa présentation antigénique par des MO-DCs, ce qui corrobore des travaux publiés auparavant. Il serait maintenant intéressant de déterminer, à l'instar des fragments C3b, de quelle manière le C1q potentialise l'internalisation du FVIII.

Quel(s) mécanisme(s) d'internalisation pour le FVIII en présence de complément ?

Au cours de mon travail de thèse, j'ai montré que l'activation du complément et le C3b consécutif favorisaient l'entrée du FVIII dans les CPA mais de quelle(s) manière(s) ? Cette question majeure reste à l'heure actuelle malheureusement sans réponse. Cependant, certaines pistes ont pu être écartées et je vais avancer ici quelques mécanismes fondés sur la littérature scientifique qui pourraient s'opérer sur les cellules.

L'activation du complément agirait de manière indirecte pour permettre l'internalisation du FVIII : si plusieurs récepteurs d'endocytose du FVIII ont proposés ou identifiés, seul le CD206 conduit à une présentation antigénique du FVIII (Dasgupta et al., 2007a; Navarrete et al., 2010; Repessé et al., 2012). L'activation du complément pourrait stimuler l'expression de ces récepteurs à la surface des CPA. Toutefois, cela n'a pas été le cas. Il est possible que les courts temps d'incubation utilisés *in vitro* ne permettent pas une synthèse de nouveaux récepteurs et leur expression à la surface. Il n'est toutefois pas exclu que le complément induise rapidement

la translocation depuis des vésicules intracellulaires d'un autre récepteur d'endocytose encore non identifié. Une autre hypothèse repose sur l'exposition de phosphatidylsérine (PS) sur le feuillet externe de la membrane plasmique des CPA : la PS est connue pour être un marqueur des cellules entrant en apoptose. Elle est également exprimée sur les plaquettes en état d'activation et sert de plateforme pour la fixation et l'action des facteurs de la coagulation, dont le FVIII (Gilbert et al., 2015). La PS en soi n'a cependant pas de propriété d'internalisation, qui nécessite un mécanisme actif. Elle peut constituer une étape préliminaire avant une prise en charge par un récepteur du FVIII, par pinocytose ou autre (van Haren et al., 2012). Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que les incubations *in vitro* de MO-DCs avec différents types de sérum humain ou des protéines purifiées du complément n'entraînent pas de surexposition de PS, écartant de ce fait cette hypothèse.

L'activation du complément agirait de manière directe pour permettre l'internalisation du FVIII : l'effet de l'activation du complément sur la phagocytose des pathogènes est connu depuis longtemps. La reconnaissance de motifs sur les bactéries par les molécules du complément conduit à l'activation de la cascade et à l'opsonisation des bactéries par des fragments issus du clivage du C3, ce qui favorise leur capture et leur élimination par le système réticulo-endothélial (Walport, 2001). De même, l'activation du complément sur des complexes immuns a été largement relatée. En revanche, l'activation directement sur les antigènes solubles n'a pas été étudiée. Villiers et al. ont montré, grâce à leur modèle de toxine tétanique couplée au C3b de manière covalente, que la présence du fragment du complément augmentait la fixation de la toxine à la surface des CPA ainsi que sa capture, potentialisée par les récepteurs CR1 et CR2 exprimés sur les cellules utilisées (Villiers et al., 1996). Au vu des résultats obtenus pendant ma thèse, l'une des hypothèses pour expliquer l'entrée du FVIII dans les CPA en présence de complément serait que les fragments C3b générés au cours de l'activation du complément fassent office de médiateurs entre les CPA et le FVIII.

Les CPA professionnelles expriment de nombreux récepteurs aux fragments dérivés du C3, parmi lesquels l'un d'entre eux est particulièrement intéressant : le CR1. Le CR1, exprimé par l'ensemble des cellules myéloïdes, a pour principaux ligands le C4b et le C3b (Gasque, 2004). Il participe à la régulation du complément en agissant comme cofacteur du FI dans la conversion du C3b en iC3b inactif. De nombreux travaux ont également décrit sa contribution dans les processus de phagocytose. Ainsi, le CR1 exprimé à la surface des neutrophiles humains peut-il contribuer, avec le CR3, à l'internalisation de particules de levures opsonisées par le complément (Fällman et al., 1993). Des études ont également montré sa participation dans la

— DISCUSSION —

phagocytose d'érythrocytes opsonisés par du C3 ou de particules d'agarose couplées à des fragments C3b par des macrophages humains (Johnson et al., 1986; Newman et al., 1985). L'hypothèse d'une endocytose via le CR1 est d'autant plus plausible que les MO-DCs expriment le CR1 à leur surface et que des fragments C3b ont pu être détectés à la surface des MO-DCs après activation du complément *in vitro* (observation personnelle, (Reis et al., 2007)). Enfin, j'ai également pu mettre en évidence une interaction entre le FVIII et le C3b en condition statique par ELISA. Il serait donc intéressant de déterminer si cette interaction peut également survenir à la surface des cellules et, le cas échéant, si elle peut constituer une voie d'endocytose pour le FVIII.

L'une des interrogations soulevées par les résultats obtenus a été de savoir si le complément pouvait s'activer sur le FVIII. En effet, les travaux publiés sur le rôle du complément dans la phagocytose des agents pathogènes décrivent une activation du système conduisant au clivage du composant C3 et à la génération de fragments C3b. Ces fragments contiennent des groupements réactifs capables d'établir des liaisons covalentes avec la surface des agents pathogènes pendant une durée très courte, au-delà de laquelle les groupements réactifs sont inactivés (Law and Dodds, 1997). L'opsonisation par le C3b de cette manière permet une reconnaissance et une prise en charge ultérieure par les phagocytes via leurs récepteurs de surface au complément. La génération d'une C3 convertase *in vitro* et l'augmentation de l'endocytose du FVIII incubé en sa présence par les MO-DCs soulèvent la possibilité d'une opsonisation du FVIII par le complément. Les expériences menées au cours de ma thèse n'ont pas permis de savoir si le FVIII était opsonisé par le complément. Toutefois, il est intéressant de noter que l'incubation du FVIII avec du C3b purifié, incapable d'établir des liaisons covalentes, facilite également l'endocytose du FVIII, suggérant ainsi que l'opsonisation du FVIII, si tant est qu'elle ait lieu, serait facultative pour internaliser le FVIII par les CPA. Le mécanisme moléculaire derrière l'action du C3 sur l'endocytose du FVIII reste donc à être élucidé.

Etant donné que le C1q est également capable d'interagir avec le FVIII, l'une des hypothèses serait que le complexe FVIII/C1q soit phagocyté, ce qui constituerait ainsi une voie d'entrée pour le FVIII. Un potentiel rôle indirect du C1q n'est toutefois pas exclu, d'autant plus qu'un rôle immuno-modulateur du C1q sur le phénotype des CPA professionnelles a déjà été décrit dans la littérature (Csomor et al., 2007). Les CPA expriment à leur surface de nombreux récepteurs pour le C1q (Galvan et al., 2012), parmi lesquels certains ont été identifiés ou proposés comme médiateurs d'endocytose, par exemple dans le cas de la phagocytose de

cellules apoptotiques opsonisées par du C1q : le C1qRP, le cC1qR mais également le CR1 à nouveau. (Kishore and Reid, 2000; Klickstein et al., 1997; Nepomuceno and Tenner, 1998; Ogden et al., 2001). Ainsi, serait-il pertinent de déterminer si l'inhibition de ces récepteurs empêche l'internalisation du FVIII et, le cas échéant, s'il y a une action synergique avec les récepteurs aux fragments dérivés du C3.

Le complément, une source de signaux de danger ?

L'activation des LT CD4⁺ naïfs spécifiques du FVIII nécessite que les CPA avec lesquels ils sont en contact lors de la synapse immunologique deviennent matures. Cette maturation nécessite l'intervention de signaux de danger apportés par des stimuli exogènes (ex : acides nucléiques ou polysaccharides microbiens) comme endogènes (ex : cytokines pro-inflammatoires) (Gallucci and Matzinger, 2001). L'administration de produits par voie intraveineuse est connue pour induire un état de tolérance immunitaire plutôt qu'une activation du système immunitaire (Endres and Grey, 1980). Dans ce contexte, le FVIII fait donc bande à part et la nature des signaux de danger à l'origine de son immunogénicité reste à l'heure actuelle inconnue. Toutefois, plusieurs études ont permis d'écarter certaines pistes.

Les travaux menés par Pfistershammer et al. ont montré que l'incubation du FVIII seul, ou complexé au vWF, à des MO-DCs humains ne modulait ni la capacité de ces dernières à exprimer des marqueurs de costimulation, ni leur capacité à activer des LT allogéniques ou autologues (Pfistershammer et al., 2006). Une étude de Teyssandier et al. a par la suite montré, à l'aide de lignées cellulaires humaines et murines, que le FVIII était incapable *in vitro* d'activer la voie de signalisation canonique NF- κ B des Toll-like Receptors (TLR), récepteurs impliqués dans la reconnaissance des signaux de danger (Teyssandier et al., 2013). L'état inflammatoire au moment de l'administration du FVIII a également été proposé comme source de signaux de danger. La sévérité des saignements, les interventions chirurgicales ou les vaccinations sont des facteurs de risques proposés pour le développement des anticorps inhibiteurs. Récemment, Peyron et al. ont observé dans un modèle murin d'hémophilie A que l'induction d'une arthropathie, qui constitue une inflammation locale aiguë, n'exacerbait en rien l'immunogénicité du FVIII (Peyron et al., 2015).

Nous savons que le complément est une composante majeure du système immunitaire en ce qui concerne la reconnaissance rapide des pathogènes en vue de leur élimination. Les molécules initiatrices du complément (C1q, collectines) peuvent rapidement détecter les signaux de danger que constituent les structures moléculaires conservées chez les agents pathogènes

— DISCUSSION —

(Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP), ou celles libérées en cas de dommage tissulaire (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP).

Le complément est cependant également un grand pourvoyeur de fragments bioactifs. Il s'agit d'une source importante de molécules pro-inflammatoires (C3a, C5a) capables d'influencer le phénotype des CPA, d'autant plus que ces dernières expriment des récepteurs pour ces anaphylatoxines (Li et al., 2011; Soruri et al., 2003). En 2008, Li et al. d'ailleurs ont confirmé cette hypothèse : il a été ainsi montré que des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (BM-DCs) déficientes en récepteur C3aR étaient moins aptes à exprimer des molécules de CMH de classe II ainsi que des molécules de costimulation (Li et al., 2008). Le traitement des BM-DCs avec du C3a purifié a aussi permis l'expression de ces molécules à la surface. Par ailleurs, Strainic et al. ont démontré que les anaphylatoxines C3a et le C5a pouvaient se fixer à leurs récepteurs respectifs C3aR et C5aR sur les LT et les CPA et favoriser l'expression des molécules de CMH de classe II et de costimulation sur les CPA ainsi que la survie des LT (Lalli et al., 2008; Strainic et al., 2008). L'absence de signalisation via C3a-C3aR et C5a-C5aR empêche *in vivo* et *in vitro* la mise en place de réponses thymo-dépendantes efficaces. Les anaphylatoxines ne sont pas les seules molécules du complément à pouvoir jouer un rôle de costimulation. En effet, Sándor et al. ont observé *in vitro* que l'incubation de MO-DCs en présence de C3 actif s'accompagnait d'un clivage du C3 et d'un relargage de fragments C3b dont l'interaction avec les MO-DCs entraînait leur maturation (Sándor et al., 2009). Enfin, Reis et al. ont observé que la présence de C3 au cours de la différenciation des MO-DCs favorisait l'expression de surface des molécules de costimulation (Reis et al., 2008).

Si l'activation du complément contribue à la réponse immunitaire anti-FVIII, en agissant potentiellement sur la capture du FVIII, elle peut notamment conduire à la production des anaphylatoxines pro-inflammatoires, dont la puissante C5a, qui pourraient aussi influencer l'immunogénicité du FVIII. Pour évaluer cet aspect, j'ai étudié la réponse immunitaire contre le FVIII dans un modèle murin d'inflammation et d'activation continue systémique non contrôlée du complément, les souris déficientes en facteur H (Pickering et al., 2002). En accord avec l'hypothèse posée, les résultats obtenus *in vivo* montrent qu'une activation continue du complément entraîne une augmentation des titres en anticorps inhibiteurs chez les souris ayant été immunisées. De manière intéressante, cette amplification de la réponse immunitaire anti-FVIII pouvait être réprimée en bloquant le récepteur au C5a à l'aide d'un antagoniste spécifique. Le C5a potentialiserait donc l'immunogénicité du FVIII. Toutefois une contribution des autres produits du complément n'est pas à exclure. *In vitro*, mes résultats contrastent avec

ceux de la littérature et montrent que la présence de complément ne modifie en rien l'expression des molécules de costimulation à la surface des MO-DCs. Il est probable que cela soit dû à des différences de conditions expérimentales, les études publiées s'intéressant à l'action du complément dès la différenciation des précurseurs et non pas une fois que les cellules sont complètement différenciées. Le complément ne constitue donc pas dans nos mains un signal de danger à la mise en place de la réponse immunitaire, en tout cas au niveau de la maturation des CPA. Il n'est pas impossible que les anaphylatoxines générés au cours de l'activation du complément puissent agir à d'autres niveaux de la réponse immunitaire: les anaphylatoxines constituent de puissantes molécules chémo-attractantes qui jouent un rôle crucial en agissant sur le recrutement des cellules immunitaires (Aksamit et al., 1981; Falk and Leonard, 1980; Lett-Brown and Leonard, 1977; Nataf et al., 1999) mais également sur la polarisation des LT dans les réponses immunitaires (Lalli et al., 2007; Strainic et al., 2008).

2. Capture du FVIII : rôle de la structure pour son immunogénicité

Alors que des travaux se sont attelés à trouver par quels récepteurs le FVIII est reconnu et pris en charge par le système immunitaire, des études récentes ont cherché à expliquer l'immunogénicité du FVIII par sa structure. Les travaux d'Herczenik et al. ont ainsi permis de déterminer un rôle prédominant du domaine C1 du FVIII : l'endocytose du FVIII par des MO-DCs humaines se fait par l'intermédiaire du domaine C1, son blocage par un anticorps monoclonal (Km33) entraînant l'abrogation complète de l'internalisation du FVIII (Herczenik et al., 2012a). Par ailleurs, le blocage par Km33 du domaine C1 du FVIII *in vivo* dans un modèle murin d'hémophilie A sévère empêche la génération d'une réponse immunitaire anti-FVIII. Une étude ultérieure menée par Wroblewska et al. a confirmé ces résultats en créant un FVIII muté dans l'épitope de Km33 (R2090A/K2092A/F2093A). La capture de ce FVIII par des CPA humaines comme murines et son immunogénicité *in vivo* étaient toutes deux drastiquement réduites (Wroblewska et al., 2012).

Le domaine C1 constitue avec le domaine C2 les domaines du FVIII qui interagissent avec les surfaces phospholipidiques. Les domaines C présentent de fortes homologies en termes de séquences polypeptidiques : tous deux sont riches en acides aminés basiques et en acides aminés hydrophobes, essentiels à l'interaction avec les phospholipides. Une approche *in silico* menée par Liu et al. a mis en évidence de très fortes homologies de conformation tridimensionnelle (Liu et al., 2000). Plus récemment, des études de cristallographie ont montré que le domaine C1 s'orientait dans l'espace de la même façon que le domaine C2 au sein du FVIII (Shen et al., 2008). Les travaux de Gilbert et al. ont étayé ces résultats en montrant que le domaine C2

présentait des protrusions riches en acides aminés hydrophobes capables de pénétrer à l'intérieur des membranes phospholipidiques (Gilbert et al., 2002). Enfin, Lü et al. ont montré par des expériences de mutagenèse dirigée l'existence d'acides aminés dans le domaine C1 capables d'interagir avec des surfaces phospholipidiques, dont les acides aminés R2090, K2092 et F2093 précédemment mentionnés (Lü et al., 2011).

Le domaine C2 présente de fortes similitudes avec le domaine C1. Partant de ces observations, j'ai donc posé comme hypothèse qu'à l'instar du domaine C1, le domaine C2 pouvait également jouer un rôle dans la capture et l'immunogénicité du FVIII.

Rôle du domaine C2 dans les étapes précoces de la réponse immunitaire anti-FVIII

Dans une première approche, la contribution du domaine C2 a été évaluée à l'aide d'un anticorps monoclonal BO2C11. BO2C11 est une immunoglobuline humaine de classe G et de sous-classe G4 κ produite à partir d'un clone de lymphocyte B mémoire isolé à partir d'un patient hémophile A avec inhibiteurs. BO2C11 se lie au domaine C2 du FVIII et bloque sa capacité à interagir avec les membranes phospholipidiques (Spiegel et al., 2001). Les résultats de mon étude montrent que, de manière similaire à ce qui a été observé avec le domaine C1 (Herczenik et al., 2012a), l'inhibition du domaine C2 par BO2C11 empêche la capture du FVIII par des CPA et sa présentation antigénique *in vitro*. Par ailleurs, cette inhibition est restreinte à certains acides aminés du domaine C2 étant donné que la fixation d'un autre anticorps monoclonal sur le domaine C2 (ESH-8) n'affecte pas l'internalisation du FVIII. Enfin, l'administration de FVIII complexé à la portion F(ab')₂ de BO2C11 est associée à une réponse immunitaire moindre *in vivo*. Il est à noter que BO2C11 est également capable de bloquer l'interaction du FVIII avec le vWF (Spiegel et al., 2001). Étant donné que le vWF participe au maintien de la biodisponibilité du FVIII en circulation, il est possible que la réduction de l'immunogénicité observée *in vivo* soit la conséquence d'une clairance plus rapide du FVIII et non pas d'une reconnaissance moindre du domaine C2 par les CPA. L'administration d'un FVIII muté incapable d'interagir avec le vWF en complexe avec BO2C11 a permis de retrouver une réduction de la réponse immunitaire similaire à ce qui avait été observé précédemment. Les résultats suggèrent donc un rôle important des acides aminés localisés au sein de l'épitope de BO2C11 sur le domaine C2 du FVIII.

Il est intéressant de noter qu'en inhibant le domaine C1 par l'anticorps Km33, l'endocytose est complètement abrogée. Il en est de même lorsqu'on bloque le domaine C2 du FVIII avec l'anticorps BO2C11. Comment expliquer que les deux phénomènes soient possibles ? Il est

— DISCUSSION —

possible que la fixation de l'un ou l'autre des deux anticorps entraîne une gêne stérique ou un changement de conformation du FVIII suffisant pour empêcher le domaine homologue d'interagir avec la membrane des CPA. De manière alternative, une contribution simultanée des deux domaines C pourrait être importante pour une liaison suffisamment stable pour permettre une internalisation du FVIII.

Dans une seconde approche, pour confirmer le rôle du domaine C2 dans la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII, des acides aminés de l'épitope ciblé par BO2C11 sur le FVIII ont été mutés: il s'agit de l'Arg2215 et de l'Arg2220, qui ont également été précédemment identifiées comme étant au contact des membranes phospholipidiques lors d'une interaction avec le FVIII (Gilbert et al., 2002; Lin et al., 2015; Spiegel et al., 2001). La fonctionnalité et l'intégrité conformationnelle des mutants générés ont été confirmées. D'autre part, conformément aux travaux de Lin et al., les mutants Arg2215Ala, Arg2220Ala et Arg2215Ala-Arg2220Ala présentaient des capacités de liaison à BO2C11 réduites (Lin et al., 2015).

Similaires au FVIII muté dans le domaine C1 (Arg2090Ala/Lys2092Ala/Phe2093Ala) (Wroblewska et al., 2012), les FVIII mutants du domaine C2 présentent une réduction importante de leur endocytose et de leur présentation antigénique par des MO-DCs humaines et BM-DCs murines. Toutefois, les différentes mutations du FVIII n'ont pas modifié l'immunogénicité de ces derniers une fois administrés chez des souris déficientes en FVIII. De manière inattendue, cela était également le cas du FVIII muté en C1 alors qu'il avait été décrit comme étant moins immunogène *in vivo* dans un modèle murin d'hémophilie A sévère (Wroblewska et al., 2012). Ainsi, les résidus liant les phospholipides du domaine C2 mais aussi du domaine C1 contribuent-ils à la capture du FVIII, du moins *in vitro*.

Il est alors possible d'imaginer un rôle synergique des régions liant les phospholipides dans les domaines C du FVIII pour l'internalisation du FVIII et la présentation antigénique par des CPA *in vitro*. Si les mutations introduites sont suffisantes pour altérer l'endocytose du FVIII *in vitro*, il est possible en revanche *in vivo* qu'elles ne le soient pas pour réduire significativement la réponse immunitaire anti-FVIII. Des études supplémentaires de mutagenèse dirigée ciblant des acides aminés supplémentaires présents sur l'épitope de BO2C11 pourraient lever le voile sur l'implication *in vivo* d'autres résidus chargés ou hydrophobes dont la mutation pourrait potentialiser l'effet observé *in vitro*. Enfin, il n'est pas exclu non plus que l'effet des mutations soit masqué *in vivo* par certains facteurs présents dans l'organisme, par exemple le vWF, comme cela sera discuté ultérieurement.

Voies d'internalisation pour le FVIII

Si les résultats de la troisième étude suggèrent un rôle prédominant de certains résidus liant les phospholipides localisés dans les domaines C dans l'interaction du FVIII sur les CPA et sa prise en charge par des CPA, il n'en reste pas moins que le mécanisme d'internalisation d'un antigène demeure un processus cellulaire actif et que la simple fixation du FVIII à la membrane lipidique est insuffisante pour entraîner son internalisation.

Des travaux menés au laboratoire par Dasgupta et al. avaient permis de découvrir que le traitement au préalable des MO-DCs avec de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) bloquait complètement l'internalisation du FVIII par ces cellules, ce qui suggère que l'endocytose du FVIII nécessite la présence d'ions divalents (Dasgupta et al., 2007a). Dans cette étude, les auteurs avaient identifié le CD206 comme récepteur d'endocytose du FVIII ; son inhibition entraînait une réduction de la présentation antigénique du FVIII à des LT CD4⁺ spécifiques. Le blocage du CD206 par un antagoniste spécifique a toutefois seulement diminué de moitié la quantité de FVIII internalisée par les MO-DCs, suggérant ainsi l'existence d'autres voies d'entrée pour le FVIII. Par ailleurs, dans le système expérimental mis en place, la macropinocytose ne semblait jouer qu'un rôle marginal dans le processus d'internalisation du FVIII.

Il avait été suggéré auparavant que l'endocytose du FVIII se déroulait en deux étapes et nécessitait au préalable une « pré-concentration » du FVIII à la surface des cellules après quoi il était transféré à un récepteur pour être endocyté (Sarfanov et al., 2001). Cette étape préliminaire mobiliserait les HSPG retrouvés dans la matrice extracellulaire des CPA. Si l'hypothèse des protéoglycanes à la surface des cellules a été remise en question dans les travaux de Herczenik et al. ainsi que dans ceux de Meems et al. (Herczenik et al., 2012a; Meems et al., 2011), le modèle de pré-concentration n'en reste donc pas moins plausible : le FVIII pourrait effectivement interagir avec un premier récepteur, HSPG ou autre, pour s'accumuler à la surface des cellules avant d'être pris en charge par un second récepteur pour être internalisé.

Enfin, les résultats de ma thèse sur le rôle du complément sur l'endocytose du FVIII permettent d'imaginer un rôle des récepteurs aux fragments C3b et au composant C1q du complément comme médiateurs dans le cadre de l'endocytose du FVIII en présence de complément. Des résultats préliminaires ont permis d'avancer que le complément pourrait jouer un rôle additif ou synergique aux mécanismes précédemment décrits : en effet, alors que l'introduction de mutations dans le domaine C1 abroge l'endocytose du FVIII par des MO-DCs, la présence de

complément dans le microenvironnement permet de restaurer l'internalisation du FVIII par ces CPA (**Figure 14**), confirmant ainsi l'existence de voies alternatives à celles impliquant les domaines C du FVIII, en tout cas *in vitro*.

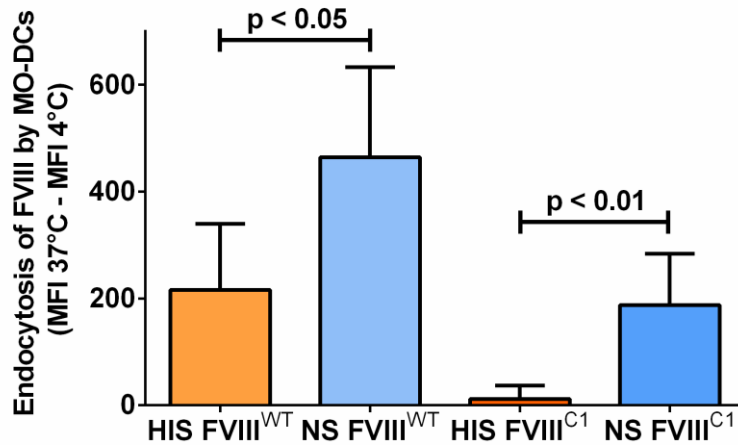


Figure 14. Internalisation du FVIII muté dans le domaine C1 en présence de complément. Du FVIII normal (FVIII^{WT}) ou muté en Arg2090Ala/Lys2092Ala/Phe2093Ala dans le domaine C1 (FVIII^{C1}) ont été pré-incubés dans 20% de sérum AB humain normal (NS) ou inactivé à la chaleur (HIS) pendant 1h à 37°C. Les échantillons ont ensuite été incubés en présence de MO-DCs âgées de 5 jours pendant 2h à 4°C ou 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et le FVIII endocyté détecté à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-FVIII (clone 77IP52H7) couplé au FITC. La valeur d'intensité médiane de fluorescence (MFI) mesurée à 4°C a été retirée de celle obtenue à 37°C, pour éliminer le signal dû à la liaison du FVIII à la surface. Les résultats sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

Ainsi, l'ensemble des résultats de ma thèse permet de dresser une liste de mécanismes potentiels à l'origine de l'internalisation du FVIII par des CPA professionnelles (**Figure 15**).

En absence de complément, les résultats obtenus permettent d'imaginer un modèle d'internalisation « en deux étapes », dans lequel le FVIII pourrait se fixer directement via ses domaines C à la membrane plasmique des CPA. Toutefois, l'endocytose nécessitant un mécanisme actif, il se pourrait dans un second temps que le FVIII interagisse avec des récepteurs d'endocytose à la surface des CPA pour entrer à l'intérieur des cellules. Dans ce modèle en deux étapes, le FVIII pourrait également se fixer dans un premier temps à un récepteur exprimé sur les CPA (ex : HSPG), potentiellement via ses domaines C, pour être pré-concentré à la surface des CPA, avant d'être pris en charge dans un second temps par un récepteur d'endocytose. Le modèle « en une étape » décrit dans la littérature reste valable : il est possible d'imaginer que le FVIII se fixe à un récepteur de surface sur les CPA (ex : CD206) pour être ensuite directement endocyté.

En présence du complément, le FVIII peut en plus interagir avec ses composants ou avec les fragments générés suite à l'activation du complément dans le microenvironnement. Ces molécules peuvent se lier aux récepteurs du complément exprimés à la surface des CPA et impliqués dans les processus de phagocytose. Dans cette configuration, les molécules du complément servent de médiateurs à l'internalisation du FVIII. Enfin, on peut imaginer un modèle dans lequel le FVIII se pré-concentre à la surface des CPA via ses domaines C, avant d'interagir avec les molécules du complément dans le microenvironnement. Les complexes formés pourraient alors se lier à des récepteurs d'endocytose pour induire l'entrée du FVIII dans les CPA.

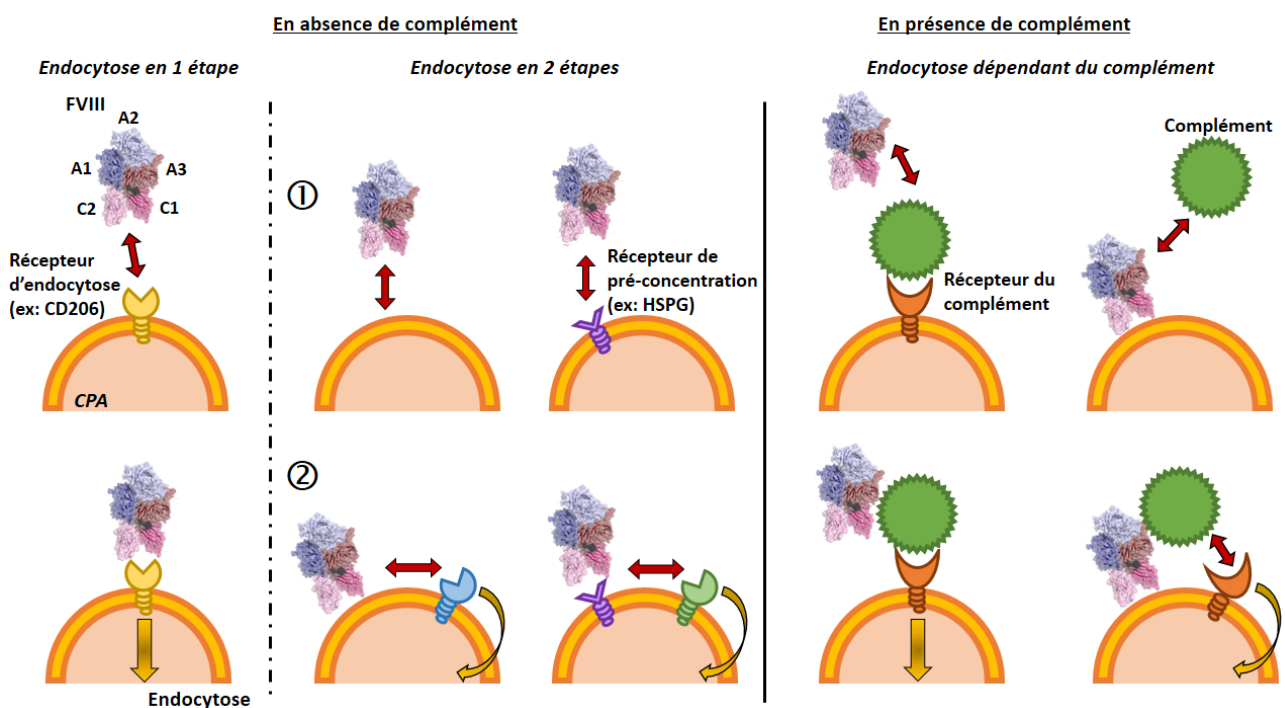


Figure 15. Mécanismes potentiels d'endocytose du FVIII par les CPA. Le modèle *en une étape* représente l'internalisation du FVIII par l'intermédiaire d'un récepteur qui se lie le FVIII de manière spécifique et qui déclenche le processus d'endocytose une fois le FVIII fixé. Le modèle *en deux étapes* réunit plusieurs mécanismes : le FVIII interagit dans un premier temps soit avec la membrane des CPA directement via ses domaines C soit avec un récepteur pour être pré-concentré à la surface des CPA. Dans un second temps, le FVIII est transféré à un récepteur qui déclenche l'endocytose du FVIII. Dans le modèle *dépendant du complément*, les molécules du complément peuvent se lier aux récepteurs du complément exprimés à la surface des CPA et servir de médiateurs au FVIII. Il est possible que le FVIII se pré-concentre à la surface des CPA via ses domaines C, avant d'interagir avec les molécules du complément. Les complexes formés permettraient l'entrée du FVIII dans les CPA via une interaction avec des récepteurs du complément (D'après (van Haren et al., 2012)).

Précaution quant à l'extrapolation des résultats *in vivo* : le rôle complexe du vWF

L'une des limites dans les travaux présentés dans cette thèse ainsi que dans l'étude de manière générale de l'immunogénicité du FVIII demeure le recours à des modèles expérimentaux *in vitro* réducteurs qui ne se focalisent que sur le FVIII. Ces derniers ne reflètent pas fidèlement la complexité et les cinétiques des interactions cellulaires et moléculaires qui surviennent en physiologie. En effet, le FVIII circule dans le sang complexé à sa protéine chaperonne, le vWF. Le vWF transporte le FVIII aux sites de saignement et le protège d'un catabolisme prématuré. Or, de nombreuses études *in vitro* sont conduites en absence de VWF et écartent donc une interférence éventuelle de cette molécule sur les phénomènes étudiés.

Plusieurs travaux ont été menés au laboratoire pour déterminer l'impact du vWF sur la réponse immunitaire anti-FVIII. Dasgupta et al. ont ainsi clairement montré *in vitro* que le vWF empêchait quasi-complètement l'endocytose du FVIII par des MO-DCs humaines, conduisant ainsi à une présentation antigénique à des LT CD4⁺ spécifiques marginale (Dasgupta et al., 2007b). Ces résultats ont été confirmés par la suite (Herczenik et al., 2012a; Sorvillo et al., 2016). Bien que le mécanisme exact soit inconnu, il est possible que le vWF provoque une gêne stérique ou un phénomène de compétition qui empêcherait l'interaction du FVIII aux surfaces phospholipidiques ou des récepteurs de surface. *In vivo*, Delignat et al. ont montré que l'administration chez des souris hémophiles A sévères de FVIII dérivé de plasma, qui contient entre autres du vWF, induisait une réponse immunitaire anti-FVIII plus faible que l'injection de FVIII d'origine recombinante. D'autre part, la co-administration de FVIII avec du vWF recombinant exogène en excès réduisait les titres en anticorps inhibiteurs anti-FVIII (Behrmann et al., 2002; Delignat et al., 2012). Toutefois, il est à noter que le vWF humain étant également immunogène chez la souris, la réduction de l'immunogénicité du FVIII pourrait être due à une compétition antigénique (Reipert et al., 2003). Néanmoins, l'ensemble des résultats acquis permet d'affirmer que le vWF est capable de perturber la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII.

Dans la troisième étude de ma thèse, si les mutations introduites dans les domaines C du FVIII altéraient l'internalisation et la présentation antigénique du FVIII *in vitro*, en absence de vWF, elles ne modifient en rien l'immunogénicité de la molécule *in vivo* une fois administrée à des souris déficientes en FVIII. Cependant, la réponse immunitaire anti-FVIII était réduite *in vivo* pour le FVIII muté sur le domaine C1 si ce dernier était administré à des souris déficientes à la

fois en FVIII et en vWF. Ceci suggère que le vWF peut moduler l'immunogénicité du FVIII en masquant l'effet protecteur de la mutation introduite.

Le vWF présente donc un rôle ambigu et plusieurs études récentes se sont attachées à mieux l'évaluer : ainsi Van Schooten et al. ont-ils montré que le FVIII administré à des souris était co-localisé avec le vWF au niveau des macrophages de la rate et du foie (van Schooten et al., 2008), ce qui indique que le complexe FVIII/vWF pouvait être endocyté ensemble. *In vitro*, Sorvillo et al. ont par la suite observé que les MO-DCs étaient incapables d'internaliser le vWF (Sorvillo et al., 2016). Enfin, Castro-Nunez et al. ont observé que l'endocytose du FVIII en condition statique par des macrophages dérivés de monocytes humains était réprimée par la présence de vWF (Castro-Núñez et al., 2012), à l'instar des observations que nous avons faites sur les MO-DCs (Dasgupta et al., 2007b). Toutefois, à l'image des forces de friction exercées par le sang sur l'endothélium vasculaire, si une contrainte de cisaillement est appliquée sur les macrophages, le vWF perd son caractère protecteur et le complexe FVIII/vWF formé est alors endocyté par les cellules. Pour finir, les résultats de la première étude de ma thèse montrent que la présence de vWF dans le sérum humain utilisé comme source de complément ne module en rien l'effet adjuvant du complément sur l'endocytose et la présentation antigénique du FVIII par des CPA professionnelles. Ces résultats sont extrêmement importants car ils suggèrent un rôle protecteur du vWF sur certains mécanismes d'endocytose, mais pas sur ceux qui sont dépendants des molécules du complément. Des études approfondies sont donc nécessaires pour clarifier la contribution réelle du vWF à l'immunogénicité du FVIII *in vivo* et déterminer de quelle manière, où et sous quelle forme le FVIII est capturé par le système immunitaire.

3. Implications thérapeutiques potentielles

La survenue d'anticorps inhibiteurs chez les patients hémophiles A et le recours à des stratégies thérapeutiques alternatives et contraignantes ne facilitent en rien la prise en charge des patients. Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent qu'il est possible de moduler la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII de plusieurs manières. Celles-ci pourraient potentiellement être appliquées à terme en clinique.

Le développement d'outils pour moduler ou interférer avec le système du complément fait actuellement l'objet d'un intérêt croissant. En effet, de nombreuses études indiquent une contribution majeure sinon importante du complément dans plusieurs pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou encore le syndrome hémolytique et urémique atypique (Wagner and Frank, 2010; Morgan and Harris, 2015).

— DISCUSSION —

Plusieurs médicaments ciblant l'activation du complément ont ainsi déjà reçu l'autorisation de mise sur le marché et sont à l'heure actuelle utilisés en thérapie (inhibition du composant C5 avec l'éculizumab (Soliris®), inhibition de la voie classique avec des inhibiteurs de sérine protéases (Berinert®, Cinzyze®)) tandis que d'autres donnent des résultats prometteurs dans des essais cliniques. Le ciblage thérapeutique de l'activation du complément constitue donc une piste intéressante qui pourrait être appliquée pour moduler l'immunogénicité des protéines thérapeutiques.

Ma stratégie d'avoir recours au CVFh, molécule dérivée du composant C3b humain et mutée pour présenter l'activité catalytique d'un activateur du complément, a permis de réduire de manière spécifique la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII exogène administré chez la souris hémophile et ce, en déplaçant le complément sur un laps de temps court (24 heures). D'autre part, le traitement n'a en rien altéré la biodisponibilité du FVIII dans le sang et aucune immunogénicité entravant la fonction du CVFh n'a été constatée (observation personnelle). Notre stratégie dispose donc de propriétés intéressantes à première vue en termes de toxicité et de pharmacocinétique. Mes résultats indiquent cependant que la modulation du complément au cours d'une réponse secondaire dirigée contre le FVIII n'altère pas l'immunogénicité de la protéine thérapeutique. En procédant à un parallèle avec les patients, mes résultats suggèrent que la déplétion transitoire du complément n'aurait un impact sur la réponse immunitaire anti-FVIII que chez des sujets n'ayant jamais été sensibilisés au FVIII. La thérapie devrait donc être réalisée en même temps que les premières injections de FVIII chez les patients, ce qui en pratique n'est pas forcément aisé, notamment du point de vue éthique, compte tenu de l'incidence des anticorps inhibiteurs chez les patients hémophiles et de la population majoritairement pédiatrique. Des études sont donc nécessaires pour approfondir et améliorer cette stratégie avant de l'envisager dans notre arsenal thérapeutique dans l'hémophilie A.

L'étude des domaines C du FVIII dans la réponse immunitaire anti-FVIII a, quant à elle, souligné l'importance de la structure du FVIII pour sa reconnaissance et sa prise en charge par le système immunitaire. On sait qu'il existe sur le marché à l'heure actuelle plusieurs formes de FVIII dont la structure est expressément modifiée pour acquérir de nouvelles caractéristiques : FVIII couplé au fragment Fc ou au polyéthylène glycol. Le FVIII présentant une demi-vie courte, ces FVIII de dernière génération, modifiés par bio-ingénierie, disposent d'un temps de circulation dans le sang allongé (multiplié par 1,5, (Ing et al., 2016)).

— DISCUSSION —

Il serait donc intéressant de voir si des modifications supplémentaires peuvent apporter des fonctions nouvelles au FVIII, en l'occurrence, une réduction de son immunogénicité. Cependant, mes résultats obtenus *in vivo* indiquent que les mutations des domaines C ne réduisent la réponse immunitaire anti-FVIII qu'en l'absence de vWF. Or, les patients hémophiles ne présentent pas de déficit combiné en FVIII et en vWF : les perspectives d'application clinique sont donc faibles de ce point de vue. Une solution alternative serait toutefois de parvenir à générer un FVIII muté sur ses domaines C et qui ne se fixerait pas au vWF. Cependant, le vWF étant la molécule chaperonne du FVIII et celle qui assure la biodisponibilité du FVIII, le FVIII muté devra également être modifié pour avoir une demi-vie similaire à celle du FVIII natif, si ce n'est pas meilleur, pour ainsi présenter un avantage compétitif par rapport aux autres formes de FVIII actuellement disponibles sur le marché. De nombreuses études demeurent donc indispensables avant de pouvoir envisager l'utilisation d'une telle molécule pour prévenir l'apparition de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII.

CONCLUSIONS

— CONCLUSIONS —

L'immunogénicité du FVIII thérapeutique et l'apparition consécutive d'anticorps neutralisants constituent un frein majeur au traitement des patients hémophiles A. Bien que de nombreux travaux ont été réalisés et ont permis de mieux comprendre le déroulement de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII, les mécanismes à l'origine de l'initiation de la réponse immunitaire restent encore à être découverts. Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence de nouveaux facteurs participant à l'endocytose du FVIII par des CPA professionnelles.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai mis en évidence une contribution du système du complément dans la réponse immunitaire primaire anti-FVIII. Le complément est capable de moduler *in vivo* la survenue d'anticorps inhibiteurs dans un modèle murin d'hémophilie A sévère. Les résultats obtenus *in vitro* suggèrent que l'activation du complément et la génération consécutive de fragments C3b mais également le composant C1q du complément facilitent l'internalisation du FVIII par les CPA et sa présentation antigénique à des lymphocytes T spécifiques. Alors que le complément est connu pour ses implications dans les réponses immunitaires contre les agents pathogènes, il s'agit à notre connaissance de la première description de l'implication du système du complément dans les réponses immunitaires dirigées contre une protéine thérapeutique.

De plus, tous les travaux menés sur le FVIII jusqu'à présent avaient ignoré le rôle potentiel du complément, pourtant bien présent *in vivo*. Des études complémentaires seront nécessaires pour élucider les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'endocytose du FVIII par les CPA en présence de complément. Les résultats obtenus ouvrent un vaste champ de questions : y a-t-il d'autres composants du complément susceptibles de participer à la capture du FVIII mais aussi à l'ensemble de la réponse immunitaire anti-FVIII ? En particulier, les fragments C3b peuvent être inactivés et convertis en plusieurs sous-fragments successifs aux rôles physiologiques multiples : le fragment C3d est un fragment capable d'amplifier les réponses immunitaires. A l'inverse, le fragment iC3b présente des propriétés tolérogènes. A l'instar du fragment iC3b, le composant C1q a fréquemment été impliqué dans l'induction de tolérance immunitaire. Ainsi serait-il pertinent, pour apprécier le rôle du complément, de disséquer les implications éventuelles de ces autres molécules du complément et de déterminer leurs rôles potentiels opposés ou synergiques. Enfin, que se passe-t-il *in vivo* ? De quelle manière le complément peut-il être impliqué ? Une étude menée au laboratoire avait montré un rôle prépondérant de la rate dans la mise en place de la réponse immunitaire primaire dirigée contre le FVIII, notamment des macrophages métallophiliques de la zone marginale splénique (Navarrete et al., 2009). Il serait intéressant de déterminer l'expression des récepteurs du complément à leur

— CONCLUSIONS —

surface et voir si ces derniers pourraient être impliqués dans l'induction de la réponse immunitaire anti-FVIII.

De nombreux traitements ciblant les molécules du complément existent actuellement pour réprimer une activation du complément dans le cas de rejets de greffe, de sepsis ou de dégénérescence maculaire liée à l'âge, ou, *a contrario*, stimuler son activité dans le cas d'infections bactériennes ou de cancers (Melis et al., 2015). Certains traitements favorisent la réactivité du complément tandis que d'autres stimulent des processus tolérogènes. Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour déterminer si le complément peut constituer une cible potentielle, des résultats concluants pourraient déboucher à terme sur des nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des modulateurs du complément pour prévenir l'apparition d'allo-anticorps anti-FVIII.

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai mis en évidence un rôle du domaine C2 dans l'immunogénicité du FVIII. L'inhibition du domaine C2 empêche l'apparition de la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII *in vivo*. Les résultats obtenus *in vitro* soulignent, à l'instar du domaine C1, l'importance du domaine C2 pour l'endocytose et la présentation antigénique du FVIII par des CPA professionnelles, notamment un rôle majeur de l'acide aminé Arg2215 pour la reconnaissance du FVIII par les cellules. Il est probable que les deux domaines C du FVIII agissent de concert pour permettre sa fixation sur les CPA et son internalisation, toutefois, en absence de vWF. Mes travaux soulignent également le rôle complexe du vWF, seulement en absence duquel l'immunogénicité des FVIII mutés en C1 et C2 est réduite *in vivo*. Il est possible que la liaison du vWF au FVIII entraîne un changement de conformation ne permettant pas aux domaines C d'être exposés, ce qui empêcherait l'interaction du FVIII avec des récepteurs exprimés à la surface des CPA. Ainsi, des études approfondies de l'interaction entre le FVIII et le vWF sont-elles nécessaires pour mieux cerner comment le vWF peut influencer l'immunogénicité du FVIII.

Notre observation d'une immunogénicité du FVIII identique que celui-ci soit ou non capable de se lier au vWF, soulève des interrogations : comment expliquer qu'un FVIII dont la demi-vie est de 18 minutes soit aussi immunogène qu'un FVIII circulant pendant 7 heures ? Il est possible que le FVIII soit plus facilement reconnu et pris en charge par les CPA en absence de vWF mais des travaux doivent être réalisés pour répondre à cette interrogation. Enfin, ces résultats posent finalement la question de la façon par laquelle le FVIII est reconnu *in vivo* par les CPA : sous forme libre ou sous forme de complexe FVIII/vWF ? Sous sa forme activée ?

— CONCLUSIONS —

Les études récentes ont permis d'apporter des éléments de réponse à ces interrogations mais il reste beaucoup à faire pour mieux comprendre le processus de reconnaissance du FVIII par le système immunitaire.

En conclusion, mon travail de thèse a mis en évidence la contribution du système du complément, cet acteur majeur du système immunitaire et de l'inflammation, dans la réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique et largement ignoré jusqu'à présent dans l'étude de l'immunogénicité du FVIII. Mon travail a également permis de pointer le rôle prédominant de certains déterminants structurels du FVIII pour expliquer sa prise en charge par le système immunitaire. Enfin, mes résultats soulignent les limites des modèles expérimentaux utilisés actuellement dans l'étude de l'immunogénicité du FVIII. Des études approfondies pour déterminer exactement l'implication du complément dans l'immunogénicité du FVIII ainsi que les récepteurs cellulaires impliqués dans l'internalisation du FVIII sont nécessaires. Elles permettraient à terme le développement de FVIII thérapeutiques moins immunogènes ou encore la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques immuno-modulatrices.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

— BIBLIOGRAPHIE —

- Ahearn, J.M., Fischer, M.B., Croix, D., Goerg, S., Ma, M., Xia, J., Zhou, X., Howard, R.G., Rothstein, T.L., and Carroll, M.C. (1996). Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 4, 251–262.
- Aksamit, R.R., Falk, W., and Leonard, E.J. (1981). Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 126, 2194–2199.
- Aledort, L.M., and Dimichele, D.M. (1998). Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 4, 68.
- Algiman, M., Dietrich, G., Nydegger, U.E., Boieldieu, D., Sultan, Y., and Kazatchkine, M.D. (1992). Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3795–3799.
- Amano, K., Sarkar, R., Pemberton, S., Kemball-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.
- Amara, U., Flierl, M.A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Brückner, U.B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J.D., et al. (2010). Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 5628–5636.
- Ando, B., Wiedmer, T., Hamilton, K.K., and Sims, P.J. (1988). Complement proteins C5b-9 initiate secretion of platelet storage granules without increased binding of fibrinogen or von Willebrand factor to newly expressed cell surface GPIIb-IIIa. *J. Biol. Chem.* 263, 11907–11914.
- Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A., and Nakamura, M. (2006). Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J.* 20, 1964–1973.
- 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.
- Armstrong, J.K., Hempel, G., Koling, S., Chan, L.S., Fisher, T., Meiselman, H.J., and Garratty, G. (2007). Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 110, 103–111.
- Astermark, J. (2006). Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 12 Suppl 3, 52–60.
- Astermark, J., Berntorp, E., White, G.C., Kroner, B.L., and MIBS Study Group (2001). The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 7, 267–272.
- Astermark, J., Oldenburg, J., Carlson, J., Pavlova, A., Kavakli, K., Berntorp, E., and Lefvert, A.-K. (2006a). Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 108, 3739–3745.
- Astermark, J., Oldenburg, J., Pavlova, A., Berntorp, E., Lefvert, A.-K., and MIBS Study Group (2006b). 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.

— BIBLIOGRAPHIE —

- 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.
- Avril, T., Freeman, S.D., Attrill, H., Clarke, R.G., and Crocker, P.R. (2005). Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 19843–19851.
- Barilla-LaBarca, M.L., Liszewski, M.K., Lambris, J.D., Hourcade, D., and Atkinson, J.P. (2002). Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 6298–6304.
- Barnett, L.G., Simkins, H.M.A., Barnett, B.E., Korn, L.L., Johnson, A.L., Wherry, E.J., Wu, G.F., and Laufer, T.M. (2014). B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 3607–3617.
- Barrington, R.A., Pozdnyakova, O., Zafari, M.R., Benjamin, C.D., and Carroll, M.C. (2002). B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and FcγRIIB receptors. *J. Exp. Med.* 196, 1189–1199.
- Basilico, F., Nardini, I., Mori, F., Brambilla, E., Benazzi, L., De Palma, A., Rosti, E., Farina, C., and Mauri, P. (2010). Characterization of factor VIII pharmaceutical preparations by means of MudPIT proteomic approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 50–57.
- Behrmann, M., Pasi, J., Saint-Remy, J.-M.R., Kotitschke, R., and Kluft, M. (2002). Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a hemophilia A mouse model. *Thromb. Haemost.* 88, 221–229.
- Bhopale, G.M., and Nanda, R.K. (2003). Blood coagulation factor VIII: An overview. *J. Biosci.* 28, 783–789.
- Bloem, E., Meems, H., van den Biggelaar, M., Mertens, K., and Meijer, A.B. (2013). A3 domain region 1803-1818 contributes to the stability of activated factor VIII and includes a binding site for activated factor IX. *J. Biol. Chem.* 288, 26105–26111.
- Blom, A.M., Webb, J., Villoutreix, B.O., and Dahlbäck, B. (1999). A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. *J. Biol. Chem.* 274, 19237–19245.
- Bobak, D.A., Gaither, T.A., Frank, M.M., and Tenner, A.J. (1987). Modulation of FcR function by complement: subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture-derived macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 138, 1150–1156.
- Bohlsón, S.S., Fraser, D.A., and Tenner, A.J. (2007). Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol. Immunol.* 44, 33–43.
- 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.
- Bovenschen, N., Herz, J., Grimbergen, J.M., Lenting, P.J., Havekes, L.M., Mertens, K., and van Vlijmen, B.J.M. (2003). Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* 101, 3933–3939.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Bovenschen, N., Rijken, D.C., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J.M., and Mertens, K. (2005). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 1257–1265.
- Bowen, D.J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol. Pathol. MP* 55, 127–144.
- 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.
- van den Brink, E.N., Turenhout, E.A., Bank, C.M., Fijnvandraat, K., Peters, M., and Voorberg, J. (2000). Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain. *Blood* 96, 540–545.
- Brodeur, S.R., Angelini, F., Bacharier, L.B., Blom, A.M., Mizoguchi, E., Fujiwara, H., Plebani, A., Notarangelo, L.D., Dahlback, B., Tsitsikov, E., et al. (2003). C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity* 18, 837–848.
- Brody, N.I., and Siskind, G.W. (1969). Studies on antigenic competition. *J. Exp. Med.* 130, 821–832.
- Bubeck, D. (2014). The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 1908–1915.
- Capasso, M., Durrant, L.G., Stacey, M., Gordon, S., Ramage, J., and Spendlove, I. (2006). Costimulation via CD55 on human CD4+ T cells mediated by CD97. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 1070–1077.
- Carcao, M.D., and Aledort, L. (2004). Prophylactic factor replacement in hemophilia. *Blood Rev.* 18, 101–113.
- Carpenter, S.L., Michael Soucie, J., Sterner, S., Presley, R., and Hemophilia Treatment Center Network (HTCN) Investigators (2012). Increased prevalence of inhibitors in Hispanic patients with severe haemophilia A enrolled in the Universal Data Collection database. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 18, e260-265.
- Carroll, M.C. (2000). The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv. Immunol.* 74, 61–88.
- Carter, R.H., and Fearon, D.T. (1992). CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256, 105–107.
- Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., Kolta, A., Kiladjian, J.-J., Martin-Dupont, P., Michaud, P., Papo, T., Ugo, V., Teyssandier, I., et al. (2002). Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* 346, 469–475.
- Castro-Núñez, L., Dienava-Verdoold, I., Herczenik, E., Mertens, K., and Meijer, A.B. (2012). Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 1929–1937.
- Chalmers, E.A., Brown, S.A., Keeling, D., Liesner, R., Richards, M., Stirling, D., Thomas, A., Vidler, V., Williams, M.D., Young, D., et al. (2007). Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 13, 149–155.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Chang, C.P., Zhao, J., Wiedmer, T., and Sims, P.J. (1993). Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* *268*, 7171–7178.
- Cherukuri, A., Cheng, P.C., and Pierce, S.K. (2001). The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 163–172.
- Collins, P.W., Palmer, B.P., Chalmers, E.A., Hart, D.P., Liesner, R., Rangarajan, S., Talks, K., Williams, M., Hay, C.R.M., and UK Haemophilia Centre Doctors' Organization (2014). Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000–2011. *Blood* *124*, 3389–3397.
- Connolly, N.P., Jones, M., and Watt, S.M. (2002). Human Siglec-5: tissue distribution, novel isoforms and domain specificities for sialic acid-dependent ligand interactions. *Br. J. Haematol.* *119*, 221–238.
- Cooper, G.M. (2000). Structure of the Plasma Membrane.
- Crispe, I.N. (2011). Liver antigen-presenting cells. *J. Hepatol.* *54*, 357–365.
- Crocker, P.R., and Varki, A. (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology* *103*, 137–145.
- Csomor, E., Bajtay, Z., Sándor, N., Kristóf, K., Arlaud, G.J., Thiel, S., and Erdei, A. (2007). Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Mol. Immunol.* *44*, 3389–3397.
- 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.
- Da Costa, X.J., Brockman, M.A., Alicot, E., Ma, M., Fischer, M.B., Zhou, X., Knipe, D.M., and Carroll, M.C. (1999). Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 12708–12712.
- Daniele, F., Rossi, V., and Santoro, C. (2011). Effective management of intracranial haemorrhage with continuous infusion of highly purified von Willebrand factor/factor VIII complex concentrate in an adult with severe haemophilia A. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* *9*, 472–474.
- Dasgupta, S., Navarrete, A.-M., Bayry, J., Delignat, S., Wootla, B., André, S., Christophe, O., Nascimbeni, M., Jacquemin, M., Martinez-Pomares, L., et al. (2007a). A role for exposed mannans in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 8965–8970.
- 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. (2007b). VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* *109*, 610–612.
- Dasgupta, S., Bayry, J., André, S., Dimitrov, J.D., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2008a). Auditing protein therapeutics management by professional APCs: toward prevention of immune responses against therapeutic proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 1609–1615.
- 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. (2008b). Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica* *93*, 83–89.
- De Groot, A.S., and Scott, D.W. (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol.* *28*, 482–490.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Degn, S.E., Thiel, S., Nielsen, O., Hansen, A.G., Steffensen, R., and Jensenius, J.C. (2011). MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene. *J. Immunol. Methods* 373, 89–101.
- 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.
- Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., and Fearon, D.T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348–350.
- von Depka, M. (2005). Managing acute bleeds in the patient with haemophilia and inhibitors: options, efficacy and safety. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 11 Suppl 1, 18–23.
- Di Michele, D.M. (1998). Immune tolerance: a synopsis of the international experience. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 4, 568–573.
- DiMichele, D. (2007). Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *Br. J. Haematol.* 138, 305–315.
- Drouin, S.M., Corry, D.B., Kildsgaard, J., and Wetsel, R.A. (2001). Cutting edge: the absence of C3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *J. Immunol. Baltim. Md* 167, 4141–4145.
- Dunkelberger, J.R., and Song, W.-C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20, 34–50.
- 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.
- Eckhardt, C.L., Astermark, J., Nagelkerke, S.Q., Geissler, J., Tanck, M.W.T., Peters, M., Fijnvandraat, K., and Kuijpers, T.W. (2014). The Fc gamma receptor IIa R131H polymorphism is associated with inhibitor development in severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 12, 1294–1301.
- Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., and Kapp, A. (1994a). C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* 83, 3324–3331.
- Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., Dobos, G., Schöpf, E., Norgauer, J., and Kapp, A. (1994b). C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 24, 518–522.
- Elvevold, K., Smedsrød, B., and Martinez, I. (2008). The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G391–400.
- Endres, R.O., and Grey, H.M. (1980). Antigen recognition by T cells. II. Intravenous administration of native or denatured ovalbumin results in tolerance to both forms of the antigen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 125, 1521–1525.
- Ettlinger, R.A., James, E.A., Kwok, W.W., Thompson, A.R., and Pratt, K.P. (2009). Lineages of human T-cell clones, including T helper 17/T helper 1 cells, isolated at different stages of anti-factor VIII immune responses. *Blood* 114, 1423–1428.
- 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.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Fahs, S.A., Hille, M.T., Shi, Q., Weiler, H., and Montgomery, R.R. (2014). A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood* 123, 3706–3713.
- Falk, W., and Leonard, E.J. (1980). Human monocyte chemotaxis: migrating cells are a subpopulation with multiple chemotaxin specificities on each cell. *Infect. Immun.* 29, 953–959.
- Fällman, M., Andersson, R., and Andersson, T. (1993). Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 151, 330–338.
- Fang, Y., Xu, C., Fu, Y.X., Holers, V.M., and Molina, H. (1998). Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 5273–5279.
- Fay, P.J., Beattie, T., Huggins, C.F., and Regan, L.M. (1994). Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J. Biol. Chem.* 269, 20522–20527.
- Fearon, D.T., and Carroll, M.C. (2000). Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 393–422.
- Fischer, W.H., and Hugli, T.E. (1997). Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 4279–4286.
- Fischer, K., Van Der Bom, J.G., Prejs, R., Mauser-Bunschoten, E.P., Roosendaal, G., Grobbee, D.E., and Van Den Berg, H.M. (2001). Discontinuation of prophylactic therapy in severe haemophilia: incidence and effects on outcome. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 7, 544–550.
- Fischer, K., Lassila, R., Peyvandi, F., Calizzani, G., Gatt, A., Lambert, T., Windyga, J., Iorio, A., Gilman, E., Makris, M., et al. (2015). Inhibitor development in haemophilia according to concentrate. Four-year results from the European HAemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. *Thromb. Haemost.* 113, 968–975.
- Fischetti, F., and Tedesco, F. (2006). Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases. *Autoimmunity* 39, 417–428.
- 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.
- Franchini, M., Coppola, A., Tagliaferri, A., and Lippi, G. (2013). FEIBA versus NovoSeven in hemophilia patients with inhibitors. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 772–778.
- Fu, H., Liu, B., Frost, J.L., Hong, S., Jin, M., Ostaszewski, B., Shankar, G.M., Costantino, I.M., Carroll, M.C., Mayadas, T.N., et al. (2012). Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A β by microglia. *Glia* 60, 993–1003.
- Gaboriaud, C., Frachet, P., Thielens, N., and Arlaud, G. (2012). The human C1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands. *Mol. Innate Immun.* 2, 92.
- Gaboriaud, C., Gupta, R.K., Martin, L., Lacroix, M., Serre, L., Teillet, F., Arlaud, G.J., Rossi, V., and Thielens, N.M. (2013). The serine protease domain of MASP-3: enzymatic properties and crystal structure in complex with ecotin. *PLoS One* 8, e67962.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Gallucci, S., and Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 114–119.
- Galvan, M.D., Greenlee-Wacker, M.C., and Bohlsion, S.S. (2012). C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 489–497.
- 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.
- Gasque, P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol. Immunol.* *41*, 1089–1098.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 465–479.
- Georgescu, M.T., Lai, J.D., Hough, C., and Lillicrap, D. (2016). War and peace: Factor VIII and the adaptive immune response. *Cell. Immunol.* *301*, 2–7.
- Ghannam, A., Pernollet, M., Fauquert, J.-L., Monnier, N., Ponard, D., Villiers, M.-B., Péguet-Navarro, J., Tridon, A., Lunardi, J., Gerlier, D., et al. (2008). Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *181*, 5158–5166.
- Ghebrehiwet, B., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1981). Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J. Exp. Med.* *153*, 665–676.
- Gilbert, G.E., Kaufman, R.J., Arena, A.A., Miao, H., and Pipe, S.W. (2002). 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.* *277*, 6374–6381.
- Gilbert, G.E., Novakovic, V.A., Shi, J., Rasmussen, J., and Pipe, S.W. (2015). Platelet binding sites for factor VIII in relation to fibrin and phosphatidylserine. *Blood* *126*, 1237–1244.
- Girardi, G., Berman, J., Redecha, P., Spruce, L., Thurman, J.M., Kraus, D., Hollmann, T.J., Casali, P., Carroll, M.C., Wetsel, R.A., et al. (2003). Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J. Clin. Invest.* *112*, 1644–1654.
- 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.
- Gonzalez, S.F., Jayasekera, J.P., and Carroll, M.C. (2008). Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus. *Vaccine* *26*, Supplement 8, I86–I93.
- Gorgani, N.N., He, J.Q., Katschke, K.J., Helmy, K.Y., Xi, H., Steffek, M., Hass, P.E., and van Lookeren Campagne, M. (2008). Complement receptor of the Ig superfamily enhances complement-mediated phagocytosis in a subpopulation of tissue resident macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* *181*, 7902–7908.
- Goudemand, J., Rothschild, C., Demiguel, V., Vinciguerrat, C., Lambert, T., Chambost, H., Borel-Derlon, A., Claeysens, S., Laurian, Y., and Calvez, T. (2006). Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* *107*, 46–51.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Gouw, S.C., van der Bom, J.G., and Marijke van den Berg, H. (2007). Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 109, 4648–4654.
- Gouw, S.C., Van Der Bom, J.G., Van Den Berg, H.M., Zewald, R.A., Ploos Van Amstel, J.K., and Mauser-Bunschoten, E.P. (2011). Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 17, 275–281.
- Gouw, S.C., Berg, H.M. van den, Oldenburg, J., Astermark, J., Groot, P.G. de, Margaglione, M., Thompson, A.R., Heerde, W. van, 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.
- 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.
- Grosbois, S.S., Brionne, M.F., de Longcamp, A.L.F., Gautier, P., V Kaveri, S., Borel-Derlon, A., and Repessé, Y. (2013). Hydrolysis of factor VIII mediated by catalytic antibodies occurs in haemophilia A patients with or without factor VIII inhibitors. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 19, 322–329.
- van Haren, S.D., Wroblewska, A., Fischer, K., Voorberg, J., and Herczenik, E. (2012). Requirements for immune recognition and processing of factor VIII by antigen-presenting cells. *Blood Rev.* 26, 43–49.
- Hartmann, K., Henz, B.M., Krüger-Krasagakes, S., Köhl, J., Burger, R., Guhl, S., Haase, I., Lippert, U., and Zuberbier, T. (1997). C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 89, 2863–2870.
- Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., and Sims, P.J. (1989). Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.* 264, 7768–7771.
- 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.
- Hebell, T., Ahearn, J.M., and Fearon, D.T. (1991). Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 254, 102–105.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Heeger, P.S., Lalli, P.N., Lin, F., Valujskikh, A., Liu, J., Muqim, N., Xu, Y., and Medof, M.E. (2005). Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J. Exp. Med.* *201*, 1523–1530.
- Hellman, L., Smedsröd, B., Sandberg, H., and Pettersson, U. (1989). Secretion of coagulant factor VIII activity and antigen by in vitro cultivated rat liver sinusoidal endothelial cells. *Br. J. Haematol.* *73*, 348–355.
- 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. (2012a). Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 501–509, 509-5.
- Herczenik, E., van Haren, S.D., Wroblewska, A., Kaijen, P., van den Biggelaar, M., Meijer, A.B., ten Brinke, A., and Voorberg, J. (2012b). Reply. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 1174–1175.
- 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.
- Hoyer, L.W. (1994). Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* *330*, 38–47.
- Hsu, T.-C., Pratt, K.P., and Thompson, A.R. (2008). The factor VIII C1 domain contributes to platelet binding. *Blood* *111*, 200–208.
- Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., Rittirsch, D., Neff, T.A., McGuire, S.R., Lambris, J.D., Warner, R.L., Flierl, M.A., Hoesel, L.M., et al. (2006). Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat. Med.* *12*, 682–687.
- Ikeda, K., Nagasawa, K., Horiuchi, T., Tsuru, T., Nishizaka, H., and Niho, Y. (1997). C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb. Haemost.* *77*, 394–398.
- Ing, M., Repessé, Y., and Lacroix-Desmazes, S. (2015). Immunological aspects of long-lasting FVIII and FIX replacement therapy. *Int. Monit. Hemoph.* *22*, 9–13.
- Ing, M., Gupta, N., Teyssandier, M., Maillère, B., Pallardy, M., Delignat, S., Lacroix-Desmazes, S., and ABIRISK consortium (2016). Immunogenicity of long-lasting recombinant factor VIII products. *Cell. Immunol.* *301*, 40–48.
- Ingerslev, J., Christiansen, B.S., Heickendorff, L., and Munck Petersen, C. (1988). Synthesis of factor VIII in human hepatocytes in culture. *Thromb. Haemost.* *60*, 387–391.
- 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.
- Jacquemin, M., Neyrinck, A., Hermanns, M.I., Lavend'homme, R., Rega, F., Saint-Remy, J.-M., Peerlinck, K., Raemdonck, D.V., 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.
- Jacquier-Sarlin, M.R., Gabert, F.M., Villiers, M.B., and Colomb, M.G. (1995). Modulation of antigen processing and presentation by covalently linked complement C3b fragment. *Immunology* *84*, 164–170.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Johnson, E., Larsen, T., and Hetland, G. (1986). Phagocytosis of agarose beads by receptors for C3b (CR1) and iC3b (CR3) on human alveolar macrophages cultured on fibronectin in vitro. A scanning electron microscopic study. *Scand. J. Immunol.* *24*, 653–660.
- Karp, C.L., Grupe, A., Schadt, E., Ewart, S.L., Keane-Moore, M., Cuomo, P.J., Köhl, J., Wahl, L., Kuperman, D., Germer, S., et al. (2000). Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat. Immunol.* *1*, 221–226.
- 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.
- Kaufman, R.J., Pipe, S.W., Tagliavacca, L., Swaroop, M., and Moussalli, M. (1997). Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* *8 Suppl 2*, S3-14.
- Kaveri, S.V., Dasgupta, S., Andre, S., Navarrete, A.-M., Repessé, Y., Wootla, B., and Lacroix-Desmazes, S. (2007). Factor VIII inhibitors: role of von Willebrand factor on the uptake of factor VIII by dendritic cells. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *13 Suppl 5*, 61–64.
- Kazatchkine, M.D., Fearon, D.T., and Austen, K.F. (1979). Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *122*, 75–81.
- Kim, D.D., and Song, W.-C. (2006). Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *118*, 127–136.
- Kishore, U., and Reid, K.B.M. (2000). C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* *49*, 159–170.
- Kjaer, T.R., Thiel, S., and Andersen, G.R. (2013). Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol.* *56*, 413–422.
- Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., Liu, T., Jack, R.M., and Nicholson-Weller, A. (1997). Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* *7*, 345–355.
- Klinge, J., Auberger, K., Auerswald, G., Brackmann, H.H., Mauz-Körholz, C., and Kreuz, W. (1999). Prevalence and outcome of intracranial haemorrhage in haemophiliacs--a survey of the paediatric group of the German Society of Thrombosis and Haemostasis (GTH). *Eur. J. Pediatr.* *158 Suppl 3*, S162-165.
- Köhl, J., Baelder, R., Lewkowich, I.P., Pandey, M.K., Hawlisch, H., Wang, L., Best, J., Herman, N.S., Sproles, A.A., Zwirner, J., et al. (2006). A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. *J. Clin. Invest.* *116*, 783–796.
- Krarup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., Gál, P., and Sim, R.B. (2007). Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PloS One* *2*, e623.
- Krem, M.M., and Di Cera, E. (2002). Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 67–74.
- Kretzschmar, T., Jeromin, A., Gietz, C., Bautsch, W., Klos, A., Köhl, J., Rechkemmer, G., and Bitter-Suermann, D. (1993). Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur. J. Immunol.* *23*, 558–561.
- Krisinger, M.J., Goebeler, V., Lu, Z., Meixner, S.C., Myles, T., Pryzdial, E.L.G., and Conway, E.M. (2012). Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. *Blood* *120*, 1717–1725.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Kwan, W., van der Touw, W., Paz-Artal, E., Li, M.O., and Heeger, P.S. (2013). Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *210*, 257–268.
- Lachmann, P.J., and Halbwachs, L. (1975). The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* *21*, 109–114.
- 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., Wootla, B., Dasgupta, S., Delignat, S., Bayry, J., Reinbolt, J., Hoebeke, J., Saenko, E., Kazatchkine, M.D., Friboulet, A., et al. (2006). Catalytic IgG from patients with hemophilia A inactivate therapeutic factor VIII. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 1355–1363.
- 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.
- Lai, J.D., Cartier, D., van Velzen, A., Hough, C., and Lillicrap, D. (2015). Compared to B220/CD45R+ B lymphocytes, splenic dendritic cells and macrophages have limited propensity to bind factor VIII and demonstrate down-regulation of co-stimulatory molecules, In: Abstracts of the XXV Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* *13*, 140.
- Lai, J.D., Moorehead, P.C., Sponagle, K., Steinitz, K.N., Reipert, B.M., Hough, C., and Lillicrap, D. (2016). Concurrent influenza vaccination reduces anti-FVIII antibody responses in hemophilia A mice via chemotactic antigen competition. *Blood*.
- Lakich, D., Kazazian, H.H., Antonarakis, S.E., and Gitschier, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat. Genet.* *5*, 236–241.
- Lalli, P.N., Strainic, M.G., Lin, F., Medof, M.E., and Heeger, P.S. (2007). Decay Accelerating Factor Can Control T Cell Differentiation into IFN- γ -Producing Effector Cells via Regulating Local C5a-Induced IL-12 Production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 5793–5802.
- Lalli, P.N., Strainic, M.G., Yang, M., Lin, F., Medof, M.E., and Heeger, P.S. (2008). Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood* *112*, 1759–1766.
- Lambris, J.D., Lao, Z., Oglesby, T.J., Atkinson, J.P., Hack, C.E., and Becherer, J.D. (1996). Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 4821–4832.
- Langer, F., Spath, B., Fischer, C., Stolz, M., Ayuk, F.A., Kröger, N., Bokemeyer, C., and Ruf, W. (2013). Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood* *121*, 2324–2335.
- el-Lati, S.G., Dahinden, C.A., and Church, M.K. (1994). Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J. Invest. Dermatol.* *102*, 803–806.
- Law, S.K., and Dodds, A.W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *6*, 263–274.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Le Friec, G., Sheppard, D., Whiteman, P., Karsten, C.M., Shamoun, S.A.-T., Laing, A., Bugeon, L., Dallman, M.J., Melchionna, T., Chillakuri, C., et al. (2012). The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat. Immunol.* *13*, 1213–1221.
- 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.
- Lett-Brown, M.A., and Leonard, E.J. (1977). Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *118*, 815–818.
- Li, K., Anderson, K.J., Peng, Q., Noble, A., Lu, B., Kelly, A.P., Wang, N., Sacks, S.H., and Zhou, W. (2008). Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor-mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation. *Blood* *112*, 5084–5094.
- Li, K., Fazekasova, H., Wang, N., Sagoo, P., Peng, Q., Khamri, W., Gomes, C., Sacks, S.H., Lombardi, G., and Zhou, W. (2011). Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells. *Mol. Immunol.* *48*, 1121–1127.
- Lin, J.C., Ettinger, R.A., Schuman, J.T., Zhang, A.-H., Wamiq-Adhami, M., Nguyen, P.-C.T., Nakaya-Fletcher, S.M., Puranik, K., Thompson, A.R., and Pratt, K.P. (2015). Six amino acid residues in a 1200 Å² interface mediate binding of factor VIII to an IgG4κ inhibitory antibody. *PLoS One* *10*, e0116577.
- Lipp, A.M., Juhasz, K., Paar, C., Ogris, C., Eckerstorfer, P., Thuenauer, R., Hesse, J., Nimmervoll, B., Stockinger, H., Schütz, G.J., et al. (2014). Lck Mediates Signal Transmission from CD59 to the TCR/CD3 Pathway in Jurkat T Cells. *PLOS ONE* *9*, e85934.
- Liszewski, M.K., Kolev, M., Le Friec, G., Leung, M., Bertram, P.G., Fara, A.F., Subias, M., Pickering, M.C., Drouet, C., Meri, S., et al. (2013). Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* *39*, 1143–1157.
- Liu, J., Miwa, T., Hilliard, B., Chen, Y., Lambris, J.D., Wells, A.D., and Song, W.-C. (2005). The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J. Exp. Med.* *201*, 567–577.
- Liu, M.-L., Shen, B.W., Nakaya, S., Pratt, K.P., Fujikawa, K., Davie, E.W., Stoddard, B.L., and Thompson, A.R. (2000). Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood* *96*, 979–987.
- Lollar, P. (2004). Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J. Thromb. Haemost. JTH* *2*, 1082–1095.
- 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., and Wiinberg, B. (2016). Joint bleeds increase the inhibitor response to human factor VIII in a rat model of severe haemophilia A. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.*
- Lozada, C., Levin, R.I., Huie, M., Hirschhorn, R., Naime, D., Whitlow, M., Recht, P.A., Golden, B., and Cronstein, B.N. (1995). Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8378–8382.

— BIBLIOGRAPHIE —

- 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.
- Macauley, M.S., Crocker, P.R., and Paulson, J.C. (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 653–666.
- Malucchi, S., and Bertolotto, A. (2008). Clinical Aspects of Immunogenicity to Biopharmaceuticals. In *Immunogenicity of Biopharmaceuticals*, M. van de Weert, and E.H. Møller, eds. (Springer New York), pp. 27–56.
- Malucchi, S., Sala, A., Gilli, F., Bottero, R., Di Sapio, A., Capobianco, M., and Bertolotto, A. (2004). Neutralizing antibodies reduce the efficacy of beta1FN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* *62*, 2031–2037.
- Mannucci, P.M., and Tuddenham, E.G. (2001). The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1773–1779.
- Marth, T., and Kelsall, B.L. (1997). Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J. Exp. Med.* *185*, 1987–1995.
- Martin, M., Leffler, J., and Blom, A.M. (2012). Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 33733–33744.
- Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., and Mizuochi, T. (1996). A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* *271*, 2448–2454.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301–305.
- Mausser-Bunschoten, E.P., Franssen Van De Putte, D.E., and Schutgens, R.E.G. (2009). Co-morbidity in the ageing haemophilia patient: the down side of increased life expectancy. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *15*, 853–863.
- 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.
- Melis, J.P.M., Strumane, K., Ruuls, S.R., Beurskens, F.J., Schuurman, J., and Parren, P.W.H.I. (2015). Complement in therapy and disease: Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. *Mol. Immunol.* *67*, 117–130.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Meri, S., Morgan, B.P., Davies, A., Daniels, R.H., Olavesen, M.G., Waldmann, H., and Lachmann, P.J. (1990). Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 71, 1–9.
- Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015). Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Mol. Innate Immun.* 262.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 235–245.
- Molina, H., Holers, V.M., Li, B., Fung, Y., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R.W., and Chaplin, D.D. (1996). Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3357–3361.
- Moreau, A., Lacroix-Desmazes, S., Stieltjes, N., Saenko, E., Kaveri, S.V., D’Oiron, R., Sultan, Y., Scandella, D., and Kazatchkine, M.D. (2000). Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood* 95, 3435–3441.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., and Thomson, A.W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611–620.
- Morgan, B.P., and Harris, C.L. (2015). Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 857–877.
- Morgan, E.L., Weigle, W.O., and Hugli, T.E. (1982). Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. *J. Exp. Med.* 155, 1412–1426.
- Mueller-Ortiz, S.L., Morales, J.E., and Wetsel, R.A. (2014). The receptor for the complement C3a anaphylatoxin (C3aR) provides host protection against *Listeria monocytogenes*-induced apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1278–1289.
- Muhlfelder, T.W., Niemetz, J., Kreutzer, D., Beebe, D., Ward, P.A., and Rosenfeld, S.I. (1979). C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *J. Clin. Invest.* 63, 147–150.
- Nataf, S., Davoust, N., Ames, R.S., and Barnum, S.R. (1999). Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 4018–4023.
- Nauta, A.J., Daha, M.R., Tijmsa, O., van de Water, B., Tedesco, F., and Roos, A. (2002). The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 32, 783–792.
- Nauta, A.J., Castellano, G., Xu, W., Woltman, A.M., Borrias, M.C., Daha, M.R., van Kooten, C., and Roos, A. (2004). Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 3044–3050.
- 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.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Naylor, J., Brinke, A., Hassock, S., Green, P.M., and Giannelli, F. (1993). Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1773–1778.
- Neels, J.G., van Den Berg, B.M., Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H., and van Zonneveld, A.J. (1999). The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J. Biol. Chem.* 274, 31305–31311.
- Nepomuceno, R.R., and Tenner, A.J. (1998). C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 1929–1935.
- Newman, S.L., Becker, S., and Halme, J. (1985). Phagocytosis by receptors for C3b (CR1), iC3b (CR3), and IgG (Fc) on human peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 38, 267–278.
- 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.
- Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Suzuki, T., Koide, T., Saenko, E.L., Scandella, D., Shibata, M., Kamisue, S., Tanaka, I., et al. (1999). Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J. Biol. Chem.* 274, 31000–31007.
- Nogami, K., Freas, J., Manithody, C., Wakabayashi, H., Rezaie, A.R., and Fay, P.J. (2004). Mechanisms of interactions of factor X and factor Xa with the acidic region in the factor VIII A1 domain. *J. Biol. Chem.* 279, 33104–33113.
- Noone, D.G., Riedl, M., Pluthero, F.G., Bowman, M.L., Liszewski, M.K., Lu, L., Quan, Y., Balgobin, S., Schneppenheim, R., Schneppenheim, S., et al. (2016). Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells. *Kidney Int.*
- Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 194, 781–795.
- 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.
- O’Neil, K.M., Ochs, H.D., Heller, S.R., Cork, L.C., Morris, J.M., and Winkelstein, J.A. (1988). Role of C3 in humoral immunity. Defective antibody production in C3-deficient dogs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 140, 1939–1945.
- Osterud, B. (1998). Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 9 Suppl 1, S9-14.
- Otonello, L., Corcione, A., Tortolina, G., Airoidi, I., Albesiano, E., Favre, A., D’Agostino, R., Malavasi, F., Pistoia, V., and Dallegri, F. (1999). rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 6510–6517.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Ozaki, K., Lee, R.T., Lee, Y.C., and Kawasaki, T. (1995). The differences in structural specificity for recognition and binding between asialoglycoprotein receptors of liver and macrophages. *Glycoconj. J.* *12*, 268–274.
- Païdassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., and Frachet, P. (2008). C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2329–2338.
- Païdassi, H., Tacnet-Delorme, P., Verneret, M., Gaboriaud, C., Houen, G., Duus, K., Ling, W.L., Arlaud, G.J., and Frachet, P. (2011). Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J. Mol. Biol.* *408*, 277–290.
- Pan, J., Dinh, T.T., Rajaraman, A., Lee, M., Scholz, A., Czupalla, C.J., Kiefel, H., Zhu, L., Xia, L., Morser, J., et al. (2016). Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood*.
- 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.
- Papamichail, M., Gutierrez, C., Embling, P., Johnson, P., Holborow, E.J., and Pepys, M.B. (1975). Complement dependence of localisation of aggregated IgG in germinal centres. *Scand. J. Immunol.* *4*, 343–347.
- Paroskie, A., Gailani, D., DeBaun, M.R., and Sidonio, R.F. (2015). A cross-sectional study of bleeding phenotype in haemophilia A carriers. *Br. J. Haematol.* *170*, 223–228.
- 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.
- Pawaria, S., and Binder, R.J. (2011). CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat. Commun.* *2*, 521.
- Pawaria, S., Messmer, M.N., Zhou, Y.J., and Binder, R.J. (2011). A role for the heat shock protein-CD91 axis in the initiation of immune responses to tumors. *Immunol. Res.* *50*, 255–260.
- Peerschke, E.I., Reid, K.B., and Ghebrehiwet, B. (1993). Platelet activation by C1q results in the induction of alpha IIb/beta 3 integrins (GPIIb-IIIa) and the expression of P-selectin and procoagulant activity. *J. Exp. Med.* *178*, 579–587.
- 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.
- Peng, Q., Li, K., Patel, H., Sacks, S.H., and Zhou, W. (2006). Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3330–3341.
- Pepys, M.B. (1972). Role of complement in induction of the allergic response. *Nature. New Biol.* *237*, 157–159.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Pepys, M.B. (1974). Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J. Exp. Med.* *140*, 126–145.
- 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.
- 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.*
- 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.
- Pezeshkpoor, B., Zimmer, N., Marquardt, N., Nanda, I., Haaf, T., Budde, U., Oldenburg, J., and El-Maari, O. (2013). Deep intronic “mutations” cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in F8 cDNA. *J. Thromb. Haemost. JTH* *11*, 1679–1687.
- 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.
- Pickering, M.C., Cook, H.T., Warren, J., Bygrave, A.E., Moss, J., Walport, M.J., and Botto, M. (2002). Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat. Genet.* *31*, 424–428.
- Platt, J.L., Dalmaso, A.P., Lindman, B.J., Ihrcke, N.S., and Bach, F.H. (1991). The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* *21*, 2887–2890.
- Polley, M.J., and Nachman, R.L. (1983). Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J. Exp. Med.* *158*, 603–615.
- Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G., and Ravichandran, K.S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 166–180.
- Prodeus, A.P., Zhou, X., Maurer, M., Galli, S.J., and Carroll, M.C. (1997). Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* *390*, 172–175.
- Prodinger, W.M. (1999). Complement receptor type two (CR2,CR21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping. *Immunol. Res.* *20*, 187–194.
- Prümmer, O. (1997). Treatment-induced antibodies to interleukin-2. *Biotherapy Dordr. Neth.* *10*, 15–24.
- Qian, J., Collins, M., Sharpe, A.H., and Hoyer, L.W. (2000). Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood* *95*, 1324–1329.
- Racanelli, V., and Rehmann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* *43*, S54-62.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Ragni, M.V., Bontempo, F.A., and Lewis, J.H. (1989). Disappearance of inhibitor to factor VIII in HIV-infected hemophiliacs with progression to AIDS or severe ARC. *Transfusion (Paris)* 29, 447–449.
- Rallapalli, P., Kemball-Cook, G., Tuddenham, E., Gomez, K., and Perkins, S. (2014). Factor VIII variant database (www.factorviii-db.org). Manuscr. Prep.
- Rastegarlar, G., Pegon, J.N., Casari, C., Odouard, S., Navarrete, A.-M., Saint-Lu, N., Vlijmen, B.J. van, Legendre, P., Christophe, O.D., Denis, C.V., et al. (2012). Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood* 119, 2126–2134.
- Rayes, J., Roumenina, L.T., Dimitrov, J.D., Repessé, Y., Ing, M., Christophe, O., Jokiranta, T.S., Halbwachs-Mecarelli, L., Borel-Derlon, A., Kaveri, S.V., et al. (2014). The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood* 123, 121–125.
- Reding, M.T., Lei, S., Lei, H., Green, D., Gill, J., and Conti-Fine, B.M. (2002). Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb. Haemost.* 88, 568–575.
- Redzovic, A., Gubic, T., Laskarin, G., Eminovic, S., Haller, H., and Rukavina, D. (2015). Heat-Shock Proteins 70 Induce Pro-Inflammatory Maturation Program in Decidual CD1a(+) Dendritic Cells. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 74, 38–53.
- 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.
- Reipert, B.M., Schoppmann, A., and Schwarz, H.P. (2003). A caution on the use of murine hemophilia models for comparative immunogenicity studies of FVIII products with different protein compositions. *Thromb. Haemost.* 89, 1110–1112; author reply 1113.
- Reis, E.S., Barbuto, J.A.M., and Isaac, L. (2007). Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology* 212, 151–157.
- Reis, E.S., Barbuto, J.A.M., Köhl, J., and Isaac, L. (2008). Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol. Immunol.* 45, 1952–1962.
- Repressé, 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.
- Repressé, Y., Peyron, I., Dimitrov, J.D., Dasgupta, S., Moshai, E.F., Costa, C., Borel-Derlon, A., Guillet, B., D’Oiron, R., Aouba, A., et al. (2013). Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the HMOX1 promoter. *Haematologica* 98, 1650–1655.
- Rey-Millet, C.A., Villiers, C.L., Gabert, F.M., Chesne, S., and Colomb, M.G. (1994). C3b covalently associated to tetanus toxin modulates TT processing and presentation by U937 cells. *Mol. Immunol.* 31, 1321–1327.
- Rezende, S.M., Simmonds, R.E., and Lane, D.A. (2004). Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 103, 1192–1201.
- Richards, M., Lavigne Lissalde, G., Combescure, C., Batorova, A., Dolan, G., Fischer, K., Klamroth, R., Lambert, T., Lopez-Fernandez, M., Pérez, R., et al. (2012). Neonatal bleeding in haemophilia: a European cohort study. *Br. J. Haematol.* 156, 374–382.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Rickert, R.C. (2005). Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 237–243.
- Rini, B., Wadhwa, M., Bird, C., Small, E., Gaines-Das, R., and Thorpe, R. (2005). Kinetics of development and characteristics of antibodies induced in cancer patients against yeast expressed rDNA derived granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *Cytokine* 29, 56–66.
- Ritis, K., Doumas, M., Mastellos, D., Micheli, A., Giaglis, S., Magotti, P., Rafail, S., Kartalis, G., Sideras, P., and Lambris, J.D. (2006). A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 4794–4802.
- Rittirsch, D., Flierl, M.A., and Ward, P.A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 776–787.
- Rocino, A., Cortesi, P.A., Scalone, L., Mantovani, L.G., Crea, R., Gringeri, A., European Haemophilia Therapy Strategy Board (EHTSB), and European Haemophilia Therapy Strategy Board EHTSB (2016). Immune tolerance induction in patients with haemophilia a and inhibitors: effectiveness and cost analysis in an European Cohort (The ITER Study). *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 22, 96–102.
- Rosendaal, F.R., Smit, C., and Briët, E. (1991). Hemophilia treatment in historical perspective: a review of medical and social developments. *Ann. Hematol.* 62, 5–15.
- 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.
- Roumenina, L.T., Popov, K.T., Bureeva, S.V., Kojouharova, M., Gadjeva, M., Rabheru, S., Thakrar, R., Kaplun, A., and Kishore, U. (2008). Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1271–1276.
- 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.
- Sándor, N., Pap, D., Prechl, J., Erdei, A., and Bajtay, Z. (2009). A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 47, 438–448.
- Santagostino, E., Mancuso, M.E., Rocino, A., Mancuso, G., Mazzucconi, M.G., Tagliaferri, A., Messina, M., and Mannucci, P.M. (2005). Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br. J. Haematol.* 130, 422–427.
- 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.
- Scandella, D.H. (2000). Properties of anti-factor VIII inhibitor antibodies in hemophilia A patients. *Semin. Thromb. Hemost.* 26, 137–142.
- Schellekens, H. (2002). Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 457–462.
- Scherthaner, G. (1993). Immunogenicity and allergenic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care* 16 Suppl 3, 155–165.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Schernthaner, G., Borkenstein, M., Fink, M., Mayr, W.R., Menzel, J., and Schober, E. (1983). Immunogenicity of human insulin (Novo) or pork monocomponent insulin in HLA-DR-typed insulin-dependent diabetic individuals. *Diabetes Care* 6 *Suppl 1*, 43–48.
- van Schooten, C.J., Shahbazi, S., Groot, E., Oortwijn, B.D., van den Berg, H.M., Denis, C.V., and Lenting, P.J. (2008). Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 112, 1704–1712.
- Serra, V.A., Cretin, F., Pépin, E., Gabert, F.M., and Marche, P.N. (1997). Complement C3b fragment covalently linked to tetanus toxin increases lysosomal sodium dodecyl sulfate-stable HLA-DR dimer production. *Eur. J. Immunol.* 27, 2673–2679.
- 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.
- Shapiro, A.D., Ragni, M.V., Kulkarni, R., Oldenberg, J., Srivastava, A., Quon, D.V., Pasi, K.J., Hanabusa, H., Pabinger, I., Mahlangu, J., et al. (2014). Recombinant factor VIII Fc fusion protein: extended-interval dosing maintains low bleeding rates and correlates with von Willebrand factor levels. *J. Thromb. Haemost. JTH* 12, 1788–1800.
- Sharathkumar, A., Lillicrap, D., Blanchette, V.S., Kern, M., Leggo, J., Stain, A.M., Brooker, L., and Carcao, M.D. (2003). Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* 1, 1228–1236.
- Shen, B.W., Spiegel, P.C., Chang, C.-H., Huh, J.-W., Lee, J.-S., Kim, J., Kim, Y.-H., and Stoddard, B.L. (2008). The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 111, 1240–1247.
- Sims, P.J., Faioni, E.M., Wiedmer, T., and Shattil, S.J. (1988). Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J. Biol. Chem.* 263, 18205–18212.
- 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.
- Sohn, J.-H., Bora, P.S., Suk, H.-J., Molina, H., Kaplan, H.J., and Bora, N.S. (2003). Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat. Med.* 9, 206–212.
- Son, M., Santiago-Schwarz, F., Al-Abed, Y., and Diamond, B. (2012). C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3160-3167.
- Soruri, A., Riggert, J., Schlott, T., Kiafard, Z., Dettmer, C., and Zwirner, J. (2003). Anaphylatoxin C5a Induces Monocyte Recruitment and Differentiation into Dendritic Cells by TNF- α and Prostaglandin E2-Dependent Mechanisms. *J. Immunol.* 171, 2631–2636.
- 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.
- Spiegel, P.C., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.M., Stoddard, B.L., and Pratt, K.P. (2001). Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood* 98, 13–19.
- St-Pierre, C., Brochu, S., Vanegas, J.R., Dumont-Lagacé, M., Lemieux, S., and Perreault, C. (2013). Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* 3, 1860.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Strainic, M.G., Liu, J., Huang, D., An, F., Lalli, P.N., Muqim, N., Shapiro, V.S., Dubyak, G.R., Heeger, P.S., and Medof, M.E. (2008). Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 28, 425–435.
- Strainic, M.G., Shevach, E.M., An, F., Lin, F., and Medof, M.E. (2013). Absence of signaling into CD4⁺ cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF- β 1 signaling and induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14, 162–171.
- Takahara, M., Kang, K., Liu, L., Yoshida, Y., McCormick, T.S., and Cooper, K.D. (2003). iC3b arrests monocytic cell differentiation into CD1c-expressing dendritic cell precursors: a mechanism for transiently decreased dendritic cells in vivo after human skin injury by ultraviolet B. *J. Invest. Dermatol.* 120, 802–809.
- Takizawa, F., Tsuji, S., and Nagasawa, S. (1996). Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett.* 397, 269–272.
- Taylor, P.R., Carugati, A., Fadok, V.A., Cook, H.T., Andrews, M., Carroll, M.C., Savill, J.S., Henson, P.M., Botto, M., and Walport, M.J. (2000). A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 359–366.
- Teillet, F., Dublet, B., Andrieu, J.-P., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., and Thielens, N.M. (2005). The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: chemical characterization, carbohydrate-binding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 2870–2877.
- Teyssandier, M., André, S., Gupta, N., Dasgupta, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., Lacroix-Desmazes, S., and ABIRISK consortium (2013). Therapeutic factor VIII does not trigger TLR1.2 and TLR2.6 signalling in vitro. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 19, 399–402.
- Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaebler, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., et al. (1997). A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386, 506–510.
- Tovey, M.G., and Lallemand, C. (2011). Immunogenicity and other problems associated with the use of biopharmaceuticals. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2, 113–128.
- Triantafilou, K., Hughes, T.R., Triantafilou, M., and Morgan, B.P. (2013). The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci* 126, 2903–2913.
- Trouw, L.A., Blom, A.M., and Gasque, P. (2008). Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* 45, 1199–1207.
- Turecek, P.L., Váradi, K., Gritsch, H., and Schwarz, H.P. (2004). FEIBA: mode of action. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 10 *Suppl* 2, 3–9.
- Turecek, P.L., Bossard, M.J., Graninger, M., Gritsch, H., Höllriegl, W., Kaliwoda, M., Matthiessen, P., Mitterer, A., Muchitsch, E.-M., Purtscher, M., et al. (2012). BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Hämostaseologie* 32 *Suppl* 1, S29-38.
- Valladeau, J., Duvert-Frances, V., Pin, J.J., Kleijmeer, M.J., Ait-Yahia, S., Ravel, O., Vincent, C., Vega, F., Helms, A., Gorman, D., et al. (2001). Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 5767–5774.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Vandivier, R.W., Ogden, C.A., Fadok, V.A., Hoffmann, P.R., Brown, K.K., Botto, M., Walport, M.J., Fisher, J.H., Henson, P.M., and Greene, K.E. (2002). Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 3978–3986.
- Varki, A., and Angata, T. (2006). Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* *16*, 1R–27R.
- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J. Exp. Med.* *196*, 1553–1561.
- Villiers, M.-B., Villiers, C.L., Jacquier-Sarlin, M.R., Gabert, F.M., Journet, A.M., and Colomb, M.G. (1996). Covalent binding of C3b to tetanus toxin: influence on uptake/internalization of antigen by antigen-specific and non-specific B cells. *Immunology* *89*, 348–355.
- Vlot, A.J., Koppelman, S.J., Meijers, J.C., Dama, C., van den Berg, H.M., Bouma, B.N., Sixma, J.J., and Willems, G.M. (1996). Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood* *87*, 1809–1816.
- Vogel, C.-W., and Fritzing, D.C. (2010). Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *56*, 1198–1222.
- Wagner, C., Ochmann, C., Schoels, M., Giese, T., Stegmaier, S., Richter, R., Hug, F., and Hänsch, G.M. (2006). The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. *Mol. Immunol.* *43*, 643–651.
- Wagner, E., and Frank, M.M. (2010). Therapeutic potential of complement modulation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 43–56.
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J., and Keeble, A.H. (2010). Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* *215*, 1–11.
- Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1058–1066.
- Wang, L., Sunyer, J.O., and Bello, L.J. (2004). Fusion to C3d enhances the immunogenicity of the E2 glycoprotein of type 2 bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* *78*, 1616–1622.
- Whaley, K., and Ruddy, S. (1976). Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J. Exp. Med.* *144*, 1147–1163.
- 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.
- White, G.C., Rosendaal, F., Aledort, L.M., Lusher, J.M., Rothschild, C., Ingerslev, J., and Factor VIII and Factor IX Subcommittee (2001). Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* *85*, 560.
- Wiedmer, T., and Sims, P.J. (1985). Effect of complement proteins C5b-9 on blood platelets. Evidence for reversible depolarization of membrane potential. *J. Biol. Chem.* *260*, 8014–8019.

— BIBLIOGRAPHIE —

- Wiedmer, T., Esmon, C.T., and Sims, P.J. (1986). Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood* 68, 875–880.
- Wittmann, M., Zwirner, J., Larsson, V.A., Kirchhoff, K., Begemann, G., Kapp, A., Götze, O., and Werfel, T. (1999). C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 6763–6769.
- Wojta, J., Kaun, C., Zorn, G., Ghannadan, M., Hauswirth, A.W., Sperr, W.R., Fritsch, G., Printz, D., Binder, B.R., Schatzl, G., et al. (2002). C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood* 100, 517–523.
- Wojta, J., Huber, K., and Valent, P. (2003). New aspects in thrombotic research: complement induced switch in mast cells from a profibrinolytic to a prothrombotic phenotype. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 438–441.
- Wootla, B., Dasgupta, S., Dimitrov, J.D., Bayry, J., Lévesque, H., Borg, J.-Y., Borel-Derlon, A., Rao, D.N., Friboulet, A., Kaveri, S.V., et al. (2008). Factor VIII hydrolysis mediated by anti-factor VIII autoantibodies in acquired hemophilia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 7714–7720.
- 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.
- Zanolini, D., Merlin, S., Feola, M., Ranaldo, G., Amoroso, A., Gaidano, G., Zaffaroni, M., Ferrero, A., Brunelleschi, S., Valente, G., et al. (2015). Extrahepatic sources of factor VIII potentially contribute to the coagulation cascade correcting the bleeding phenotype of mice with hemophilia A. *Haematologica* 100, 881–892.
- 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.
- Ziccardi, R.J. (1982). A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 128, 2505–2508.
- Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 729–740.

ANNEXES



Leading article

Immunological Aspects of Long-lasting FVIII and FIX Replacement Therapy

Mathieu Ing, Yohann Repessé and Sébastien Lacroix-Desmazes
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, and Université Paris Descartes; Unité Mixte de Recherche en Santé 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris; Laboratoire d'Hématologie, CHU de Caen, Caen, France

Mathieu Ing is a PhD student working at the Cordeliers Research Centre in Paris, France. His work focuses on understanding the mechanisms that underlie inhibitor development in patients with hemophilia A.

Yohann Repessé is associate-professor in the Hematology Laboratory in Caen University Hospital. He is working in the field of hemorrhagic disorders such as von willebrand diseases and hemophilia.

Sébastien Lacroix-Desmazes is a senior scientist at the INSERM in Paris, France. He obtained his PhD degree in Immunology from the University Pierre et Marie Curie, Paris, France, and subsequently held several post-doctoral positions in France as well as in Belgium. Since 1994 Dr Lacroix-Desmazes has been involved in many research projects mainly related to immunology, and is a specialist in the hemophilia field.

From the use of cryoprecipitates to the development of recombinant proteins, the treatment of hemorrhages in patients with hemophilia has progressed enormously over the last 50 years in western countries. Consequently, the life expectancy of patients, which did not exceed two decades in the 1950s, is now comparable with that of the overall population. Such an improvement was made possible by the constant commitment to efficacy and safety by the drug developers and health authorities which followed in particular the exceptional HIV outbreak in the 1980s. During the same period, and owing to a number of clinical studies based on national and international patient cohorts and the implication of key leaders in the field, treatment regimens have improved to reduce the risks of hemarthrosis and arthropathy and to enhance patients' quality of life. These efforts have transformed the life of patients, who can currently take part in physical activities which once were unconceivable. Yet, the rapid catabolism of therapeutic factor VIII (FVIII) and factor IX (FIX) requires frequent intravenous administration of the replacement therapy to ensure optimal protection from bleeds. In addition, the short half-life of factor concentrates limits the adherence to prophylaxis (particularly in the case of adolescents and adults) and dramatically increases the costs of the treatment.

The latest progress in product development focuses on further improving the quality of life of patients, and implies the elaboration of long-lasting hemostatic drugs. Thus, extending the circulation time of FVIII or FIX in the blood would extend the time period during which adequate coagulation capacity is maintained, as well as

reducing the frequency of product administration. This would result in an enhanced protection against bleeding complications, and would render treatment less cumbersome. Several strategies have been developed to optimize the pharmacokinetics of therapeutic agents and improve their half-life in the circulation. In the case of therapeutic FVIII and FIX, the different strategies include conjugation with the crystallizable fragment (Fc) portion of immunoglobulins, to human serum albumin or to polyethylene glycol (PEG).

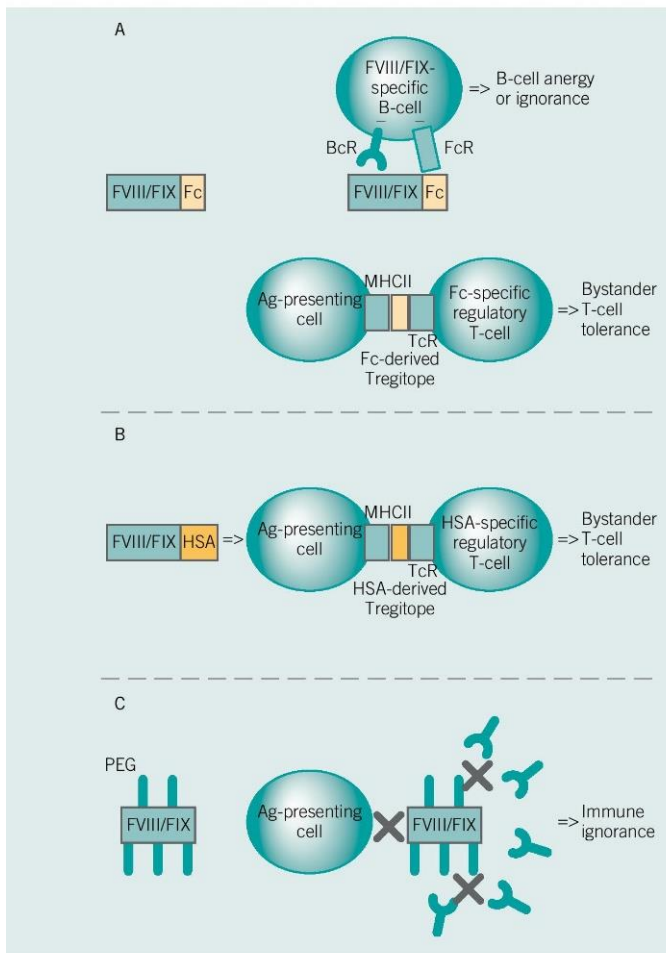
The treatment of patients with hemophilia A/B with 'natural' plasma-derived or recombinant FVIII/FIX is complicated by the onset of alloimmune responses; the development of neutralizing or 'inhibitory' antibodies precludes successful replacement therapy and represents an important clinical and societal burden. To date, and to our knowledge, a clear correlation between the residence time of a therapeutic product and its immunogenicity in the human has never been established. The present review summarizes the rationale underlying the use of Fc, albumin or PEG and will focus on the anticipated consequences of derivatizing recombinant human FVIII/FIX on their immunogenicity.

Fc-coupling of therapeutic FVIII and FIX

Immunoglobulins of the IgG isotype are among the proteins with the longest half-life in the blood: IgG1, IgG2 and IgG4 sub-classes have a half-life of 3 weeks [1]. The long circulation time is conveyed by the Fc portion of IgG and by its ability to bind to the salvage neonatal Fc receptor (FcRn). The FcRn is a receptor expressed by many cell types [2] in several tissues, especially in the vascular endothelium. Endothelial cells permanently internalize blood-borne molecules by macropinocytosis. Acidification of the early endosomes promotes the binding of the endocytosed IgG to the FcRn through the CH2 domain of the Fc region. FcRn binding allows the redirection of IgG from the lysosomal degradation compartment to the cell membrane. At neutral pH, FcRn-bound IgG is released into the circulation. Such a property of the human Fc has been exploited recently to improve the residence time of recombinant human FIX and B domain-deleted FVIII *in vivo*.

Indeed, several studies have described FVIII or FIX products fused with the Fc portion of human IgG1: the products are termed Elocate™ and Alprolix™, respectively. FVIII-Fc was generated upon fusion of the genes encoding the human B-domain-deleted FVIII and the human IgG1 Fc. Fusion of the Fc to FVIII did not alter

Figure 1. Putative effects of FVIII/FIX derivation on effectors of the immune response. Panel A: the presence of an Fc moiety on FVIII/FIX might facilitate the cross-linking of surface B cell receptor and Fc receptors, thus anergizing B lymphocytes, or bring about regulatory T cell epitopes (Tregitopes) that would boost Fc-specific regulatory T cells (Treg). The Tregs would then induce bystander tolerance to FVIII/FIX. Panel B: the fusion of HSA on FVIII/FIX might bring about Tregitopes that would recruit HSA-specific regulatory T cells (Treg). The Tregs would then induce bystander tolerance to FVIII/FIX. Panel C: derivatization of FVIII/FIX with PEG may prevent endocytosis by antigen-presenting cells (dendritic cells or macrophages) or hide essential B-cell epitopes. BcR, B-cell receptor; FcR, Fc receptor; MHCII, major histocompatibility complex class II, TcR, T-cell receptor.



the specific activity of FVIII and conferred a 2-fold increased half-life as compared to native B domain-deleted FVIII when injected to hemophilic A mice and dogs [3]. Further, FVIII-Fc was as efficient as native FVIII in tail clip experiments in hemophilia A mice and corrected whole blood clotting time in hemophilia A dogs. Phase 1, 2a and 3 clinical trials have documented a 1.5-fold extended

half-life of FVIII-Fc (19 hours) as compared to native FVIII (12.4 hours) in patients, and a decreased annualized bleeding rate [4,5]. Importantly, the phase 3 trial has demonstrated the safety of FVIII-Fc without inhibitor development in the 165 previously treated patients (PTPs) having severe hemophilia A under a prophylaxis regimen for more than 50 cumulated exposure days (CED).

FIX-Fc was generated using a similar strategy. Administration of FIX-Fc to FIX-deficient mice and dogs extended the half-life by 3- to 4-fold as compared to native FIX and there was a 2-fold increase in whole blood clotting time [6]. FIX-Fc has now completed phase 3 clinical trials, confirming the 3-fold extended half-life of FIX-Fc in humans, its efficacy in prophylaxis and in episodic treatment and the absent anti-FIX-Fc antibody formation in previously treated patients [7,8].

Clinical trials for patients with hemophilia are currently designed to exclude an increase in the immunogenicity of the tested products; however, the number of patients included in the studies up to date is too low to reveal whether Fc-derivatized FVIII and FIX lack immunogenicity or present with the same immunogenicity as their native counterparts. As explained below, the presence of an Fc region should in theory reduce the chances for an immune response to develop, either owing to the presence of regulatory T-cell epitopes in the Fc portion of human IgG, or by virtue of crosslinking the B-cell receptor (BCR) and Fc receptors (FcR) on B lymphocytes.

Regulatory T-cell epitopes. The Fc fragment of IgG, and particularly the CH2 domain, has recently been shown to contain atypical T-cell epitopes, which specifically expand CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells (Tregs) and favor the secretion of immunosuppressive cytokines upon *in vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells [9]. Fc-derived regulatory T-cell epitopes, referred to as Tregitopes, were found to confer tolerance to recombinant adeno-associated virus (AAV) gene transfer vectors [10]. The presence of such Tregitopes in the FVIII/FIX-Fc molecules may present an advantage in favoring the induction of Tregs. The efficiency of Tregitopes in conferring systemic tolerance is however controversial in view of the development of neutralizing antibodies in patients treated with therapeutic monoclonal antibodies, such as natalizumab, infliximab or rituximab, that, in essence, contain Tregitopes.

Crosslinking of the BCR and FcR on B cells. In patients with severe hemophilia A/B who lack circulating FVIII/FIX antigen, naïve B cells specific for FVIII/FIX have not been eliminated during ontogeny. Moreover, in the course of the anti-FVIII/FIX immune response which may develop in some patients upon replacement therapy, memory B cells are generated that harbor a FVIII/FIX-specific BCR. Fundamental research demonstrates that the cross-linking of the BCR and the low affinity FcγRIIB receptor on B cells prevents B-cell proliferation and down-regulates humoral immune responses [11]. In this respect, it may be anticipated that co-ligation by FVIII/FIX-Fc fused proteins of the FVIII/FIX-specific BCR and the FcR on naïve B cells prevents the onset of deleterious alloimmune responses. Likewise, co-ligation by FVIII/FIX-Fc fused proteins of FVIII/FIX-specific BCR and FcR on memory or activated B cells in inhibitor-positive patients may become an alternative to immune tolerance induction (ITI) with high-dose FVIII administration.

Future perspectives in the use of Fc-coupled proteins include the introduction of mutations that increase the affinity of the Fc i) for the FcRn, in order to further increase the Fc-dependent half-life of the protein therapeutic [12], or ii) for the FcγRIIB, in order to promote B-cell anergy [13]. Interestingly, FcγRIIB has been shown to recycle internalized immune complexes: increasing binding to FcγRIIB may thus further increase the half-life of FVIII/FIX-Fc molecules. Of note, FcγRIIB is not found on platelets [14]. Lastly, the FcRn is expressed on the syncytiotrophoblast where it mediates the transfer of maternal IgG to the fetal circulation [2]. This opens the perspective for the materno–fetal transfer of FVIII/FIX to hemophilic babies *in utero*, at the time of the ontogeny of the immune system and acquisition of tolerance to self, a strategy that should confer life-long lasting tolerance to FVIII/FIX.

Albumin-coupling of therapeutic FVIII and FIX

Albumin is the most abundant protein circulating in the blood, accounting for 50% of total plasma proteins. Albumin is highly charged, rendering it highly soluble in the blood. This stable protein acts as a natural carrier for numerous endogenous hydrophobic molecules, such as fatty acids or thyroid hormones, and plays a key role in scavenging free radical species when these are released in the blood. Albumin displays a long half-life (20 days) owing to its interaction with FcRn on endothelial cells, allowing the redirection of internalized albumin to the circulation. This prolonged half-life makes albumin an attractive fusion partner to increase the residence time of therapeutic drugs. Coupling of albumin can be achieved by chemically altering the drug to allow covalent binding, or by fusion of the genes encoding human serum albumin and the therapeutic protein.

Several recombinant albumin fusion proteins have thus been successfully generated and are currently being assayed in pre-clinical and clinical trials. Albumin-coupled glucagon-like peptide 1 (GLP-1, Albiglutide®, GlaxoSmithKline) has been generated to treat type 2 diabetes mellitus. In human, GLP-1 circulation time was shown to be significantly extended from 5 minutes for the native molecule to 5 days in the case of Albiglutide [15]. A recent phase 3 clinical trial has demonstrated the efficacy of Albiglutide in improving glycemic control in type 2 diabetic participants [16]. While anti-Albiglutide antibodies were detected in 3.7% of the participants, the antibodies were transient and did not neutralize the activity of GLP-1, and repeated Albiglutide infusions did not induce anaphylactic reactions. Activated FVII (FVIIa) is used in inhibitor-positive patients with hemophilia to control bleeding episodes. However, the short half-life of FVIIa (2.5 hours) requires numerous injections to restore an appropriate hemostasis status. A recombinant FVIIa fused to albumin, termed rVIIa-FP (CSL-Behring), has recently been generated by gene engineering, and rVIIa-FP displays a similar hemostatic activity as recombinant FVIIa [17]. A phase 1 clinical trial has demonstrated a drastic increase in the circulation time and a decrease in the clearance rate [18]. None of the patients developed an anti-rVIIa-FP immune response. Albumin-fused FVIII and FIX have also been generated by CSL-Behring. While albumin-fused FVIII failed to demonstrate improved half-life, albumin-fused FIX (rIX-FP) presents with a 2- to 4-fold increased half-life when infused to PTPs with severe hemophilia B [19]. No inhibitor to rIX-FP was

detected in the cohort even after 150 CED. Phase 2/3 trials are currently ongoing.

As the most prominent protein present in the blood, albumin is not likely to display immunogenicity when administered exogenously. This has been empirically confirmed by the fact that the use of therapeutic albumin in patients with acute hypovolemia [20] has never been associated with the incidence of overt anti-albumin immune responses. *In silico* studies have suggested the presence of six putative Tregitopes on human albumin. One of the Tregitopes is also found on bovine serum albumin. Administration of bovine serum albumin to a mouse model of atherosclerosis was shown by Kolbus and colleagues to decrease the severity of the disease [21], and was associated with the expansion of Tregs *in vivo* and production of immunosuppressive cytokines by splenocytes *in vitro*. A direct role of the Tregitope in providing tolerance was however not demonstrated. Likewise, whether albumin-coupling may reduce the immunogenicity of the coupled therapeutic protein, for instance by masking putative antigenic epitopes, requires further investigation.

PEGylation of therapeutic FVIII and FIX

PEGylation consists of a covalent link between a polymer of ethylene glycol units and a protein. Attachment of a PEG moiety modifies the physicochemical features of the target protein: the binding of PEG to charged amino acids disturbs the charge of the whole protein, the amphiphilic characteristic of PEG confers a higher solubility in blood and, more importantly, the size of PEG extends the circulation time significantly by reducing the rate of kidney clearance. PEGylation can be realized by various methods and several variables have to be considered, such as the molecular weight of the PEG used, the structure (linear or branched PEG), or the number of PEGylations to be attached on each target molecule. During the last decades, several PEGylated protein therapeutics have successfully reached clinical application. For example, a PEGylated form of interferon α2a (Pegasys®, Roche) was approved in 2002 for the treatment of hepatitis C. More recently, several coagulation factors have been PEGylated in order to prolong their circulation half-life (reviewed in [22]).

Historically, PEGylation of proteins was proposed to reduce the immunogenicity of the derivatized proteins [23]. Indeed, PEG can impede the occurrence of neutralizing antibodies by masking antigenic sites present on proteins. PEG may also mask hydrophobic sites that participate in the formation of aggregates. PEG has also been suggested to reduce the uptake of PEGylated proteins by antigen-presenting cells [24]. Nevertheless, in contrast to the general assumption that PEG itself is biologically inert, it is both immunogenic and antigenic [25]. *In vivo* studies in animals showed the occurrence of anti-PEG antibodies when PEG-coupled agents were injected: administration of PEGylated ovalbumin to rabbit resulted in the induction of anti-PEG immune response [26]. Likewise, occurrence of anti-PEG antibodies in patients with acute lymphoblastic leukemia was shown to reduce the efficacy of therapeutic PEG-asparaginase [27]. Conversely, the presence of pre-existing anti-PEG antibodies in patients with hepatitis C virus did not impair the efficacy of treatment with PEG-interferon [28].

In 2010, Mei *et al* [29] reported the successful generation of B-domain deleted FVIII that was PEGylated on specific cysteine residues, termed BAY 94–9027. The molecule retained full activity even in the presence of antibodies directed against the PEG moiety. PEGylated FVIII exhibited improved pharmacokinetics in hemophilic mice and rabbits, with a 2- to 3-fold increase of plasma half-life. BAY 94–9027 demonstrated decreased FVIII-specific T-cell immune response in hemophilic mice as compared to non-PEGylated FVIII, and reduced uptake by human dendritic cells, suggesting a lower immunogenicity [24]. In a recent phase 1 clinical trial, BAY 94–9027 confirmed a longer half-life (19 hours versus 13 hours for B-domain deleted FVIII) and the absence of anti-FVIII or anti-PEG antibodies after 8 weeks of treatment [30]. A PEGylated form of Advate, a full-length recombinant FVIII (BAX 855, Baxter), has achieved similar results [31]. In this case, the lower catabolism of BAX 855 was attributed to an impaired interaction of the PEGylated FVIII with its catabolic receptor Low Density Lipoprotein Receptor Protein (LRP, CD91). A recombinant FIX molecule, referred to as N9–GP, was generated upon linking by site-directed glycoPEGylation of a 40-kDa PEG moiety to the activation peptide of FIX. The molecule did not generate FIX inhibitors in a phase 1 clinical trial [32].

Altogether, the available results suggest that, while the role of PEG in increasing half-life of coupled therapeutic agents has been demonstrated, its contribution to dampening the immunogenicity of derivatized protein therapeutics needs further evaluation.

Conclusion

With a constant improvement in the efficacy of the therapeutic products and of the treatment regimens over the years, the perception of hemophilia is evolving from that of a severe and crippling disease to a chronic pathology that can be medically controlled, at least in western countries. Concomitantly, progress in drug design has focused on increasing the quality of life of the patients, in particular by prolonging the half-life of the products: increasing the persistence of FVIII/FIX in blood should provide longer protection to patients against micro-bleeds in joints and should delay or abrogate the development of arthropathy; it should also facilitate adherence to treatment by reducing the frequency of drug administration.

As explained above, two major strategies have been investigated to prolong FVIII/FIX half-life: i) coupling the protein therapeutics to Fc fragments of IgG or to albumin, which exploits the properties of FcRn in allowing the recirculation of the molecules after internalization by scavenger cells, and ii) PEGylating the protein therapeutics, which, among other mechanisms, reduces the catabolism of the molecules by impairing binding to catabolic receptors. An array of evidence suggests that the new long-lasting FVIII and FIX products may exhibit less immunogenicity than the native products: Fc fragments and albumin carry regulatory T-cell epitopes and/or are major circulating proteins that are tolerated by the immune system; PEG may protect FVIII/FIX from interacting with antigen-presenting cells and immune effectors. Yet, FVIII and FIX may yield different results. Indeed, FVIII is unique in terms of immunogenicity, in view of the fact that it is injected in low amounts and intravenously, a known tolerogenic route of administration. Up

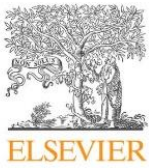
to 50% of patients with severe hemophilia A develop FVIII inhibitors upon replacement therapy.

Further, a non-negligible number of patients with point mutations also develop FVIII inhibitors despite the presence of an ‘almost normal’ FVIII molecule in the blood. Interestingly, the co-injection of ovalbumin (OVA) and FVIII to FVIII-deficient mice was shown to drastically boost the anti-OVA humoral immune response, as compared to the injection of OVA alone which demonstrated poor immunogenicity [33]. The latter data suggests that FVIII may be endowed with an adjuvant role towards the immune system, the reason for which remains unclear. Caution and watchful strategies should be adopted to ensure that the FVIII coupled to ‘long-lasting moieties’ (i.e. Fc, albumin, PEG) does not increase their immunogenicity.

References

- Morell A, Terry WD, Waldmann TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest* 1970; **49**: 673–680.
- Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 715–725.
- Dumont JA, Liu T, Low SC *et al*. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood* 2012; **119**: 3024–3030.
- Powell J, Martinowitz U, Windyga J *et al* and LipLong Study Investigators. Efficacy and safety of prophylaxis with once-weekly BAY 79-4980 compared with thrice-weekly rFVIII-FS in haemophilia A patients. A randomised, active-controlled, double-blind study. *Thromb Haemost* 2012; **108**: 913–922.
- 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**: 317–325.
- Peters RT, Low SC, Kamphaus GD *et al*. Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. *Blood* 2010; **115**: 2057–2064.
- Shapiro AD, Ragni MV, Valentino LA *et al*. Recombinant factor IX-Fc fusion protein (rFIXFc) demonstrates safety and prolonged activity in a phase 1/2a study in hemophilia B patients. *Blood* 2012; **119**: 666–672.
- Powell JS, Pasi KJ, Ragni MV *et al*. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. *N Engl J Med* 2013; **69**: 2313–2323.
- De Groot AS, Moise L, McMurry JA *et al*. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide ‘Tregitopes’. *Blood* 2008; **112**: 3303–3311.
- Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Chen Y *et al*. Modulation of CD8⁺ T cell responses to AAV vectors with IgG-derived MHC class II epitopes. *Mol Ther* 2013; **21**: 1727–1737.

11. Horton HM, Chu SY, Ortiz EC *et al.* Antibody-mediated coengagement of FcγRIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; **186**: 4223–4233.
12. Zalevsky J, Chamberlain AK, Horton HM *et al.* Enhanced antibody half-life improves *in vivo* activity. *Nat Biotechnol* 2010; **28**: 157–159.
13. Mimoto F, Katada H, Kadono S *et al.* Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcγRIIb binding over both FcγRIIa(R131) and FcγRIIa(H131). *Protein Eng Des Sel* 2013; **26**: 589–598.
14. Cassel DL, Keller MA, Surrey S *et al.* Differential expression of Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIb and Fc gamma RIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol* 1993; **30**: 451–460.
15. Neumiller JJ. Clinical pharmacology of incretin therapies for type 2 diabetes mellitus: implications for treatment. *Clin Ther* 2011; **33**: 528–576.
16. Pratley RE, Nauck MA, Barnett AH *et al.* Once-weekly albiglutide versus once-daily liraglutide in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on oral drugs (HARMONY 7): a randomised, open-label, multicentre, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; **2**: 289–297.
17. Weimer T, Wormsbächer W, Kronthaler U *et al.* Prolonged *in-vivo* half-life of factor VIIa by fusion to albumin. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 659–667.
18. Golor G, Bensen-Kennedy D, Haffner S *et al.* Safety and pharmacokinetics of a recombinant fusion protein linking coagulation factor VIIa with albumin in healthy volunteers. *J Thromb Haemost* 2013; **11**: 1977–1985.
19. Martinowitz U, Lubetsky A. Phase I/II, open-label, multicenter, safety, efficacy and PK study of a recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in subjects with hemophilia B. *Thromb Res* 2013; **131(Suppl. 2)**: S11–S14.
20. Caraceni P, Tufoni M, Bonavita ME. Clinical use of albumin. *Blood Transfus* 2013; **11(Suppl. 4)**: S18–S25.
21. Kolbus D, Wigren M, Ljungcrantz I *et al.* Immunization with cationized BSA inhibits progression of disease in ApoBec-1/ LDL receptor deficient mice with manifest atherosclerosis. *Immunobiology* 2011; **216**: 663–669.
22. Kaufman R, Powell JS. Molecular approaches for improved clotting factors for hemophilia. *Blood* 2013; **122**: 3568–3574.
23. Abuchowski A, van Es T, Palczuk NC *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem* 1977; **252**: 3578–3581.
24. Paz P, Xie J, Fuelle L *et al.* PEGylated FVIII exhibits reduced immunogenicity in hemophilia A mice and *in vitro* in human cells. *Haemophilia* 2012; **18**: 1–208.
25. Garay RP, El-Gewely R, Armstrong JK *et al.* Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv* 2012; **9**: 1319–1323.
26. Richter AW, Akerblom E. Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethylene glycol modified proteins. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983; **70**: 124–131.
27. Armstrong JK, Hempel G, Koling S *et al.* Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 2007; **110**: 103–111.
28. Tillmann H, Ganson NJ, Patel K *et al.* High prevalence of pre-existing antibodies against polyethylene glycol (PEG) in hepatitis C (HCV) patients which is not associated with impaired response to PEG-interferon. *J Hepatol* 2010; **52**: S129.
29. Mei B, Pan C, Jiang H *et al.* Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. *Blood* 2010; **116**: 270–279.
30. Coyle TE, Reding MT, Lin JC *et al.* Phase I study of BAY 94–9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant FVIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2014; **12(4)**: 488–496.
31. Turecek PL, Bossard MJ, Graninger M *et al.* BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Haemostaseologie* 2012; **32(Suppl. 1)**: S29–S38.
32. Negrier C, Knobe K, Tiede A *et al.* Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B. *Blood* 2011; **118**: 2695–2701.
33. Skupsky J, Zhang AH, Su Y *et al.* A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 2009; **114**: 4741–4748.



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycimm



Review article

Immunogenicity of long-lasting recombinant factor VIII products



Mathieu Ing^{a,b,c}, Nimesh Gupta^d, Maud Teyssandier^{a,b,c}, Bernard Maillère^e, Marc Pallardy^f, Sandrine Delignat^{a,b,c}, Sébastien Lacroix-Desmazes^{a,b,c,*}, on behalf of the ABIRISK consortium

^aSorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France

^bINSERM, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France

^cSorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France

^dNational Institute of Immunology, New Delhi, India

^eCEA-Saclay Institute of Biology and Technologies, Gif sur Yvette, France

^fINSERM, UMR996, Faculté Pharmacie, Université Paris Sud, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2015
 Revised 27 November 2015
 Accepted 18 December 2015
 Available online 19 December 2015

Keywords:

Hemophilia
 Coagulation factor
 Factor VIII
 Long-lasting
 Immunogenicity
 Fc fusion
 Albumin fusion
 PEGylation

ABSTRACT

Replacement therapy for patients with hemophilia A using plasma-derived or recombinant factor VIII (FVIII) is complicated by the short half-life of the FVIII products and by the occurrence of neutralizing antibodies in a substantial number of patients. In the recent years, enormous efforts have been invested to develop new generations of coagulation factors with extended half-lives. Presumably, the use of long-lasting FVIII products should reduce the frequency of administration to the patients and drastically improve their quality of life. The question of their immunogenicity remains however unanswered as yet. The present review proposes a summary of the different strategies developed to enhance the half-life of FVIII, including fusion of FVIII to the Fc fragment of the human IgG1 or to human serum albumin, or attachment of polyethylene glycol. Based on the available literature, we hypothesize on the potential benefits or risks associated with each of the latter strategies in terms of immunogenicity of the newly derived hemostatic drugs.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	41
2. Coupling therapeutic FVIII to human Fc fragments	41
2.1. Fc-mediated immune interactions	42
2.2. Tolerance through regulatory T cell epitopes	42
3. Coupling therapeutic FVIII to human albumin	42
4. PEGylation of therapeutic FVIII	44
4.1. Safety and immunological aspect of PEG	44
5. Conclusions	45
Conflict of interest	46
Acknowledgments	46
References	46

Abbreviations: APC, antigen-presenting cells; BcR, B cell receptor; EMA, European Medicines Agency; Fc, crystallizable fragment; FcγR, receptor for IgG Fc portion; FcRn, neonatal Fc receptor; FVIIa, activated factor VII; FVIII, factor VIII; GLP-1, glucagon-like peptide 1; HA1, hemagglutinin; HSA, human serum albumin; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; LRP-1, lipoprotein receptor protein 1; MHC, major histocompatibility complex; PEG, polyethylene glycol; PTPs, previously treated patients; PUPs, previously untreated patients; Tregs, regulatory T cells; VWF, von Willebrand factor.

* Corresponding author at: INSERM UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France.

E-mail address: sebastien.lacroix-desmazes@crc.jussieu.fr (S. Lacroix-Desmazes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.12.006>
 0008-8749/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The past decades have witnessed extraordinary improvement in the treatment of bleeding disorders. Progressing from the Stone Age, with the use of whole blood and cryoprecipitate infusion, we have evolved to a modern time where recombinant coagulation factors are administered. Congenital disorders such as hemophilia A, that display life-threatening bleeding manifestations, have benefited utmost from the development of new generation therapeutic factor VIII (FVIII), owing to the implication and commitment of the pharmaceutical field. Simultaneously, clinical studies as well as the implication of clinicians and basic researchers have promoted new treatment regimens (prophylaxis rather than “on-demand” treatment) that reduce the risks for hemarthrosis and arthropathy episodes and have improved the quality of life of hemophilic patients.

Despite the quality of FVIII in terms of efficacy and viral safety, the short half-life of FVIII imposes frequent administrations to provide an optimal protection of the patients from bleeding episodes. This is understandably associated with a limited adherence of the patients to prophylaxis regimen, thereby resulting in a lack of complete protection and higher treatment costs. Accordingly, the most recent developments for therapeutic coagulation factors have focused on extending their half-life in the blood: recombinant factors with longer residual time in circulation would cumulate the benefice of reducing the frequency of administration, thus improving the compliance of patients, and increasing the bleed-free time-span of the patients, thus reducing the risks for minor arthropathy-prone joint bleeds. In this context, several strategies are being exploited to optimize the pharmacokinetics of therapeutic FVIII, that include coupling of the effector protein to dimeric Fc fragments of human immunoglobulin G, to polyethylene glycol (PEG) or to human serum albumin (HSA).

The treatment of patients with hemophilia A using exogenous FVIII is complicated by the immunogenicity of the infused FVIII. Indeed, up to 30% of patients with severe hemophilia A, and up to 5% of patients with mild/moderate forms of the disease, develop anti-FVIII IgG antibodies following replacement therapy. The induced anti-FVIII IgG presumably affect the pharmacokinetics of the exogenously administered coagulation factors but, more critically, inhibit their pro-coagulant activity. The development of inhibitory anti-FVIII IgG, or ‘FVIII inhibitors’, represents a major clinical burden as well as a major societal concern owing to the additional costs that are associated with inhibitor management. To our knowledge, there is no available study that clearly establishes a correlation between the residual time of a molecule and its immunogenicity in humans. It is thus hazardous to predict the immunogenicity of long-acting FVIII products. Besides, FVIII exhibits a degree of immunogenicity that is unexpected given the fact that FVIII has no known pro-inflammatory role. In this review, we summarize the rationale for the different strategies developed to enhance the half-life of FVIII. Based on the available evidence, we further anticipate the consequences and limitations of coupling FVIII to ‘half-life enhancers’ for its immunogenicity in hemophilia A patients.

2. Coupling therapeutic FVIII to human Fc fragments

The interaction of the Fc domain of immunoglobulins with the neonatal Fc receptor (FcRn) has been known for years as a physiological mechanism that protects IgGs from catabolism and confers them a long half-life in the blood [1]. Therefore, IgGs of the IgG1, IgG2 and IgG4 sub-classes are known to circulate in the body with a half-life of 3 weeks. The FcRn is expressed at many sites and by

different cell types in mammals, where it mediates IgG transcytosis and IgG recycling in a pH-dependent manner [1]. In particular, the FcRn expressed in the vascular endothelium participates in protection of IgG from degradation. Endothelial cells widely express FcRn and are able to internalize blood-borne molecules by pinocytosis. Under acidic pH in the early endosomes, the engulfed IgG binds the FcRn through their C₁2 domain. Upon further acidification of the endosomes, IgG–FcRn complexes are redirected from the lysosomal degradation compartment to the cell surface. At neutral pH, the bound IgG dissociates from FcRn and is released in the circulation. This property has been exploited to increase the residence time of coagulation factors *in vivo*. Besides, owing to the conformation of the Fc domain, Fc-fused proteins are generally endowed with improved biophysical characteristics in terms of stability and solubility.

In particular, a new generation of recombinant FVIII, referred to as Elocate™ in North America, has been developed by fusing the dimeric C₁2–C₁3 domains of the human IgG1 Fc to the recombinant B domain-deleted FVIII. The post-translational modifications on the FVIII moiety are similar to that found on the commercially available B domain-deleted FVIII product, and the dimeric Fc carries two additional asparagine-glycosylated moieties. The addition of the Fc domain substantially increases the plasma half-life of FVIII and thus reduces the dosing frequency necessary to achieve prophylaxis in the patients. Thus, studies in pre-clinical models of hemophilia A have shown that fusion of the Fc to B domain-deleted FVIII confers a 2-fold increased half-life over recombinant FVIII, while preserving the specific activity of FVIII [2]. Indeed, the functionality of the Fc-fused FVIII in correcting whole blood clotting time has been demonstrated in FVIII-deficient mice, a model of severe hemophilia A, as well as in hemophilic dogs. The Fc-fused FVIII demonstrates a 1.5-fold extended half-life in human clinical trials as well as reduced annualized bleeding rates as compared to its non-fused counterpart [3–5].

From an immunogenicity standpoint, available data from clinical trials suggest that FVIII-Fc is a safe molecule since no inhibitor development has been reported under prophylaxis regimen [5,6]. It is important to note however that clinical trials have been performed only in previously treated patients (PTPs) with severe hemophilia A, who are at a lower risk of developing an alloimmune response to exogenous FVIII as compared to previously untreated patients (PUPs) [7]. Ongoing clinical trials performed in PUPs in Europe, which are required by the European Medicines Agency (EMA) prior to release of the drug on the European market, shall bring additional evidence in the coming years.

Presentation of Fc-fused FVIII as a magic drug devoid of immunogenicity needs to be confronted to the facts that therapeutic human monoclonal antibodies do induce neutralizing antibodies in a substantial number of patients [8] and the fused Fc domain has been used for enhancing the adjuvant properties of vaccine antigens [9,10]. Because the Fc portion of FVIII not only interacts with FcRn, but also with a number of receptors for the Fc portion of IgG (FcγR), as well as receptors for Fc-linked glycans [11], there are little chances that the FVIII-Fc fusion molecule will be immunologically inert. Yet, recent work by Krishnamoorthy et al. shows that the immune response to FVIII-Fc in FVIII-deficient mice, is less frequent, or less intense, than in the case of FVIII lacking the Fc fragment, when FVIII is injected at 50 IU/kg [12]. However, at higher concentrations, all FVIII products show the same degree of immunogenicity. The rest of this chapter is an attempt to anticipate the interactions of FVIII-Fc with cells of the innate and adaptive immune system, and potential immunological consequences of infusing Fc-fused FVIII in patients.

2.1. Fc-mediated immune interactions

Navarrete et al. have previously observed that the marginal zone in the spleen is the primary site of FVIII accumulation in hemophilic mice [13]. Recently published data comparing the half-life and biodistribution of recombinant FVIII and FVIII-Fc intravenously administered to FVIII-deficient mice suggest that the accumulation of both molecules in the spleen does not show drastic differences [14]. The data also show that, as is the case for exogenous recombinant FVIII, the half-life and biodistribution of FVIII-Fc is largely dependent upon its interaction with endogenous von Willebrand factor (VWF). Interestingly, in view of the plethora of Fc receptors and Fc-binding cellular proteins expressed on immune cells, one may anticipate that FVIII-Fc is more prone to interact with immune cells than its native FVIII counterpart. In particular, one might foresee a synergistic effect of Fc-dependent and FVIII-dependent interactions with different types of endocytic receptors expressed by the same cells, although any repercussion in terms of immune activation or immune tolerance induction remains speculative.

Dendritic cells, monocytes, macrophages and neutrophils are the primary immune cells participating in the initiation of immune responses. Provided the constitutive expression of various Fcγ receptors on these immune cells [15,16], it is anticipated that FVIII-Fc will interact with the latter cell types via its Fc domain, in addition to accumulating at the site of vascular injury. In this context, we may expect a differential assessment of FVIII and FVIII-Fc by the immune system, although predicting whether this will lead to increased or reduced immunogenicity is impossible. Dendritic cells are known to simultaneously express both the activating and inhibitory FcγR. Presumably, FVIII-Fc-mediated signaling through the inhibitory FcγRIIB on dendritic cells should favor peripheral tolerance (Fig. 1B), either by inhibiting dendritic cell activation or by limiting the processing of the exogenously acquired antigen [17]. However, the outcome of the immunological processing of FVIII-Fc will result from an equilibrium between the respective expression of the activating and inhibitory Fcγ receptors, the affinity of the Fc portion for the different FcRs and for FcRn, and the concentration of FVIII-Fc in the circulation at a given time point. Of note, our unpublished data show that injection of high doses of C2 domain of FVIII fused to the mouse Fcγ1 results in production of anti-C2 IgG by FVIII-deficient mice. Hence, the manifestation of immunogenicity may be highly dependent on the individual molecules that are fused to the Fc fragment.

Interestingly, Fc-mediated interactions also play a role in the context of secondary immune responses, once FVIII-specific T and B cells have been activated and have proliferated. Indeed, FcγRIIB is the only Fc receptor that is constitutively expressed by B cells. It has been demonstrated that cross-linking of the B cell receptor (BcR) and of the low affinity FcγRIIB inhibits B cell activation and proliferation in an antigen-specific manner, thus ablating humoral immune responses [18]. Despite the recent demonstration that FcγRIIB is required for the differentiation of FVIII-specific memory B cells into antibody-secreting plasma cells in mice [19], the data suggest that FVIII-Fc may anergize FVIII-specific B cells and favor immune tolerance (Fig. 1B).

2.2. Tolerance through regulatory T cell epitopes

The C_H2 domain of the IgG Fc fragment contains atypical T cell epitopes, which during co-presentation of Fc with associated antigen, has been shown to expand antigen-specific CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) [20]. Fc-derived regulatory T cell epitopes, referred to as Tregitopes, were also found to confer tolerance to recombinant adeno-associated virus gene transfer vectors [21]. The presence of such Tregitopes in the FVIII-Fc molecules

may present an advantage in favoring the induction of Tregs that would prevent the onset of deleterious anti-FVIII immune responses (Fig. 1B). However, the efficiency of Tregitope-mediated Treg generation may depend on the frequency of administration of Fc-fused proteins, and variations in circulating concentrations of FVIII-Fc could drive opposite effects in terms of immune regulation.

The development of the FVIII-Fc platform nevertheless offers tremendous opportunities for generating less immunogenic FVIII products in the future. For instance, the introduction of mutations in the Fc portion may favor immune tolerance induction by fine-tuning the affinity for particular Fc receptors, provided that expanding the half-life of FVIII-Fc by raising the affinity of the Fc fragment for the FcRn does not alter the interactions with the inhibitory FcγRIIB receptor. In another example, the therapeutic infusion of FVIII-Fc via the subcutaneous route may open up new regimens for immune tolerance induction. Dendritic cells, and in particular skin dendritic cells, contribute to tolerogenic or immunogenic responses depending on the acquired activation signals [22]. Thus, the commitment of epidermal Langerhans cells in inducing antigen-specific tolerance could be exploited with FVIII-Fc [23].

Lastly, FcRn is expressed on the syncytiotrophoblast where it mediates the transfer of maternal IgGs to the fetal circulation [1]. In an animal model of mucopolysaccharidosis, Fc-fused β-glucuronidase injected to pregnant mice was found to be transported through the placenta, thus correcting β-glucuronidase deficiency in the offspring [24]. In a recent proof-of-concept study, the transplacental transfer of Fc-fused A2 and C2 domains of FVIII from pregnant mice to the hemophilic fetuses was able to confer long-lasting immune tolerance to therapeutic FVIII [25]. Tolerance to FVIII was mediated by FVIII-specific Tregs generated during the fetal development of the immune system. The latter work provides novel perspectives for the materno-fetal transfer of FVIII-Fc to be-born hemophilic babies, at the time of immune ontogeny, to confer life-long tolerance to FVIII.

3. Coupling therapeutic FVIII to human albumin

Accounting for 50% of total plasma proteins, albumin is the most prominent protein circulating in the blood. Serum albumin is a natural carrier for several endogenous hydrophobic molecules, such as fatty acids or thyroid hormones; it is also involved in scavenging free radical species that may be released in the blood. Albumin displays a long half-life of 20 days *in vivo*. This persistence is attributed to both a high hydrodynamic size, which prevents glomerular filtration by kidneys, and interactions with the FcRn receptor expressed on endothelial cells, which redirects the internalized albumin to the blood stream. Such an extended half-life makes serum albumin an attractive fusion partner to prolong the residence time of therapeutic drugs. Conjugation can be performed by a covalent attachment of albumin to the drug or by the fusion of the genes encoding human serum albumin and the therapeutic protein of interest [26]. Several recombinant albumin-fused proteins have been successfully generated and are available on the market or currently tested in clinical trials [27]. For instance, albumin-coupled glucagon-like peptide 1 (Albiglutide[®], GlaxoSmithKline) has been developed to treat type II diabetes. Clinical studies have demonstrated a dramatic prolongation of circulation time after a single infusion of Albiglutide[®], from 5 min for the native glucagon-like peptide 1 (GLP-1) to 5 days for the albumin-fused molecule [28]. Recent phase 3 trial confirmed the efficacy of Albiglutide[®] [29], where Albiglutide[®] infusions successfully ameliorate glycemic control in type II diabetic patients. Nonetheless, 3.7% of treated patients were found to develop anti-

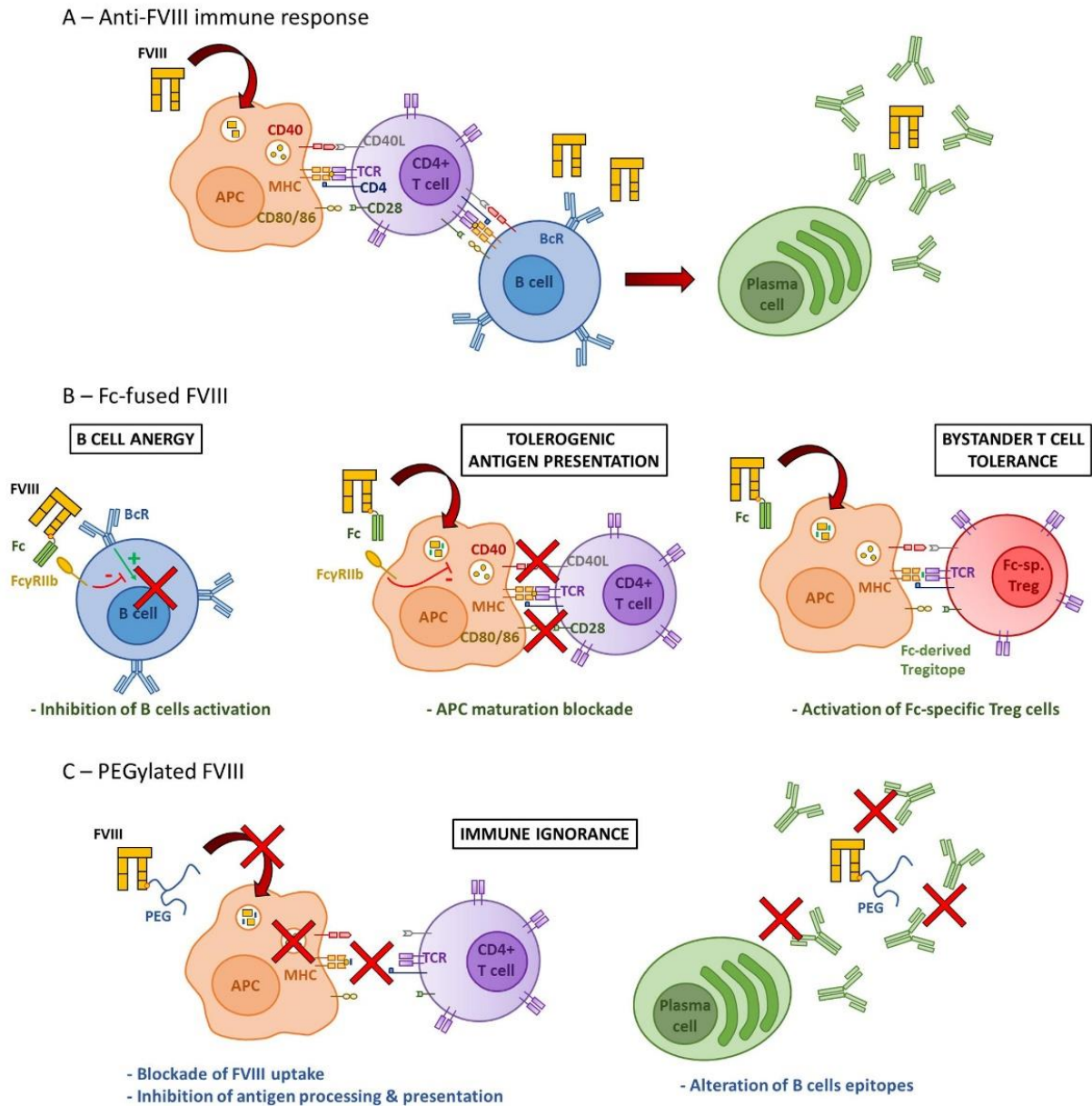


Fig. 1. Potential effects of FVIII alterations on the onset of the immune response against FVIII. Panel A. The anti-FVIII immune response is considered as a classical T-dependent immune response where exogenous FVIII is endocytosed by antigen presenting cells (APC), processed and presented to naïve FVIII-specific T lymphocytes that get activated. The latter will activate B lymphocytes, which will differentiate into inhibitory antibody-secreting plasma cells. Panel B. Fusion of Fc fragment to FVIII may facilitate the cross-linking of surface B cell receptors (BcR) and inhibitory FcγRIIb receptors, thus anergizing B cells (left). Fc fragment may interact with FcγRIIb receptors expressed on APC and impede their maturation, leading to FVIII-derived peptides antigenic presentation in a tolerogenic context (middle). Fc moiety might bring about regulatory T cell epitopes (Tregitopes) that would boost Fc-specific regulatory T cells (Tregs). Tregs would then induce a bystander tolerance to FVIII (right). Panel C. PEGylation of FVIII may prevent the uptake of FVIII by APC. Even if it is endocytosed, PEG moiety may alter FVIII processing and presentation to T lymphocytes. Finally, PEGylation may also mask B cells epitopes and prevent FVIII recognition by neutralizing antibodies.

Albiglutide® antibodies. The occurrence of anti-Albiglutide® antibodies was however transient and did not neutralize GLP-1 efficacy.

CSL-Behring® (Marburg, Germany) has developed an array of albumin-fused coagulation factors for the treatment of hemostatic conditions (patent WO 2011020866 A2, [30]). Inhibitor-positive patients with hemophilia A can be treated with activated factor VII (FVIIa). However, the short half-life of FVIIa (2.5 h) requires chronic injections to maintain correct hemostasis. A

recombinant FVIIa fused to albumin has been generated (rVIIa-FP) [31] that presents with a hemostatic activity similar to that of recombinant FVIIa. Clinical trials have highlighted the pharmacokinetic parameters of rVIIa-FP, with enhanced circulation time and lower clearance rate, and the safety of the product, as none of the rVIIa-FP-treated patients developed an anti-rVIIa-FP immune response [32]. Recombinant FIX-albumin, referred as rIX-FP, has also been produced and exhibits a 2- to 4-fold prolonged half-life compared to the non-fused form when adminis-

tered to previously treated patients with severe hemophilic B [33]. Likewise, none of the participants developed anti-rIX-FP inhibitory antibodies. An albumin-fused FVIII has also been generated and patented (termed as rVIII-FP). However, rVIII-FP failed to maintain FVIII pro-coagulant activity and no further study was published [34]. Some studies have highlighted limitations for albumin conjugation [35], such as the risks of incorrect folding of chimeric proteins that is likely to lead to a loss of therapeutic activity.

Since albumin is the most abundant protein in the blood, it is not likely that exogenously administered albumin will be recognized as a foreign antigen. This is indirectly suggested by the fact that the massive intravenous administration of albumin to patients suffering from acute hypovolemia has never been reported to elicit anti-albumin antibodies [36]. Hence, albumin-fused coagulation factors are not expected to exhibit immunogenic properties, and should elicit immune tolerance or ignorance. Besides, albumin might mask by steric hindrance putative antigenic epitopes expressed on therapeutics and impede any deleterious recognition by immune cells that may lead to premature clearance or immunogenic uptake by antigen presenting cells (APC). Importantly, *in silico* T cell epitope mapping studies have identified six potential Tregitopes within human albumin [37]. One of the Tregitopes is also found in bovine serum albumin. Interestingly, infusion of BSA in a murine model of atherosclerosis was shown to lower the severity of the pathology [38]. This was correlated with the expansion of circulating Tregs *in vivo* and production of immunosuppressive cytokines by splenocytes *in vitro*. However, a direct role for the Tregitope in the induction of tolerance was not demonstrated.

4. PEGylation of therapeutic FVIII

PEGylation consists in a covalent conjugation of polymers of ethylene glycol (PEG) to a carrier. PEGylation was found to extend the residence time of derivatized proteins [39,40], and was therefore considered as an efficient strategy to improve drug delivery and has been applied to enhance the lifespan of a large number of drugs over the last decades. PEG conjugation affects the physicochemical features of the target protein, without altering its structure. In particular, the hydrophilic property of PEG increases protein solubility in the bloodstream and dramatically enhances the hydrodynamic size of the conjugate, thus tempering glomerular filtration rate and significantly prolonging the circulation time in the body [41]. Moreover, PEG prevents the aggregation of derivatized proteins and hampers interactions with catabolic receptors, which also impedes a premature clearance from the circulation.

Based on these findings, PEGylation has been extensively exploited to generate long-lasting recombinant coagulation FVIII, such as BAY 94-9027, BAX 855 and N8-GP. PEGylation of FVIII was shown to confer prolonged efficacy in hemophilic mice, as compared to unmodified FVIII. BAY 94-9027, a single branched 60 kDa PEG-coupled B domain-deleted FVIII developed by Bayer, not only retains a full activity after PEGylation, but also exhibited enhanced pharmacokinetic parameters, with a 2- to 3-fold increase of circulating half-life as compared to non-PEGylated FVIII [42]. Recent phase I clinical trial has confirmed the longer half-life in humans, although the extension was less significant than in animal models, with a 1.5-fold increase (18.5 h versus 13 h for its non-PEGylated version) [43]. Furthermore, infusion of BAY 94-9027 to patients was not reported to elicit inhibiting antibodies. Likewise, PEGylation of Baxter's recombinant full-length FVIII Advate™ (BAX 855, 20 kDa PEG) has generated an improved molecule that exhibits a 1.8-fold extension of circulating time in primates com-

pared to native FVIII and that delays by 3 folds the time to reach trough level [44]. PEGylation of FVIII impedes the binding of BAX 855 to the low density lipoprotein receptor protein 1 (LRP-1), a catabolic receptor for FVIII, which accounts, at least in part, for the longer persistence of the molecule in the bloodstream. A recent clinical trial has highlighted a modest 1.5-fold increase of BAX 855 half-life [45]. Prophylactic regimen performed over several months on PTPs was not associated with the generation of neutralizing antibodies. Similarly, Novo-Nordisk has developed a glycoPEGylated version of a B-domain deleted FVIII (N8-GP, 40 kDa PEG coupled to B domain) which displays a 2-fold prolonged half-life in animal models of hemophilia A, as well as an extended hemostatic potential compared to uncoupled FVIII [46,47]. N8-GP was also shown to interact less with the catabolic receptor LRP-1. Clinical trials in PTPs with severe hemophilia A did not report the generation of anti-FVIII neutralizing antibodies [48].

From an immunological point of view, PEG theoretically gathers several characteristics that make it an ideal partner. PEGylation has been shown to annihilate the immunogenicity of heterologous proteins after administration to animals, as compared to the non-PEGylated counterparts [49]. The PEG moiety can mask structures that are recognized by endocytic receptors expressed on APC and hampers the uptake of the drug (Fig. 1C). Besides, even if PEGylated biopharmaceuticals are internalized, the processing that leads to the presentation of derived peptides onto major histocompatibility complex (MHC) class II molecules may be hampered by PEG-mediated steric hindrance. Alternatively, PEGylated peptides can be presented on APC surface, but may however not be recognized by T helper cells, thus preventing T cell activation, limiting the activation of antigen-specific B cells and, as a result, reducing the risk for the generation of anti-drug antibodies. In the case of FVIII, administration of BAY 94-9027 to hemophilic mice was correlated with a lower incidence of anti-FVIII antibodies and a reduction in the FVIII-specific T cell immune response. Besides, PEGylation, upon masking essential glycoprotein moieties involved in FVIII recognition, was shown to interfere with its uptake and presentation by human dendritic cells [50], and thus hindered the ensuing immunogenic presentation of FVIII-derived peptides to specific CD4⁺ T cells. Similarly, *in vitro* assays show that N8-GP binds less to human dendritic cells and is less internalized by these cells [46]. While any structural alteration of the FVIII molecule introduces a risk to enhance its immunogenicity, the generation of immunogenic B or T cell neo-epitopes within PEGylated FVIII is not supported by the available clinical studies, and no clear increase in the incidence of FVIII inhibitor has been reported up to date.

4.1. Safety and immunological aspect of PEG

Since PEG is a chemical compound that cannot be readily metabolized by the organism, concerns have been raised regarding its elimination/accumulation in the organism. It has been documented that PEG is cleared from the circulation through urinary excretion [51]. However, several studies have emphasized histological alterations in various organs and tissues, consecutive to the administration of PEG or PEGylated proteins. Infusion of PEGylated proteins was associated with a massive cytoplasmic vacuolation, evidenced in the kidney tubular epithelium [52] as well as in the reticuloendothelial system. These changes supposedly resulted from a deformation of lysosomes after the uptake of PEGylated proteins during their clearance process or by pinocytosis. Besides, the occurrence of foamy macrophages has been described after an iterative administration of PEG or PEGylated biotherapeutics [52–54]. PEG injection in rats led to a cellular vacuolation that occurred in different locations, such as lung alveolar

macrophages, hepatic Kupffer cells or splenic subcapsular red pulp histiocytes, where PEG was found to accumulate [53]. Since the reticuloendothelial system is a component involved in the clearance of cellular debris and foreign bodies, accumulation of PEG and vacuolation at the level of macrophages are part of a physiological mechanism. Nevertheless, issues have been raised about a putative toxicity of PEG, especially in a context (i.e., hemophilia) where administration of the PEGylated drug is chronic and starts during infancy. Of note, administration of high doses of PEGylated proteins to rodents was associated with splenic hypertrophy and an extensive vacuolation of splenic histiocytes [55]. Likewise, Young et al. demonstrated that infusion of maleimide-PEG-modified hemoglobin in primates is associated with the occurrence of foamy macrophages in the spleen and in the bone marrow [56]. Intriguingly, macrophage functions and phenotype were either not evaluated or not altered by vacuolation *in vivo*. However, mouse and human macrophages incubated with certolizumab pegol (PEGylated anti-tumor necrosis factor alpha, Cimzia®) *in vitro* showed a lower phagocytic ability for bacteria and fungi (report EMEA/664021/2009). Yet, no evidence regarding altered immune responses was found *in vivo* and the safety of Cimzia® was supported by preclinical and clinical studies, as no major adverse events was reported. Importantly, although vacuolation in tissues or in macrophages has been reported for several biopharmaceuticals commercially available or in clinical trials [51], the administration of BAX 855 to animals did not generate overt vacuolation [57].

While PEG is assumed to be neither antigenic nor immunogenic, an increasing number of studies provides evidence that administration of PEGylated products triggers unexpected anti-PEG antibody production [58]. Thirty years ago, Richter and Akerbloom demonstrated the generation of anti-PEG IgM antibodies in rodents after injections of PEGylated ovalbumin, while PEG injected alone did not elicit an antibody response [59,60]. In humans, anti-PEG antibodies have been reported in hepatitis C patients treated with PEGylated interferon, but the presence of anti-PEG antibodies was not associated with an impairment of the efficacy of interferon [61]. Conversely, in acute lymphoblastic leukemia, one third of the patients treated with PEGylated asparaginase presented with anti-PEG IgM antibodies, which were closely associated with a loss of function and an accelerated clearance of the molecule [62]. Whereas the exact mechanism for anti-PEG antibody elicitation remains unknown, several investigations have been performed to decipher the immunogenicity of PEG. Chronic intravenous infusion in mice of PEGylated liposomes, which are often used as a carrier for biopharmaceuticals, was correlated to an accelerated blood clearance and a marked reduction in bioavailability [63–65]. The anti-PEG immune response involves B cells from the marginal zone of the spleen and is characterized by a lack of immunoglobulin class switching as well as the absence of generation of memory B cells [66–70]. Therefore, the immune response develops in a thymo-independent manner. As PEG is constituted of multiple repeated patterns, it may be regarded as a type II antigen, similar to bacterial polysaccharides, and it may simultaneously engage several BcR expressed on the surface of B cells. This massive cross-linking of BcR is sufficient to induce the full differentiation of naïve B cells into IgM-secreting plasmocytes. Lastly, some reports suggest that PEGylated biotherapeutics are able to activate the complement system [71,72]. Complement activation leads to opsonization of the biotherapeutics by C3-derived fragments that may promote interactions with macrophages through complement receptors. This may participate in the accelerated decay of PEGylated pharmaceuticals, but may also induce pro-inflammatory anaphylatoxins, that can activate granulocytes and trigger hypersensitivity responses. Such a phenomenon probably accounts for the few cases of anaphylaxis observed in clinical trials, for

instance in the case of treatment with PEGylated liposomal doxorubicin [73].

Of note, immunogenicity studies in mice have shown that some forms of PEGylated FVIII evoke an anti-FVIII immune response, and are able to break immune tolerance the FVIII moiety [74]. However, the incriminated molecule exhibited 12 molecules of PEG per molecule of FVIII and drastically reduced specific activity, thus highlighting probable major structural modifications.

5. Conclusions

The development of a new generation of therapeutic coagulation factors is revolutionizing the treatment of patients with hemophilia. Specifically, novel products with extended half-lives should facilitate patient management, resulting in a drastically improved quality of life. Indeed, the reduced frequency of drug administration and the prolonged circulation time of the hemostatic drugs should provide a longer protection of the patients from micro-bleeds in joints, thus minimizing co-morbidity. In the particular case of pro-coagulant FVIII, among the three strategies developed to date, only Fc-fusion and PEGylation have yielded encouraging results and been translated to the patients, while albumin-fusion FVIII has failed. Yet, several issues remain to be addressed to develop products with unquestioned efficacy and safety.

One such question addresses the somewhat limited gain in half-lives of the Fc-fused and PEGylated FVIII products that do not exceed the circulation time of FVIII imposed by binding to its chaperone VWF. It is probable that VWF is endowed with a double-edged role towards FVIII catabolism, on one hand reducing the binding of FVIII to major catabolic receptors, but also on the other hand participating in, and probably leading, FVIII endocytosis by macrophages both *in vivo* and *in vitro* [75,76]. Under such conditions, it is probable that drastic gains in FVIII half-life for the new generation therapeutics will be achieved in setups that eliminate the part of FVIII catabolism mediated by VWF moieties, as may be the case in a recently developed recombinant FVIII-Fc/D'D3-Fc construct (patent WO 2013106787 A1).

One other important issue is that of the ever-astonishing intrinsic immunogenicity of the very FVIII molecule. While most biotherapeutics induce anti-drug antibodies in <5% of the patients, FVIII triggers inhibitory immune responses in up to 30% of patients with hemophilia A. FVIII remains an enigma in terms of immunogenicity, in view of the facts that it is injected intravenously, a known tolerogenic route of administration and in low amounts. A role for its pro-coagulant function in generating a burst of thrombin [77,78], the presence of incomplete glycans on its heavy and light chain that may favor immunogenic uptake by antigen-presenting cells [79,80] as well as the presence of particularly immunodominant T cell epitopes have been proposed to explain anti-FVIII immune responses [81–83]. Interestingly, FVIII immunogenicity is further highlighted by its capacity to confer immunogenicity to otherwise immunologically inert molecules. This has been observed in the case of fused protein moieties as seen in our unpublished experiments wherein fusion of the FVIII light chain to hemagglutinin drastically increased the anti-hemagglutinin immune response in FVIII-deficient mice (Fig. 2). Thus, FVIII may act as a carrier and trigger a deleterious immune response against fused moieties, which might eventually affect its lifespan.

Another critical issue is the mechanistic investigation of the immunogenicity of newly generated coagulation factors and the requirement of experimental models that mimic immune responses observed in humans and that are devoid of biasing inter-species immune reactions. In particular, studying the

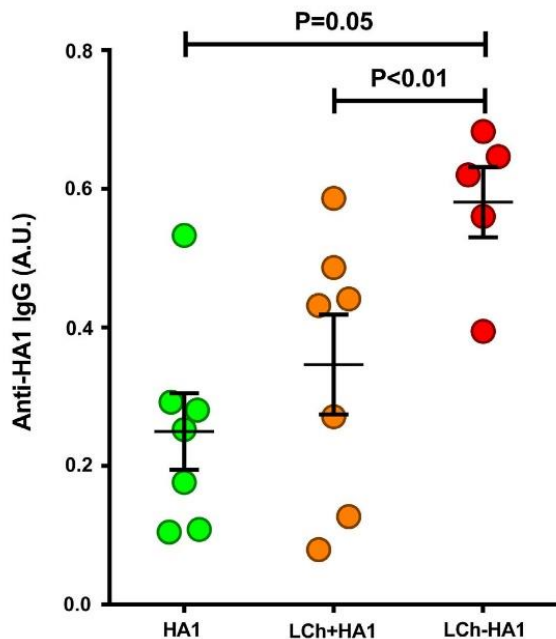


Fig. 2. Adjuvant effect of the light chain of human FVIII. The recombinant first domain of hemagglutinin (HA1), and the recombinant fused A3C1C2-HA1 (LCh-HA1) were produced using the HKB11 eukaryotic cell line. The light chain of FVIII (a3A3C1C2, LCh) was purified from therapeutic FVIII. FVIII-deficient mice were injected with the different proteins (1 pmol of each protein/mouse) once a week for four weeks. Five days after the fourth injection, anti-HA1 IgG were detected by ELISA. Levels of anti-HA1 IgG are depicted in arbitrary unit based on the optical density measured at 492 nm, and were statistically compared using the two-sided non-parametric Mann–Whitney test. Individual symbols represent levels of specific IgG for each individual mouse, and horizontal bars represent mean ± SEM.

immunogenicity of Fc-fused FVIII in FVIII-deficient mice may be biased by putative immune responses directed to the human Fc fragment, which would presumably not occur in the patients. Ideally, the immunogenicity of human FVIII should be evaluation using appropriate humanized animal models able to mount IgG-mediated humoral immune responses, in order to obtain relevant and basic immunological insights translatable to the bedside. Resolving the aforementioned concerns, the in-depth immunological investigations of new generation long-lasting coagulation factors should be of priority in the hemophilia research domain.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work 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 the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n. 115303, with resources from the European Union’s Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) and EFPIA companies’ in kind contribution. Mathieu Ing is the recipient of a fellowship from Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche (France).

References

- [1] D.C. Roopenian, S. Akilesh, FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 715–725, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2155>.
- [2] J.A. Dumont, T. Liu, S.C. Low, X. Zhang, G. Kamphaus, P. Sakorafas, et al., Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs, *Blood* 119 (2012) 3024–3030, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-367813>.
- [3] J.S. Powell, N.C. Josephson, D. Quon, M.V. Ragni, G. Cheng, E. Li, et al., Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients, *Blood* 119 (2012) 3031–3037, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-09-382846>.
- [4] A.D. Shapiro, M.V. Ragni, R. Kulkarni, J. Oldenberg, A. Srivastava, D.V. Quon, et al., Recombinant factor VIII Fc fusion protein: extended-interval dosing maintains low bleeding rates and correlates with von Willebrand factor levels, *J. Thromb. Haemost.* 12 (2014) 1788–1800, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12723>.
- [5] J. Mahlangu, J.S. Powell, M.V. Ragni, P. Chowdary, N.C. Josephson, I. Pabinger, et al., Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A, *Blood* 123 (2014) 317–325, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-10-529974>.
- [6] G. Young, J. Mahlangu, R. Kulkarni, B. Nolan, R. Liesner, J. Pasi, et al., Recombinant factor VIII Fc fusion protein for the prevention and treatment of bleeding in children with severe hemophilia A, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 967–977, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12911>.
- [7] S.C. Gouw, J.G. van der Bom, H. Marijke van den Berg, Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study, *Blood* 109 (2007) 4648–4654, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-11-056291>.
- [8] F.A. Harding, M.M. Stickler, J. Razo, R.B. DuBridg, The immunogenicity of humanized and fully human antibodies, *mAbs* 2 (2010) 256–265.
- [9] P.M. Guyre, R.F. Graziano, J. Goldstein, P.K. Wallace, P.M. Morganelli, K. Wardwell, et al., Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens, *Cancer Immunol. Immunother.* 45 (1997) 146–148.
- [10] K. Konduru, S.B. Bradfute, J. Jacques, M. Manangeeswaran, S. Nakamura, S. Morshed, et al., Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice, *Vaccine* 29 (2011) 2968–2977, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.113>.
- [11] A. Pincetic, S. Bourmazos, D.J. DiLillo, J. Maamary, T.T. Wang, R. Dahan, et al., Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 707–716, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2939>.
- [12] S. Krishnamoorthy, T. Liu, D. Drager, S. Patarroyo-White, E.S. Chhabra, S. Peters, et al., Recombinant factor VIII Fc (rFVIII-Fc) Fusion protein reduces immunogenicity and induces tolerance in hemophilia A mice, *Cell. Immunol.* 301 (2016) 30–39.
- [13] A. Navarrete, S. Dasgupta, S. Delignat, G. Caligiuri, O.D. Christophe, J. Bayry, et al., Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1816–1823, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03571.x>.
- [14] A. van der Flier, Z. Liu, S. Tan, K. Chen, D. Drager, T. Liu, et al., FcRn rescues recombinant factor VIII Fc fusion protein from a VWF independent FVIII clearance pathway in mouse hepatocytes, *PLoS ONE* 10 (2015) e0124930, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124930>.
- [15] P. Bruhns, Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models, *Blood* 119 (2012) 5640–5649, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121>.
- [16] F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch, Fc gamma receptors: old friends and new family members, *Immunity* 24 (2006) 19–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>.
- [17] D.D. Desai, S.O. Harbers, M. Flores, L. Colonna, M.P. Downie, A. Bergtold, et al., Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses, *J. Immunol. Baltimore Md* 1950 (178) (2007) 6217–6226.
- [18] H.M. Horton, S.Y. Chu, E.C. Ortiz, E. Pong, S. Cemerski, I.W.L. Leung, et al., Antibody-mediated coengagement of FcγRIIb and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus, *J. Immunol. Baltimore Md* 1950 (186) (2011) 4223–4233, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003412>.
- [19] S. Werwitzke, N. Vollack, M. von Hornung, K. Kalippke, J. Kutzschbach, A. Trummer, et al., Deletion or inhibition of Fc gamma receptor 2B (CD32) prevents FVIII-specific activation of memory B cells in vitro, *Thromb. Haemost.* 114 (2015), <http://dx.doi.org/10.1160/TH14-06-0535>.
- [20] A.S. De Groot, L. Cousens, F. Mingozzi, W. Martin, Tregitope peptides: the active pharmaceutical ingredient of IVIG?, *Clin. Dev. Immunol.* 2013 (2013) 493138, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/493138>.
- [21] D.J. Hui, E. Basner-Tschakarjan, Y. Chen, R.J. Davidson, G. Buchlis, M. Yazicioglu, et al., Modulation of CD8+ T cell responses to AAV vectors with IgG-derived MHC class II epitopes, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21 (2013) 1727–1737, <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2013.166>.
- [22] W.R. Heath, F.R. Carbone, The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells, *Nat. Immunol.* 14 (2013) 978–985, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2680>.
- [23] E. Shklovskaya, B.J. O’Sullivan, L.G. Ng, B. Roediger, R. Thomas, W. Weninger, et al., Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 18049–18054, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1110076108>.
- [24] J.H. Grubb, C. Vogler, Y. Tan, G.N. Shah, A.F. MacRae, W.S. Sly, Infused Fc-tagged beta-glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 8375–8380, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0803715105>.
- [25] N. Gupta, S. Culina, Y. Meslier, J. Dimitrov, C. Arnoult, S. Delignat, et al., Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance, *Sci. Trans. Med.* 7 (2015) 275ra21, <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1957>.
- [26] D. Sleep, J. Cameron, L.R. Evans, Albumin as a versatile platform for drug half-life extension, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1830) 5526–5534, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.023>.
- [27] M. Subramanyam, Immunogenicity of biotherapeutics—an overview, *J. Immunotoxicol.* 3 (2006) 151–156, <http://dx.doi.org/10.1080/15476910600845740>.
- [28] J.J. Neumiller, Clinical pharmacology of incretin therapies for type 2 diabetes mellitus: implications for treatment, *Clin. Ther.* 33 (2011) 528–576, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2011.04.024>.
- [29] R.E. Pratley, M.A. Nauck, A.H. Barnett, M.N. Feinglos, F. Ovalle, I. Harman-Boehm, et al., Once-weekly albiglutide versus once-daily liraglutide in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on oral drugs (HARMONY 7): a randomised, open-label, multicentre, non-inferiority phase 3 study, *Lancet Diab. Endocrinol.* 2 (2014) 289–297, [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70214-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70214-6).
- [30] S. Schulte, Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII, *Thromb. Res.* 131 (Suppl. 2) (2013) S2–S6, [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(13\)70150-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(13)70150-6).
- [31] T. Weimer, W. Wormsbächer, U. Kronthaler, W. Lang, U. Liebeng, S. Schulte, Prolonged in-vivo half-life of factor VIIa by fusion to albumin, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 659–667, <http://dx.doi.org/10.1160/TH07-08-0525>.
- [32] G. Golor, D. Bensen-Kennedy, S. Haffner, R. Easton, K. Jung, T. Moises, et al., Safety and pharmacokinetics of a recombinant fusion protein linking coagulation factor VIIa with albumin in healthy volunteers, *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 1977–1985, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12409>.
- [33] U. Martinowitz, T. Lissitchkov, A. Lubetsky, G. Jotov, T. Barazani-Brutman, C. Voigt, et al., Results of a phase I/II open-label, safety and efficacy trial of coagulation factor IX (recombinant), albumin fusion protein in haemophilia B patients, *Haemophilia* (2015), <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12721>.
- [34] J.S. Powell, Novel Approaches for Hemophilia Treatment, *Medscape*. (2015), <http://www.medscape.com/viewarticle/841623> (accessed October 22, 2015).
- [35] S.I. Lim, Y.S. Hahn, I. Kwon, Site-specific albumination of a therapeutic protein with multi-subunit to prolong activity in vivo, *J. Control. Release* 207 (2015) 93–100, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.004>.
- [36] P. Caraceni, M. Tufoni, M.E. Bonavita, Clinical use of albumin, *Blood Transfus. Trasfus. Sangue*. 11 (Suppl. 4) (2013) s18–s25, <http://dx.doi.org/10.2450/2013.0055>.
- [37] C.A. Weber, P.J. Mehta, M. Ardito, L. Moise, B. Martin, A.S. De Groot, T cell epitope: friend or foe? Immunogenicity of biologics in context, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 965–976, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.001>.
- [38] D. Kolbus, M. Wigren, I. Ljungcrantz, I. Söderberg, R. Alm, H. Björkbacka, et al., Immunization with cationized BSA inhibits progression of disease in ApoB^{-/-}/LDL receptor deficient mice with manifest atherosclerosis, *Immunobiology* 216 (2011) 663–669, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2010.11.003>.
- [39] M.G. Saifer, R. Somack, L.D. Williams, Plasma clearance and immunologic properties of long-acting superoxide dismutase prepared using 35,000 to 120,000 dalton poly-ethylene glycol, *Adv. Exp. Med. Biol.* 366 (1994) 377–387.
- [40] F.M. Veronese, Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions, *Biomaterials* 22 (2001) 405–417.
- [41] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Pharmacokinetic consequences of pegylation, *Drug Deliv.* 13 (2006) 399–409, <http://dx.doi.org/10.1080/10717540600814402>.
- [42] B. Mei, C. Pan, H. Jiang, H. Tjandra, J. Strauss, Y. Chen, et al., Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment, *Blood* 116 (2010) 270–279, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-11-254755>.
- [43] T.E. Coyle, M.T. Reding, J.C. Lin, L.A. Michaels, A. Shah, J. Powell, Phase I study of BAY 94–9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A, *J. Thromb. Haemost.* 12 (2014) 488–496.
- [44] P.L. Turecek, M.J. Bossard, M. Graninger, H. Gritsch, W. Höllriegl, M. Kaliwodra, et al., BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation, *Hämostaseologie* 32 (Suppl. 1) (2012) S29–S38.
- [45] B.A. Konkle, O. Stasyshyn, P. Chowdry, D.H. Bevan, T. Mant, M. Shima, et al., Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A, *Blood* 126 (2015) 1078–1085, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-03-630897>.
- [46] H.R. Stennicke, M. Kjalke, D.M. Karpf, K.W. Balling, P.B. Johansen, T. Elm, et al., A novel B-domain O-glycoPEGylated FVIII (N8-GP) demonstrates full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models, *Blood* 121 (2013) 2108–2116, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-01-407494>.
- [47] A.E. Pastoff, M. Ezban, M. Tranholm, J. Lykkesfeldt, B. Lauritzen, Prolonged effect of a new O-glycoPEGylated FVIII (N8-GP) in a murine saphenous vein bleeding model, *Haemophilia* 19 (2013) 913–919, <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12198>.
- [48] A. Tiede, B. Brand, R. Fischer, K. Kavakli, S.R. Lentz, T. Matsushita, et al., 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.* 11 (2013) 670–678, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12161>.
- [49] A. Abuchowski, J.R. McCoy, N.C. Palczuk, T. van Es, F.F. Davis, Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 3582–3586.
- [50] J.X.P. Paz, PEGylated FVIII exhibits reduced immunogenicity in hemophilia A mice and in vitro in human cells, *Haemophilia* 18 (2012).
- [51] R. Webster, E. Didier, P. Harris, N. Siegel, J. Stadler, L. Tilbury, et al., PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35 (2007) 9–16, <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.106.012419>.
- [52] A. Bendele, J. Seely, C. Richey, G. Sennello, G. Shopp, Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins, *Toxicol. Sci.* 42 (1998) 152–157, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/42.2.152>.
- [53] D.G. Rudmann, J.T. Alston, J.C. Hanson, S. Heidel, High molecular weight polyethylene glycol cellular distribution and PEG-associated cytoplasmic vacuolation is molecular weight dependent and does not require conjugation to proteins, *Toxicol. Pathol.* 41 (2013) 970–983, <http://dx.doi.org/10.1177/019262312474726>.
- [54] A. Baumann, D. Tuerck, S. Prabhu, L. Dickmann, J. Sims, Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis?, *Drug Discov. Today* 19 (2014) 1623–1631, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.002>.
- [55] A.T. Viau, A. Abuchowski, S. Greenspan, F.F. Davis, Safety evaluation of free radical scavengers PEG-catalase and PEG-superoxide dismutase, *J. Free Radic. Biol. Med.* 2 (1986) 283–288.
- [56] M.A. Young, A. Malavalli, N. Winslow, K.D. Vandegriff, R.M. Winslow, Toxicity and hemodynamic effects after single dose administration of MalPEG-hemoglobin (MP4) in rhesus monkeys, *Trans. Res. J. Lab. Clin. Med.* 149 (2007) 333–342, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2006.09.007>.
- [57] R. Stidl, S. Fuchs, M. Bossard, J. Siekmann, P.L. Turecek, M. Putz, Safety of PEGylated recombinant human full-length coagulation factor VIII (BAX 855) in the overall context of PEG and PEG conjugates, *Haemophilia* (2015), <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12762>.
- [58] R.P. Garay, R. El-Gewely, J.K. Armstrong, G. Garratty, P. Rchette, Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 1319–1323, <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2012.720969>.
- [59] A.W. Richter, E. Akerblom, Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethylene glycol modified proteins, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 70 (1983) 124–131.
- [60] Y. Mima, Y. Hashimoto, T. Shimizu, H. Kiwada, T. Ishida, Anti-PEG IgM is a major contributor to the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-conjugated protein, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 2429–2435, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00144>.
- [61] H. Tillmann, N.J. Ganson, K. Patel, A.J. Thompson, M. Abdelmalek, T. Moody, et al., High prevalence of pre-existing antibodies against polyethylene glycol (PEG) in hepatitis C (HCV) patients which is not associated with impaired response to PEG-interferon, *J. Hepatol.* 52 (Suppl. 1) (2010) S129, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(10\)60309-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(10)60309-1).
- [62] J.K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L.S. Chan, T. Fisher, H.J. Meiselman, et al., Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients, *Cancer* 110 (2007) 103–111, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.22739>.
- [63] T. Shimizu, Y. Mima, Y. Hashimoto, M. Ukawa, H. Ando, H. Kiwada, et al., Anti-PEG IgM and complement system are required for the association of second doses of PEGylated liposomes with splenic marginal zone B cells, *Immunobiology* 220 (2015) 1151–1160, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.06.005>.
- [64] T. Ishida, M. Harada, X.Y. Wang, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes, *J. Control. Release* 105 (2005) 305–317, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.04.003>.
- [65] A.S. Abu Lila, H. Kiwada, T. Ishida, The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage, *J. Control. Release* 172 (2013) 38–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.07.026>.
- [66] T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, H. Kiwada, Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes, *J. Control. Release* 115 (2006) 243–250, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.001>.
- [67] A.S. Abu, M. Lila, T. Ichihara, T. Shimizu, H. Ishida, Kiwada, Ex-vivo/in-vitro anti-polyethylene glycol (PEG) immunoglobulin M production from murine splenic B cells stimulated by PEGylated liposome, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (2013) 1842–1848.
- [68] M. Ichihara, T. Shimizu, A. Imoto, Y. Hashiguchi, Y. Uehara, T. Ishida, et al., Anti-PEG IgM response against PEGylated liposomes in mice and rats, *Pharmaceutics* 3 (2010) 1–11, <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics3010001>.
- [69] H. Koide, T. Asai, K. Hatanaka, S. Akai, T. Ishii, E. Kenjo, et al., T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated

- injection of PEGylated liposomes, *Int. J. Pharm.* 392 (2010) 218–223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.022>.
- [70] Y. Hashimoto, T. Shimizu, A.S. Abu Lila, T. Ishida, H. Kiwada, Relationship between the concentration of anti-polyethylene glycol (PEG) immunoglobulin M (IgM) and the intensity of the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon against PEGylated liposomes in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 38 (2015) 417–424, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b14-00653>.
- [71] I. Hamad, A.C. Hunter, J. Szebeni, S.M. Moghimi, Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process, *Mol. Immunol.* 46 (2008) 225–232, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.08.276>.
- [72] J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz, Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1020–1030, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.017>.
- [73] A. Chanan-Khan, J. Szebeni, S. Savay, L. Liebes, N.M. Rafique, C.R. Alving, et al., Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions, *Ann. Oncol.* 14 (2003) 1430–1437.
- [74] P.M. van Helden, S. Unterthurner, C. Hermann, M. Schuster, R.U. Ahmad, A.N. Schiviz, et al., Maintenance and break of immune tolerance against human factor VIII in a new transgenic hemophilic mouse model, *Blood* 118 (2011) 3698–3707, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-11-316521>.
- [75] L. Castro-Núñez, I. Dienava-Verdoold, E. Herczenik, K. Mertens, A.B. Meijer, Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 1929–1937, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04860.x>.
- [76] C.J. van Schooten, S. Shahbazi, E. Groot, B.D. Oortwijn, H.M. van den Berg, C.V. Denis, et al., Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo, *Blood* 112 (2008) 1704–1712, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-01-133181>.
- [77] J. Skupsky, A.-H. Zhang, Y. Su, D.W. Scott, A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII, *Blood* 114 (2009) 4741–4748, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-10-186452>.
- [78] B. Gangadharan, S. Delignat, V. Ollivier, N. Gupta, N. Mackman, S.V. Kaveri, et al., Role of coagulation-associated processes on factor VIII immunogenicity in a mouse model of severe hemophilia A, *J. Thromb. Haemost.* 12 (2014) 2065–2069, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12740>.
- [79] S. Dasgupta, A.-M. Navarrete, J. Bayry, S. Delignat, B. Wootla, S. André, 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.* 104 (2007) 8965–8970, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702120104>.
- [80] Y. Repessé, S. Dasgupta, A.-M. Navarrete, S. Delignat, S.V. Kaveri, S. Lacroix-Desmazes, Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 1172–1173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.048> (author reply 1174–1175).
- [81] C. Yanover, N. Jain, G. Pierce, T.E. Howard, Z.E. Sauna, Pharmacogenetics and the immunogenicity of protein therapeutics, *Nat. Biotechnol.* 29 (2011) 870–873, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2002>.
- [82] A.D. Pashov, T. Calvez, L. Gilardin, B. Maillère, Y. Repessé, J. Oldenburg, et al., In silico calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the F8 gene, *Haemophilia* 20 (2014) 176–184, <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12276>.
- [83] A.J. Shepherd, S. Skelton, C.E. Sansom, K. Gomez, D.S. Moss, D.P. Hart, A large-scale computational study of inhibitor risk in non-severe haemophilia A, *Br. J. Haematol.* 168 (2015) 413–420, <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13131>.

Lack of Functional Immunogenicity of Humanized Cobra Venom Factor in Mice: Analysis of the IgG response against CVF and Human C3



Mathieu Ing¹, Brian E. Hew², David C. Fritzing², Ivan Peyron¹, Srinivas V. Kaveri¹, Sébastien Lacroix-Desmazes¹, Carl-Wilhelm Vogel^{2,3}, Julie Rayes¹

¹INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, 75006 France; ²University of Hawaii Cancer Center; ³Department of Pathology, John A. Burns School of Medicine, Honolulu, HI 96813, USA

Introduction: Cobra venom factor (CVF) is a unique component of cobra venom. When CVF is added to serum, it binds factor B and leads to the formation of the alternative pathway C3 convertase which is very stable and causes continuous activation of C3, leading to rapid and almost complete complement consumption. The ability of CVF to exhaustively activate complement, and thereby depleting complement, has been exploited over the past four and a half decades in innumerable studies in laboratory animals, from mice to primates, as a tool to study the role of complement in host defense as well as in its role in the pathogenesis of disease. As a matter of fact, our knowledge of the role of complement in the pathogenesis of many diseases was established by comparing normal animals with complement-depleted animals.

Complement-depletion has been recognized as a potentially valuable therapeutic approach in diseases with complement pathogenesis. However, the venom protein CVF is immunogenic, limiting its usefulness for complement-depletion to a single injection. In an attempt to overcome this limitation, and taking advantage of the highly similar three-dimensional structures of C3 and CVF, we created a chimeric protein in which the 168 C-terminal amino acid residues of human C3 was replaced by the homologous sequence from CVF. This chimeric protein is essentially a human C3 derivative with CVF-like functions, termed "humanized CVF" (hCVF). Our lead hCVF protein, termed HC3-1496, exhibits an overall protein sequence identity with human C3 of 94.3%; and even within the 168 C-terminal residues from CVF, 44.05% are identical to human C3 (Figure 1).



Figure 1: Schematic representation of the chain structures of hCVF (HC3-1496), human C3, and CVF.

hCVF has subsequently been shown in multiple preclinical disease models with complement pathogenesis to be a promising therapeutic agent. In three disease models (age-related macular degeneration (AMD), arthritis, and myasthenia gravis) the depletion with hCVF was continued for up to 30 days, suggesting the absence of a functionally relevant immune response to hCVF. This observation was extended in a mouse model of hemophilia A (Factor VIII knock-out mice) aimed at reducing the anti-FVIII immune response. A significant reduction of anti-FVIII was achieved by four cycles of complement-depletion with hCVF in weekly intervals. Significantly, weekly injections of hCVF resulted in effective reduction of circulating C3 (Figure 2). In contrast, using native CVF resulted in a consistent C3 depletion only after the first injection, and was essentially without effect after week four (Figure 2). These results demonstrated that hCVF lacks a functionally relevant immunogenicity in mice, at least over a four week period, and despite repeated injections.

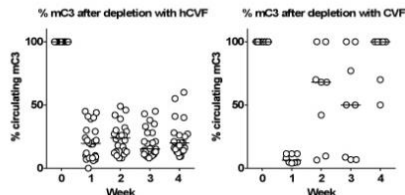


Figure 2: C3 levels in FVIII knock-out mice (C57bl/6 background) after weekly intervals of complement depletion with hCVF (left panel) and natural CVF (right panel).

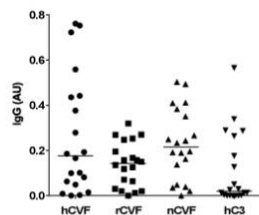


Figure 3: IgG levels in wt C57bl/6 mice after four weekly injections of hCVF against hCVF, rCVF, nCVF, and hC3. Please note the number of sera with essentially no antibodies.

Results: Given the potential for therapeutic application, we studied the immunogenicity of hCVF in mice. Twenty wild-type C57bl/6 mice were injected with hCVF in four weekly intervals, using the C3b-like form of HC3-1496 produced in CHO cells. After four weeks, we assessed the presence of IgG antibodies by Elisa against hCVF as well as against recombinant CVF (rCVF), natural CVF (nCVF), and human C3 (hC3). As shown in Figure 3, the mice developed antibodies against hCVF, albeit with significant variation from mouse to mouse. Notably, approximately one quarter of the mice had very low or undetectable levels of antibodies. The mean antibody levels reacting with hCVF, rCVF, and nCVF were not statistically different. The mean antibody levels against hCVF and nCVF were significantly higher than against hC3, although with p-values of only 0.02 and 0.01, respectively, whereas the mean antibody levels between rCVF and hC3 were not significant.

When the antibody levels of anti-hCVF were plotted against anti-rCVF, anti-nCVF, and anti-hC3 there was a highly significant correlation (Figure 4), indicating that a higher antibody response in individual mice correlated with a higher cross-reaction with all four antigens, suggesting that the antibodies bind to the same or similarly antigens present in all four proteins. Figure 5 demonstrates that the level of anti-hCVF IgG does not correlate with the level of circulating murine C3 (mC3). This observation is consistent with the fact that the antibodies to hCVF do not interfere with its activity of forming a convertase and depleting C3.

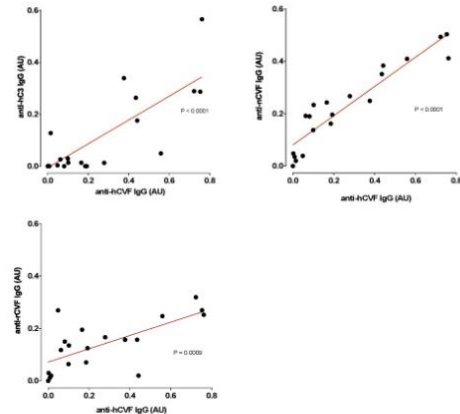


Figure 4: Correlation of IgG binding (at week four) to hCVF with binding to rCVF, nCVF, and hC3. Please also note the cluster of sera with essentially no antibodies.

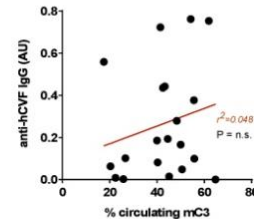


Figure 5: Lack of correlation between anti-hCVF IgG and circulating C3 in mice (C57bl/6) after four weeks.

Discussion: Although repeated administration of hCVF resulted in repeated complement depletion, indicating the absence of a functionally relevant antibody response to hCVF, we detected IgG antibodies to hCVF in the mouse sera, cross-reacting with rCVF, nCVF, and human C3. The overall low antigenicity of hCVF is confirmed by the fact that a significant number of animals developed essentially no antibodies to hCVF. Our data do not allow to identify specific antigenic epitopes in the human C3 or CVF portions of hCVF. However, some conclusions can be drawn.

1) The hCVF protein used in our study was a C3b-like form of HC3-1496 which therefore lacks the four arginine residues between the alpha- and beta-chains, and the C3a anaphylatoxin domain. Accordingly, this two-chain protein consists of 1,560 amino acids, of which 1,392 amino acid residues are identical to human C3 (alpha-chain and the N-terminus of the beta-chain through residue 1,495) and of which 168 amino acids are identical to CVF sequence (residue 1,496 through the C-terminus). In a first approximation to locate antigenic differences between HC3-1496 and murine C3, we looked at the amino acid sequence differences between HC3-1496 and murine C3 (without taking conformational epitopes, amino acid similarities, and carbohydrate antigens into consideration). Within the 1,392 residues long human C3 sequence of HC3-1496, 306 (22.0%) residues differ from murine C3, and are therefore potentially immunogenic. Of these 306 different residues, 44 residues are also present in rCVF. Within the 168 amino acid long CVF sequence at the C-terminus of HC3-1496, 96 (57.1%) differ from murine C3, and are therefore potentially immunogenic. Of those 96 different residues, eight are also present in human C3. Accordingly, a total of 314 human C3 residues (306 plus 8) and a total of 140 CVF residues (44 plus 96) may be immunogenic in mice (262 residues in hC3 only, 88 residues in CVF only, 52 residues in hC3 and CVF; 402 total). It is therefore reasonable to assume that both human C3 residues and CVF residues in HC3-1496 are contributing to the observed immunogenicity of the protein.

2) It is important to note that there was no correlation between anti-hCVF antibody levels and remaining C3 levels in complement-depleted mice which is in an agreement with the apparent lack of functional relevance of the immune response against hCVF. The most likely explanation is that hCVF contains the same protein structures required for binding to Factor B and forming a convertase just like C3 in all vertebrates, and that these structures are therefore highly conserved throughout vertebrates and not immunogenic. Given that hCVF does form a stable, active C3 convertase provides evidence for this hypothesis.

3) Given that our data were derived by injecting hCVF into mice, one can safely assume that hCVF will be even less immunogenic in humans as the total number of different amino acids between HC3-1496 and murine C3 (402 residues) will be reduced to only 94 residues between HC3-1496 and human C3, all within the 168 amino acid long C-terminal sequence only.